

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040016**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.11

(21) Номер заявки
201791689

(22) Дата подачи заявки
2016.01.28

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)
A61K 31/4995 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ АНТАГОНИСТ ИЛИ ИНГИБИТОР РЕЦЕПТОРА ХЕМОКИНОВ CXCR4 ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ COPD И АЕСОРD, СПОСОБ ПОДАВЛЕНИЯ МИГРАЦИИ ФИБРОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С COPD ИЛИ АЕСОРD И НАБОР**

(31) **EP15152886.6**

(32) **2015.01.28**

(33) **EP**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/EP2016/051771**

(87) **WO 2016/120369 2016.08.04**

(56) **WO-A1-2013052844**
WO-A1-2014132100

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ БОРДО;
ЭНСТИТУ НАСЬОНАЛЬ ДЕ
ЛЯ САНТЕ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ - ЭНСЭРМ; САНТР
ОСПИТАЛЬЕ ЮНИВЕРСИТЕР ДЕ
БОРДО (FR)**

(72) Изобретатель:
**Берже Патрик, Дюпэн Изабель,
Жириде Пьер-Оливье (FR)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к применению композиции, состоящей по существу из терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бицикламов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов, для изготовления лекарственного средства для предупреждения и/или лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) и острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (AECOPD). Заявленное изобретение относится к способу подавления миграции фиброцитов у пациентов с COPD и AECOPD или у пациентов с риском развития COPD и AECOPD, включающему введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного из вышеуказанных антагонистов или ингибиторов рецептора хемокинов CXCR4. Заявленное изобретение также относится к набору для лечения и/или предупреждения COPD и AECOPD.

B1**040016****040016****B1**

Область изобретения

Изобретение относится к новым композициям и способам предупреждения и/или лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) и острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (AECOPD).

Уровень техники для изобретения

COPD представляет собой очень частое заболевание дыхательных путей, поражающее более 200 млн людей по всему миру. В настоящее время оно является четвертой основной причиной смерти, но смертность может достичь третьей причины смерти в 2020. Оно характеризуется стойким ограничением воздушного потока, которое, как правило, является прогрессирующим и ассоциировано с усиленным хроническим воспалительным ответом в дыхательных путях и легких на вредные вещества или газы. Основным фактором риска для COPD является курение табака. Заболевание характеризуется хроническим воспалением бронхов и ремоделированием дистальных отделов дыхательных путей, и в частности бронхиальным и перибронхиальным фиброзом, приводящим к стойкому ограничению воздушного потока.

Обострения и сопутствующие заболевания вносят вклад в общую тяжесть состояния индивидуальных пациентов. Существует несколько анатомических очагов поражения, вносящих вклад в уменьшение воздушного потока, обнаруженное у пациентов с COPD. Они включают в себя скопление слизистого секрета, перибронхиальный фиброз, сужение малых дыхательных путей и повреждение стенок альвеол, что является определяющей характеристикой эмфиземы. Хроническое течение COPD часто ухудшается также из-за острых приступов (AECOPD), наиболее часто связанных с вирусными или бактериальными инфекциями. Эти AECOPD ассоциированы со всплеской нейтрофильного и иногда эозинофильного воспаления. AECOPD поражают около 80% пациентов с COPD в течение 3-летнего периода, и частота обострений в основном связана с наличием предшествующих обострений.

AECOPD приводит к огромным затратам на здравоохранение, особенно связанным с госпитализациями. AECOPD существенно влияют на качество жизни и играют роль в ухудшении заболевания: функция легких более быстро уменьшается у пациентов с частыми обострениями, с повышением риска смерти. В частности, опубликована высокая частота смертности у пациентов с COPD, поступивших в больницу из-за AECOPD, и она достигает вплоть до 45% в течение 4 последующих лет. Тяжелые AECOPD рассматривают как независимый прогностический фактор смертности. Однако механизмы для этих последних обнаружений остаются полностью неизвестными.

Современные способы фармакологического лечения действуют на симптомы и качество жизни, но не улучшают показатели смертности или естественную динамику заболевания, когда последняя характеризуется более быстрым ухудшением функции легких.

До настоящего времени привлечение фиброцитов во время и после AECOPD не исследовали, и немного известно относительно роли модуляции фиброцитов и возникающего в результате эффекта на прогрессирование заболевания. Авторы настоящего изобретения исследовали привлечение и миграцию фиброцитов в периферической крови у пациентов в ходе обострения COPD и пришли к пониманию необходимости разработки новых способов терапии на основании этой концепции. В частности, авторы настоящего изобретения показали, что количество фиброцитов, экспрессирующих CXCR4, CCR3 и CCR2, рецептор хемокинов для CXCL12, CCL11, CCL7, CCL13 и CCL2, было значительно увеличено у пациентов в ходе AECOPD, и что эти специфические фиброциты сильно коррелировали со смертностью и ухудшенной функцией легких. Авторы настоящего изобретения успешно идентифицировали новый способ исследования лекарственных средств и новые лекарственные средства для лечения и/или предотвращения COPD и AECOPD посредством демонстрации того, что антагонисты пар рецептор/лиганд CCR2/CCL2, CCR2/CCL7, CCR2/CCL13, CXCR4/CXCL12 и/или CCR3/CCL11 являются полезными для лечения и/или предотвращения COPD и AECOPD посредством предотвращения привлечения/миграции фиброцитов у пациентов в ходе AECOPD.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению композиции для изготовления лекарственного средства для предупреждения и/или лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) и острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (AECOPD), где указанная композиция состоит по существу из терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бицикламов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов и где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 ингибирует миграцию и/или рекрутирование фибробластов во время обострения у пациентов с хроническим обструктивным заболеванием легких (COPD).

В одном аспекте изобретение относится к применению композиции, где указанный антагонист CXCR4 выбран из соединений на основе пара-ксилилендиамина.

В другом аспекте изобретение относится к применению композиции, где указанный антагонист CXCR4 представляет собой плериксафор.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению композиции, где указанная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретение относится к применению композиции, где указанная композиция дополнительно содержит бронхорасширяющие средства, кортикостероиды и/или ингибиторы фосфодиэстеразы.

Изобретение относится к способу подавления миграции фиброцитов у пациентов с COPD и АЕ-COPD или у пациентов с риском развития COPD и АЕ-COPD, включающему введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов.

В одном аспекте изобретение относится к способу, где указанный антагонист или ингибитор рецептора хемокинов CXCR4 вводят орально, буккально или подъязычно, и он находится в форме таблеток, капсул (включая мягкие желатиновые капсулы), множества частиц, гелей, пленок, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать вкусовые вещества или красители, для доставки с немедленным, отложенным, модифицированным, замедленным, двойным, контролируемым высвобождением или пульсирующей доставкой.

В другом аспекте изобретение относится к способу, где указанный антагонист или ингибитор рецептора хемокинов CXCR4 вводят посредством ингаляции, и он находится в форме ингаляции сухого порошка или аэрозольного спрея, поставляемых из находящихся под давлением контейнера, насоса, распылителя или небулайзера.

Изобретение также относится к набору для лечения и/или предупреждения COPD и АЕ-COPD, содержащему терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4 в количестве, достаточном для лечения и/или предупреждения COPD и АЕ-COPD, фармацевтически приемлемый носитель и инструкцию по применению и введению антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4 для предупреждения и/или лечения COPD и АЕ-COPD, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов.

В одном из аспектов изобретение относится к набору для подавления миграции фиброцитов у пациентов с COPD и АЕ-COPD или у пациентов с риском развития COPD и АЕ-COPD, содержащему терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4 в количестве, достаточном для лечения и/или предупреждения COPD и АЕ-COPD, фармацевтически приемлемый носитель и инструкцию по применению и введению антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4 для подавления миграции фиброцитов у указанного пациента, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан дизайн исследования с количествами пациентов, которые включены и уровень фиброцитов которых оценен количественно.

Фиг. 2А-Е представляют собой графики, показывающие процентное содержание CD45+ Coll+ клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) (А) и концентрацию фиброцитов в крови (В) контрольных субъектов ("Контр.", n=38), пациентов с COPD без обострения ("Nex", n=9), пациентов с COPD с обострением ("V1", n=48) *: P<0,05, *** P<0,001, непараметрический критерий Крускала-Уоллиса. Процентное содержание CD45+ CD34+ Coll+ клеток в PBMC (С) и концентрации фиброцитов в крови (D) контрольных субъектов ("Контр.", n=25), пациентов с COPD без обострения ("Nex", n=8), пациентов с COPD с обострением ("V1", n=29) *: P<0,05, **: P<0,01, непараметрический критерий Крускала-Уоллиса. Медианы представлены как горизонтальные линии (А-Д). Процентное содержание CD45+ Coll+ клеток (Е) и концентрация CD45+Coll+ клеток в крови (F) у каждого пациента с COPD с обострением на время обострения (V1) и через 2 месяца после (V2) ** P<0,01, тест согласованных пар Уилкоксона.

На фиг. 3А-Е представлен анализ выживаемости Каплана-Мейера у субъектов с COPD с обострением, разделенных по пороговому процентному содержанию CD45+ Coll+ клеток в PBMC 28 субъектов, измеренному на время обострения (V1). Из 42 субъектов с доступными данными выживаемости, 36 обладала значениями ниже (серая кривая) и 6 выше порога (черная кривая). Процентное содержание CD45+ Coll+ клеток в PBMC в качестве прогностических факторов смертности у субъектов с COPD (А). В-Е, связь между FEV1 (В), FVC (С), FEV1/CVF (D), TLCO (Е), pO2 (F) и процентным содержанием

CD45+ Coll+ клеток в PBMC у пациентов с COPD с обострением на V2.

FEV1: Объем форсированного выдоха на 1-й секунде; FVC: форсированная жизненная емкость; TLCO: коэффициент переноса монооксида углерода; P_{aO_2} : парциальное давление O_2 в артериальной крови. Коэффициент корреляции (r) и уровень значимости (значение p) получали с использованием непараметрического анализа Спирмена.

Фиг. 4А-Ж представляют собой графики, показывающие процентное содержание клеток, экспрессирующих CXCR4 (А), CCR2 (С), CCR3 (Е), CCR5 (G) и CCR7 (I) в фиброцитах контрольных субъектов ("Контр."), пациентов с COPD с обострением ("VI"). Концентрация CXCR4+ (В), CCR2+ (D), CCR3+ (F), CCR5+ (H) или CCR7+ (J) фиброцитов в крови контрольных субъектов, пациентов с COPD без обострения, пациентов с COPD с обострением. *: $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, критерий Манна-Уитни.

На фиг. 5А-Д показаны А) миграция фиброцитов контрольных субъектов (n=6, серые столбцы) и пациентов с COPD с обострением (n=6, черные столбцы) в ответ на плазму пациентов с COPD с обострением в присутствии (+) или в отсутствие (-) 25 мкг/мл плериксафора. * $P < 0,05$, парный t-критерий. В) CXCL12 в плазме у индивидуальных субъектов. Символы обозначают индивидуальных субъектов, и горизонтальные линии представляют медианы. С) Миграция фиброцитов контрольных субъектов (n=8, серые столбцы) и пациентов с COPD с обострением (n=5, черные столбцы) в ответ на CXCL12. ** $P < 0,01$, двусторонний ANOVA с апостериорными анализами Бонферрони. Д) Миграция фиброцитов контрольных пациентов (n=6; серые столбцы) и пациентов с COPD с обострением (n=7; черные столбцы) в ответ на CXCL12 в присутствии (+) или в отсутствие (-) 25 мкг/мл плериксафора. *: $P < 0,05$, парный t-критерий.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий процентное содержание CD45+ Coll+ клеток в PBMC у пациентов с COPD с обострением на V2 без каких-либо внеплановых осмотров (n=4), с одним внеплановым осмотром (n=8) или с двумя или более внеплановыми осмотрами (n=14) за год до V1. Медианы представлены как серые горизонтальные линии. **: $p < 0,01$, непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с множественными z-тестами.

На фиг. 7 показана связь между FEV1 (L) (А), FVC (L) (В), FEF 25-75 (%) (С), FEF 25-75 (л/с) (D) и процентным содержанием CD45+ Coll+ клеток в PBMC у пациентов с COPD с обострением на V2. FEV1: объем форсированного выдоха на 1-й секунде; FVC: форсированная жизненная емкость; FEF 25-75: средняя скорость форсированного выдоха в средней (25-75%) части FVC. Коэффициент корреляции (r) и уровень значимости (значения p) получали с использованием непараметрического анализа Спирмена.

Фиг. 8А-Д представляют собой графики, показывающие (А) миграцию фиброцитов контрольных субъектов (n=1, серые столбцы) и пациентов с COPD с обострением (n=5, черные столбцы) в ответ на плазму пациентов с COPD с обострением в присутствии (+) или в отсутствие (-) 10 мкМ SB 328437. (В) CCL11 в плазме у индивидуальных субъектов. Символы обозначают индивидуальных субъектов, и горизонтальные линии представляют собой медианы. (С) миграция фиброцитов контрольных субъектов (n=2, серые столбцы) и пациентов с COPD с обострением (n=6, черные столбцы) в ответ на CCL11. (D) миграция фиброцитов контрольных пациентов (n=2) и пациентов с COPD с обострением (n=5) в ответ на CCL11 в присутствии (+) или в отсутствие (-) 10 мкМ SB 328437.

Фиг. 9 представляют собой графики, показывающие выделение клеток (10^3 /мл) после бронхоальвеолярного лаважа (BAL), где, в частности, (А) общее количество клеток, (В) выделение клеток макрофагов, (С) выделение нейтрофилов и (D) выделение лимфоцитов в каждой группе мышей: мышей, подвергнутых воздействию комнатного воздуха и инъекции PBS (□), мышей, подвергнутых воздействию комнатного воздуха и введению двухцепочечной РНК поли(І:С) (■), мышей, подвергнутых воздействию сигаретного дыма и инъекции PBS (▣), мышей, подвергнутых воздействию сигаретного дыма и инъекции двухцепочечной РНК поли(І:С) (▤).

Фиг. 10 (А) представляет собой изображения после электронной микроскопии срезов бронхов, полученных из группы мышей, подвергнутых воздействию сигаретного дыма и инъекции поли(І:С), по сравнению с контрольной группой, подвергнутой воздействию комнатного воздуха и инъекции поли(І:С). (В) представляют собой графики, показывающие соотношение подвергнутых фиброзу областей (FA) и периметра базальной мембраны (PLB) в каждой группе мышей, как описано выше на фиг. 9.

На фиг. 11 показаны графики, показывающие процентное содержание циркулирующих фиброцитов (CD45+Coll+клеток) в крови и легких для каждой группы мышей, как описано выше на фиг. 9.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий процентное содержание в легких фиброцитов (CD45+Coll+клеток) для легких в каждой группе мышей, как описано выше на фиг. 9.

Подробное описание

Авторы настоящего изобретения исследовали в трансляционном клиническом исследовании концентрации фиброцитов в периферической крови у пациентов с COPD во время обострения и через 2 месяца после обострения в стабильном состоянии по сравнению с контрольными субъектами и пациентами с COPD без обострений. Более того, характеризовали рецепторы хемокинов и исследовали свойства миграции этих фиброцитов у пациентов с COPD и контрольных субъектов.

Авторы настоящего изобретения обнаружили значимо увеличенное количество циркулирующих

фиброцитов у пациентов во время АЕСОРD по сравнению с контрольными субъектами, и то, что количество циркулирующих фиброцитов у тех же пациентов уменьшалось через два месяца после АЕСОРD. Авторы настоящего изобретения показали, что высокое процентное содержание циркулирующих фиброцитов во время обострений являлось ассоциированным с повышенным риском смерти и что процентное содержание фиброцитов после АЕСОРD отрицательно коррелировало с несколькими параметрами обструктивного заболевания легких, т.е. FEV1 (объемом форсированного выдоха на 1-й секунде), FVC (форсированной жизненной емкостью), FEV1/FVC (индексом Тиффно-Пинелли), TLCO (коэффициентом переноса монооксида углерода в легких) и PaO_2 (парциальным давлением кислорода в артериальной крови). В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что фиброциты экспрессировали CXCR4, CCR2 и/или CCR3, рецепторы хемокинов для хемокинов CXCL12, CCL2, CCL7, CCL13 и/или CCL11 соответственно.

Антагонисты рецепторов хемокинов CXCR4 уменьшали миграцию фиброцитов в плазме пациентов с COPD с обострением, и, таким образом, обнаружили, что их можно использовать в соответствии с настоящим изобретением для лечения и/или предотвращения COPD и АЕСОРD. Предпочтительными антагонистами по изобретению являются антагонисты рецептора хемокинов CXCR4, такие как, но без каких-либо ограничений, плериксафор.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к применению композиции и способам применения антагонистов или ингибиторов CXCR4 для применения в лечении и/или предотвращении COPD или АЕСОРD. Предпочтительные соединения по изобретению мешают связыванию нативных лигандов с рецептором CXCR4 и ингибируют активацию рецептора и последующие нижестоящие пути передачи сигналов.

Рецептор хемокинов CXCR4 обозначает рецептор 4 хемокинов типа C-X-C (CXCR4). Он известен также как фузин или кластер дифференцировки 184 (CD 184), представляющий собой сопряженный с G-белком рецептор (GPCR) с семью трансмембранными (TM) доменами, принадлежащий к GPCR класса I или семейству родопсиноподобных GPCR. Структура CXCR4 состоит из 352 аминокислотных остатков, содержащих N-концевой домен, семь TM доменов, три внеклеточных петли (ECL), три внутриклеточных петли (ICL) и C-концевой домен.

CXCR4 является специфическим для хемокинового лиганда 12 (CXCL12), называемого также стромальным фактором-1 (SDF-1). Как гомеостатический хемокин, SDF-1 или CXCL12 представляет собой хемокиновый пептид 8 кДа с 67 аминокислотными остатками, в основном локализованный в стромальных клетках костного мозга. Существуют две различные изоформы CXCL12- α и CXCL12- β . Аминокислотная последовательность CXCL12- α или SDF-1 α человека имеет номер доступа в GenBank NP954637. Аминокислотная последовательность CXCL12- β или SDF-1 β человека имеет номер доступа в GenBank NP000600. CXCL12 человека описан также в патентах США № 5756084 и № 5563048.

Антагонисты или ингибиторы в соответствии с настоящим изобретением предназначены, чтобы являться лекарственными средствами, которые ингибируют, напрямую или опосредованно, биологическую активность пар рецептор/лиганд CCR2/CCL2, CCR2/CCL7, CCR2/CCL13, CXCR4/CXCL12 и/или CCR3/CCL11. Такие средства могут включать в себя малые молекулы (органические или неорганические), природные продукты, синтетические соединения, антитела (например, поликлональную сыворотку, моноклональные, химерные, гуманизированные, человеческие антитела), фрагменты антител, такие как рекомбинантные фрагменты антител, одноцепочечные антитела (scFv), отдельные вариабельные домены антител, белки из отдельного домена антитела (dAb), антигенсвязывающие фрагменты, средства на основе нуклеиновой кислоты, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, ДНКзимы, или РНКи, миРНК или кшРНК для РНК-интерференции, которые действуют посредством уменьшения экспрессии рецепторов хемокинов, белки, пептиды, производные пептидов, пептидомиметики, углеводы или любое другое соединение или композицию, которые предпочтительно уменьшают активность рецептора хемокинов CXCR4 либо посредством эффективного уменьшения количества CXCR4, присутствующего на клетке, либо посредством ингибирования взаимодействий лиганда CXCL12, в частности, CXCL12- α . Антагонистические соединения также могут включать в себя варианты, изоформы, сольваты, гидраты, фармацевтически приемлемые соли, таутомеры, стереоизомеры и пролекарства антагонистических соединений.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиции и способы для применения по настоящему изобретению предпочтительно содержат антагонисты рецептора хемокинов CXCR4, ингибирующие одну или несколько биологических функций или биологическую активность, ассоциированную с CXCR4, посредством ингибирования связывания одного или нескольких лигандов (например, CXCL12- α и/или CXCL12- β (SDF-1- α или SDF-1- β)) с CXCR4 и/или ингибирования передачи сигнала, опосредуемой CXCR4.

Соответственно опосредуемые CXCR4 процессы и ответы клеток (например, пролиферацию, миграцию, хемотаксические ответы и дифференцировку фиброцитов) можно ингибировать посредством антагонистов CXCR4.

Обширный поиск антагонистов CXCR4 проводили в прошлом, поскольку CXCR4 первоначально

открыли как один из корецепторов, вовлеченных во вход вируса иммунодефицита человека в клетку. Таким образом, многочисленные соединения были хорошо охарактеризованы химически и идентифицированы как значительно ингибирующие CXCR4 и ось CXCR4/CXCL12. Первые открытые антагонисты CXCR4 представляли собой производные пептидов. Последующие антагонисты CXCR4 представляли собой катионные молекулы, способные связывать преимущественно анионный внеклеточный домен CXCR4. До настоящего времени более 20 различных классов химических веществ описаны как антагонисты CXCR4. Опубликовано множество статей, описывающих молекулы, обладающие активностью антагонистов CXCR4 на основании их химических остовов (Debnath B et al., *Theranostics*. 2013; 3(1): 47-75).

Малые молекулы являются первым классом соединений, которые можно использовать в композициях антагонистов CXCR4 в соответствии с настоящим изобретением. Они хорошо известны в данной области и подробно описаны как антагонисты CXCR4, среди прочего, в Wilson LJ et al. *Drug Development Research*. 2011; 72:598-602. Они включают в себя цикламиметики, бис-макроциклы, такие как, в частности, бис-тетрааза-макроциклы (бицикламы) и их производные, антагонисты CXCR4 на основе хинолона, антагонисты CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонисты CXCR4 на основе гуанидина, антагонисты CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонисты CXCR4 на основе пиримидина, производные 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащие гетероциклы.

Бицикламы описаны, среди прочего, в международной публикации WO 00/56729. Среди молекул бицикламов, авторы настоящего изобретения могут сослаться на соединения на основе параксиленилениамина, подобные плериксафору, обозначенному также как AMD3100, введенному в коммерческое обращение Genzyme Corporation под торговым наименованием Mozobil и описанному, среди прочего, в US 5583131; и в Uy et al., *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Nov;8(11):1797-804. doi: 10.1517/14712598.8.11.1797. Производные плериксафора или структурно модифицированных соединений также можно использовать в качестве антагонистов в композиции по настоящему изобретению. Такие производные могут представлять собой полиаминовые макроциклические соединения с ароматическими связями, такие как тетрафторные производные плериксафора, описанные, среди прочего, в международной публикации WO 93/12096 и в патенте США № 5583131.

Аналоги плериксафора, такие как AMD3465, обладающий одиночным азамacroциклическим кольцом, и последующие не относящиеся к макроциклическим, перорально активные антагонисты CXCR4, сохраняющие п-ксилилендиаминовый линкер между двумя гетероциклическими звеньями соединений, описаны в Bodart et al. (*Biochem Pharmacol*. 2009 Oct 15;78(8):993-1000). Другое бис-азамacroциклическое соединение, обозначенное также AMD3329, идентифицировано в Bridger et al. (*J. Med. Chem*. 1999 Sep 23;42(19):3971-81) и поставляется на рынок компанией AnorMed.

Дополнительные производные плериксафора, которые можно использовать в композициях и способах по настоящему изобретению, разработаны, начиная с бициклама плериксафора и пептидного антагониста CXCR4 (TNI4003). Эти производные можно выбирать среди N,N'-ди-2-пиридинил-1,4-бензолдиметанамина, 4F-бензоил-TN 14003, обозначенного также BKT-140 (Peled et al, *Clin. Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):469-79); N,N'-(1,4-фениленбис(метилена))дипиримидин-2-амин, обозначенного также MSX-122 (Liang et al, *PLoS One*. 2012;7(4):e34038), проходящего фазу клинического исследования против невосприимчивых метастазирующих или местнораспространенных солидных опухолей, в которых компания Metastatix Inc является спонсором; и N¹,N⁴-ди-2-пиридинил-1, 4-бензолдиметанамина, обозначенного также как WZ811 (Zhan W et al., *J Med Chem*. 2007 Nov 15;50(23):5655-64) и поставляемого на рынок компаниями Tocris Bioscience и Selleckchem (<http://www.selleckchem.com/products/wz-811.html>).

Дополнительные миметики бициклама включают в себя, например, JM1657, описанный в De Clercq E et al., (*Mini Rev Med Chem*. 2005 Sep;5(9):805-24), и описанный, среди прочего, в патентной публикации США № 20060264451.

В качестве примеров антагонистов CXCR4 на основе хинолина авторы настоящего изобретения могут сослаться на лекарственные средства хлороквины и гидроксихлороквины, такие как NSC56612, описанный среди прочего в Kim JML et al., *PLoS One*. 2012;7(2):e31004.

Среди антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина авторы настоящего изобретения могут сослаться на AMD070, сильный перорально активный антагонист CXCR4. Уникальным структурным признаком этих соединений является присутствие коровой структуры, замещенного (R), (S) или (RS) (N¹-(1H-бензимидазол-2-илметил)-N⁵,6,7,8-тетрагидрохинолин-8-ил-1,4-алкиламина), которая заменяет макроциклическое ядро бицикламов. Он поставляется на рынок компанией AnorMed под наименованием AMD 11070, и его изучают в клиническом исследовании для предотвращения инфекции ВИЧ с Т-тропизмом посредством NIAID (Crawford JB et al. *Org. Process Res. Dev.*, 2008, 12 (5), pp 823-830).

Антагонисты CXCR4 на основе гуанидина описаны, среди прочего, в Wilkinson RA et al. (*Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:255-63) как являющиеся малыми молекулами, содержащими множество групп гуанида или бигуанида. Авторы настоящего изобретения могут сослаться, например, на NB325, например, на полиэтиленгексаметиленбигуанид, описанный в Thakkar N et al. (*Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:631-8); и в Krebs FC et al. (*Biomed Pharmacother*. 2005;59:438-45). Описаны также их производные, как включающие некоторые признаки полиэтиленгексаметиленбигуанида NB325, а также пептид T140, обладающий пятью группами гуанида на боковых цепях остатков аргинина. Другие активные

производные включают в себя, например, фенилгуаниды.

Антагонисты CXCR4 на основе индола описаны также в Ueda S, et al. (Bioorg Med Chem Lett. 2008;18:4124-9) и включают в себя также, например, 5-аминоиндол-2-карбоновую кислоту.

Антагонисты на основе пиримидина описаны, среди прочего, в патентной публикации WO 2010/147094 и в патентной публикации США № 2009/0143302.

TG-0054 описан в Hsu et al (Cell Transplant. 2014 May 12) как пригодная для инъекции малая молекула и сильный избирательный антагонист CXCR4. Он известен также под торговым наименованием буриксафор от TaiGen Biopharmaceuticals Holdings Ltd. и тестирован при множественной миеломе, неходжкинской лимфоме и болезни Ходжкина (идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT01018979).

Другие соединения включают в себя перорально активное низкомолекулярное непептидное соединение KRH-3955, описанное среди прочего в Nakasone T et al., (Med Microbiol Immunol. 2013 Apr;202(2):175-82); блокатор рецептора грелина (D-[Lys3] GHRP-6), описанный в Patel K et al. (Int J Biol Sci. 2012;8:108-17); миметики дикетопиперазина, производные тиазолилзотиомочевины, бензодиазепины и комплексы дипиколиламин-цинк(II).

Композиции и способы для применения в соответствии с настоящим изобретением могут также содержать антагонисты CXCR4 на основе пептидов. Некоторые из этих пептидов описаны, среди прочего, в Costantini S et al. (J Pept Sci. 2014 Apr;20(4):270-8).

В качестве примеров, авторы настоящего изобретения могут сослаться на антагонисты CXCR4 на основе циклических пентапептидов, такие как T22 ([Tyr5,12, Lys7]-полифемузин II), T140 и T134, представляющие собой высоко активные антагонисты CXCR4, описанные в Tamamura H et al. (BBRC, 1998 Dec 30; 253(3):877-82; Bioorg Med Chem Lett. 2001 Feb 12; 11 (3):359-62; FEBS Lett. 2004 Jul 2;569(1-3):99-104). В частности, описано, что четыре аминокислотных остатка являются необходимыми для активности пептида T140: Arg2, L-3-(2-нафтил)аланин3 (Nal3), Tyr5 и Arg14. Обнаружено, что эти ключевые остатки расположены через дисульфидный мостик и закрыты в трехмерной структуре T140. В Tamamura H et al. (FEBS Lett. Volume 550, Issues 1-3, 28 August 2003, Pages 79-83) описаны также аналоги T140, такие как TC14012, TE14005 и TN14003, в качестве антагонистов CXCR4.

Другим циклопентапептидным антагонистом CXCR4, который можно использовать в композициях и способах по настоящему изобретению, является FC131. Этот циклопентапептид обладает следующей формулой: цикло[2-Nal-Gly-D-Tyr-Arg-Arg] (SEQ ID NO: 10), где Nal представляет собой 2-нафтилаланин, Arg представляет собой аргинин, Tyr представляет собой тирозин и Gly представляет собой глицин. В Yoshikawa Y et al. (Bioorg Med Chem Lett. 2012 Mar 15;22(6):2146-50), среди прочего описано, что он является сильным и перорально активным пептидомиметиком - ингибитором CXCR4, и он поставляется на рынок компанией Tocris Bioscience. FC122 описан также как аналог FC131, где остаток аргинина заменен на эпимерный N-метил-D-аргинин. Дополнительные (E)-алкеновые и (Z)-фторалкеновые аналоги F131 и FC122 описаны как антагонисты CXCR4 (Narumi T, et al., Org Biomol Chem. 2010;8:616-21).

Дополнительные антагонисты CXCR4, обладающие циклическими тетрапептидными каркасами, описаны в Tamamura H et al. (J Med Chem. 2005;48:3280-9).

Другие модифицированные пептиды, которые можно использовать в качестве антагонистов CXCR4, включают в себя, например, CTCE-9908, пептид из 17 аминокислот, представляющий собой димер N-концевой последовательности из 8 аминокислот с модификацией Р до G, соединенный лизином в качестве мостика, описанный в Wong et al (BMC Urology, January 2014, 14:12) и поставляемый на рынок компанией Chemokine Therapeutics Corp; POL6326, описанный как являющийся рекомбинантным белком, разработанным посредством миметиков белковых эпитопов в De Nigris F et al. (Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2012 Sep;7(3):251-64), и поставляемый на рынок Polyphor Ltd; LY2510924, описанный в Peng SB et al. (Mol Cancer Ther. 2015 Feb;14(2):480-90); GST-NT21MP, описанный в Galsky MD et al. (Clin Cancer Res. 2014 Jul 1;20(13):3581-8).

В соответствии с настоящим изобретением ингибитор CXCR4 может, кроме того, представлять собой группу на основе антитела, нацеленную против рецептора CXCR4, где группа на основе антитела является способной действовать в качестве антагониста CXCL12. Человеческие моноклональные антитела подробно описаны, среди прочего, в Carnes X et al., J Virol. 2005 Feb; 79(3): 1930-1933 и в патентной публикации США № 2014/0322208. Одним из полностью человеческих моноклональных антител является BMS-936564, (обозначенное F7 в международной публикации WO 2008/060367), а также ранее обозначенное MDX-1338. Многочисленные другие моноклональные антитела нацелены против N-концевой части, внеклеточных петель ECL1, ECL2 или ECL3 из CXCR4. Например, моноклональное антитело против CXCR4 A145 описано как нацеленное против N-конца, в то время как моноклональное антитело A120 нацелено против конформационного эпитопа, состоящего из внеклеточных петель ECL1 и ECL2, и моноклональное антитело mAb A80 нацелено против ECL3 из CXCR4 (Adachi T et al., Retrovirology. 2011 Oct 22;8:84). Другие человеческие антитела против CXCR4 широко представлены на рынке, например, из компаний Thermofisher Scientific, R&D Systems и т.д., и включают в себя моноклональные антитело против CXCR4 12G5, моноклональное антитело 708, моноклональное антитело 716 и моноклональное антитело 717 (поставляемые на рынок компанией R&D Systems под каталожными № MAB170, MAB171,

MAB172 и MAB173), моноклональные антитела 2B11, 44717.111, 44716.111, 44708.111 (R&D Systems, Minneapolis, Minn, см. также Stalmeijer et al, J Virol. Mar 2004; 78(6):2722-2728). Также включены в объем изобретения антагонисты лиганда CXCR4, например антагонисты CXCL12-CX и/или CXCL12-β (SDF-1-α или SDF-1-β)), которые могут включать в себя малые органические или синтетические молекулы, природные продукты, пептиды, белки, пептидомиметики, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, средства на основе нуклеиновой кислоты и т.п. Укороченные варианты, варианты, мутантные белки или "мутеины" SDF-1, обладающие способностью связывать CXCR4 и обладающие антагонистической активностью, также можно использовать для практического осуществления способа по изобретению.

Ингибиторы активности SDF-1 на основе нуклеиновой кислоты также описаны и могут быть использованы в композициях по настоящему изобретению. Эти ингибиторы на основе нуклеиновой кислоты могут функционировать либо на уровне связывания рецептора, либо на уровне экспрессии и трансляции гена. Ингибиторы активности CXCR4 на основе нуклеиновой кислоты включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, ферменты на основе нуклеиновой кислоты (такие как рибозимы), аптамеры нуклеиновой кислоты, антисмысловые нуклеиновые кислоты, и РНКи, так как миРНК. Ингибиторы CXCR4 на основе нуклеиновой кислоты описаны в следующих ссылках: патент США № 6429308B1; патентная публикация США № 2005/0124569A1; патент США № 6916653B2; и патентная публикация США № 2005/0202077. Такие ингибиторы на основе нуклеиновой кислоты могут включать в себя антисмысловой олигонуклеотид, который является комплементарным некоторым частям последовательности оснований хромосомной ДНК и/или РНК, кодирующих белок CXCR4. Антисмысловой олигонуклеотид по настоящему изобретению может представлять собой ДНК или РНК.

Специфический антисмысловой олигонуклеотид может являться комплементарным последовательности оснований, содержащей область иницирующего кодона от +61 до +91, когда точка инициации транскрипции гена для мРНК, кодирующей белок CXCR4, представляет собой +1, и одновременно стабильно гибридизуется с указанной последовательностью специфически и блокирует трансляцию в белок, так что обладает функцией ингибирования биосинтеза белка CXCR4. Альтернативно он может представлять собой миРНК, которая может являться немодифицированной или химически модифицированной, посредством чего применение химически модифицированной миРНК улучшает различные свойства нативных молекул миРНК посредством увеличенной устойчивости к деградации нуклеазами *in vivo* и/или посредством улучшенного поглощения клетками, как разработано в патентной публикации США № 2005/0202077. В объем изобретения включены также мРНК, кодирующие белки CXCR4, которые можно расщеплять рибозимами типа головки молотка, так чтобы эффективно блокировать продукцию этих белков, как описано в патенте США № 6916653 B2. Кроме того, в объем изобретения включены миРНК, которые можно эффективно применять в композициях, чтобы включать последовательности миРНК, соответствующие последовательностям-мишеням, представленным в SEQ ID NO: 101-823 из патентной публикации США № 2005/0202077.

По другому варианту осуществления композиции и способы для применения по настоящему изобретению, антагонисты рецептора хемокинов CCR2 предотвращают биологические функции или биологическую активность, ассоциированные с CCR2, его изоформами или вариантами, включая CCR2A или CCR2B, в фибробlastах, экспонирующих рецептор, или антагонисты, которые связывают MCP-1/CCL2 или CCR2 или которые предотвращают связывание CCR2 с его родственными лигандом(лигандами) и, таким образом, ингибируют биологические функции CCR2. В частности, антагонисты CCR2 могут ингибировать связывание одного или нескольких лигандов (например, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, CCL2, CCL8, CCL16 и т.п.) с CCR2 и/или ингибировать передачу сигнала, опосредуемую через CCR2 (например, обмен ГДФ/ГТФ посредством ассоциированных с CCR2 белков G, внутриклеточный поток кальция), таким образом, ингибируя опосредуемые CCR2 процессы и ответы и функции клеток.

Молекулы, которые могут являться антагонистами одной или нескольких функций CCR2, хорошо известны в данной области. В частности, несколько активных, перорально биодоступных малых молекул-антагонистов рецептора CCR2 вошли в стадию разработки лекарственных средств при различных показаниях.

В качестве примеров авторы настоящего изобретения могут сослаться на малую молекулу, поставляемую на рынок компанией AstraZeneca, обозначенную AZD2423 и описанную среди прочего в Kalliomaki et al., (Pain 2013 25 May; 154(5):761-7); малую молекулу, разработанную компанией UCB Research под наименованием UCB102405 и описанную, среди прочего, в Higgins PJ et al. (Progress in inflammation research, Vol. 2, 2007, pages 115-123); антагонист, разработанный в Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C. под наименованием JNJ-17166864 (идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT00604123, а также описанный в публикации Anti-Inflammatory Drug Discovery edited by Jeremy I. Levin, Stefan Laufer, Page 378); RS 504393 (Mirzadegan et al, August 18, 2000 The Journal of Biological Chemistry, 275, 25562-25571), гидрохлорид RS 102895 (Seok et al, Nephrol. Dial. Transplant. 2013 Jul;28(7):1700-10); антагонисты CCR2 на основе производных пиперазина, разработанные компанией Teijin и описанные среди прочего в международной публикации WO 97/44329.

В корпорации Incyte также разработаны многочисленные низкомолекулярные антагонисты CCR2

под наименованием INCB-8696 (Matera et al., Expert Opin. Emerging Drugs (2012) 17(1):61-82); производное пиридинилциклогексил-3-пирролидинила INCB-3284 (Xue CB et al., ACS Med. Chem. Lett., 2011, 2(6), pp450-454); производное бензодиоксолгидроксициклогексила INCB3344 (Brodmerkel C Met al., J. Immunol. 2005 Oct 15;175(8):5370-8.), несколько серий антагонистов CCR2 на основе (S)-3-аминопирролидина под наименованием PF-4136309 или INCB8761 (Xue CB et al., ACS Med Chem Lett. 2011 Oct 5;2(12):913-8); димезилат INCB3284 (McMillin et al., J Neuroinflammation. 2014 Jul 10; 11:121).

Авторы настоящего изобретения могут также сослаться на малую молекулу CCX140-B, разработанную в ChemoCentryx (De Zeeuw D et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2015 Sep;3(9):687-96); производное D-эритропентитола MK-0812, разработанное компанией Haihang Industry Co., Ltd. (Wisniewski T et al., J Immunol Methods. 2010 Jan 31;352(1-2):101-10).

В компании Pfizer разработан антагонист CCR2 под наименованием PF-04634817 (идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT01994291), а также ингибиторы CCR2 на основе амида гексановой кислоты, описанные, среди прочего, в международной публикации WO 98/38167.

В компании Bristol-Myers Squibb разработано соединение BMS-741672 на основе лактама (идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT00699790) и другой антагонист, обозначенный BMS-813160 или (S)-1-[(1S,2R,4R)-4-изопропил(метил)амино]-2-пропилциклогексил]-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-2-он (идентификатор в ClinicalTrials.gov: NCT01752985); BMS CCR2 22 (Kredel et al., J Biomol. Screen. 2011 Aug; 16(7):683-93).

Несколько соединений тетрагидропиранилциклопентилтетрагидропиридопиридина описаны в качестве антагонистов CCR2 и разработаны в компании Merck, и в частности [(3S,4S)-3-метокситетрагидро-2H-пиран-4-ил]амин-(1R,3S)-3-изопропил-3-{[3-(трифторметил)-7,8-дигидро-1,6-нафтиридин-6(5H)-ил]карбонил} циклопентила), описанный среди прочего в международной публикации WO 2005044264. В Merck разработаны также антагонисты CCR2 на основе 3-арилпиперидина, как описано в международной публикации WO 98/31364.

Несколько других малых молекул описаны и включают в себя 3-[(3S,4R)-1-((1R,3S)-3-изопропил-2-оксо-3-{[6-(трифторметил)-2H-1,3-бензоксазин-3(4H)-ил]метил} циклопентил)-3-метилпиперидин-4-ил]бензойную кислоту; (3S,4S)-N-((1R,3S)-3-изопропил-3-{[7-(трифторметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1B)-ил]карбонил} циклопентил)-3-метилтетрагидро-2H-пиран-4-аминий; 3-[(3S,4R или 3R,4S)-1-((1R,3S)-3-изопропил-3-{[6-(трифторметил)-2H-1,3-бензоксазин-3(4H)-ил]карбонил} циклопентил)-3-метилпиперидин-4-ил]бензойную кислоту, и представлены в Brodmerkel et al., (J. Immunol, 2005, 175:5370-7378) и в международной публикации WO 2012138880.

Многочисленные другие производные описаны в качестве антагонистов CCR2. В качестве примеров, авторы настоящего изобретения могут сослаться на производные пиперидинила (WO 2012075115), производные диазепамы (WO 2011048032), производные циклогексана (WO 2010121046), производные карбоксамида (WO 2010070032), производные циклопентила/циклогексила (WO 2013152269), бициклические гетероциклы (WO 2011042399), производные индола (WO 2012125662), меркапто-производные (WO 2005118578), производные дипиперидина (WO 2006036527), гетероарилсульфонамиды (US 20100056509), конденсированные с гетероарилом пиридином и с фенилом бензолсульфонамиды (WO 2009009740).

Несколько пептидов - антагонистов CCR2 также разработаны и описаны, среди прочего, в международной публикации WO 2013000922. В качестве примеров авторы настоящего изобретения могут сослаться на гептапептид LGTFLKC, называемый "ECL1 (C) inverso", "ECL1 (C)", обладающий аминокислотной последовательностью SKLFTGL, "ECL2 (N)", обладающий аминокислотной последовательностью LFTKC (SEQ ID NO: 2), "ECL2 (N) inverso", обладающий аминокислотной последовательностью SKTFL (SEQ ID NO: 3), "ECL3 (C)", обладающий аминокислотной последовательностью HTLMRNL (SEQ ID NO: 4) "ECL3 (C) inverso", обладающий аминокислотной последовательностью LNRMLTH (SEQ ID NO: 5), "ECL3 (N)", обладающий аминокислотной последовательностью LNTFQEF (SEQ ID NO: 6), "ECL3 inverso", обладающий аминокислотной последовательностью FEQFTNL (SEQ ID NO: 7), и/или пептиды, содержащие последовательность Thr-Phe-Leu-Lys (SEQ ID NO: 8).

Альтернативно антагонисты CCR2 могут представлять собой антитела и фрагменты антител против CCR2. Ряд антител против CCR2 известны в данной области и коммерчески доступны. В компании Biolegend разработано несколько антител против CD192 CCR2 человека (см. <http://www.biolegend.com/cd192-ccr2-antibodies-6166/>). Авторы настоящего изобретения могут также сослаться, в частности, на моноклональные антитела против CCR2 1D9 (ATCC HB-12549), 8G2 (ATCC HB-12550), LS132, описанное в международной публикации WO 01/57226, блокирующее CCR2 человека антитело, такое как MLN1202 (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA), или человеческое антитело, нейтрализующее CCL2 человека, например, карлумаб (CNTO 888; Centocor, Inc.), описанное в Loberg et al., Cancer. Res. 67(19):9417 (2007).

В объем изобретения включены также антагонисты лиганда CCR2, например MCP-1 (CCL2), CCL7 и/или CCL13.

Такие антагонисты могут представлять собой антитела против MCP-1, хорошо известные и хорошо описанные в литературе. В качестве антител против MCP-1 авторы настоящего изобретения могут со-

слаться на антитела, способные связывать множество бета-хемокинов, включая MCP-1, описанное в (WO 03048083) и связывающее MCP-1 антитело, которое также связывает эотаксин (US 20040047860). Антитела, которые избирательно связывают и нейтрализуют мышинные гомологи MCP-1/CCL2 человека или MCP-1/CCL2 человека, подобно антителу против MCP-1/CCL2 человека, обозначенному C775, описанному в US 20090297502, а также антителу против MCP-1/CCL2 человека, обозначенному CNT0888 (WO 2006125202).

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать укороченные варианты, варианты, мутантные белки или "мутеины" MCP-1/CCL2, обладающие способностью связывать CCR2 и обладающие антагонистической активностью. Варианты формирующих гомодимеры хемокинов, таких как CCL2, обладающие одиночной заменой аминокислоты на поверхности димеризации, которая изменяет паттерн водородных связей, так что это приводит к облигатному мономеру, который связывается с рецептором и обладает свойствами агониста *in vitro*, но может являться антагонистом для природных хемокинов и обладать противовоспалительной активностью *in vivo*, как объяснено в международной публикации WO 05037305 A1, присутствуют среди вариантов, которые можно использовать в осуществлении настоящего изобретения на практике. Пептидный антагонист MCP-1 представляет собой укороченный MCP-1 (9-76) (Jiang-Hong Gong, et al, J. Exp. Med. 1997, 186: 131).

Антагонисты лиганда CCL7 и CCL13 включают в себя малые органические или синтетические молекулы, природные продукты, пептиды, белки, пептидомиметики, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, средства на основе нуклеиновой кислоты и т.п. Пептидные антагонисты CCL7 и/или CCL13 могут, как правило, представлять собой фрагменты CCL7 и/или CCL13, конкурирующие с полноразмерным CCL7 и/или с полноразмерным CCL13 для связывания с CCR2 и, таким образом, являющиеся антагонистами CCL7 и/или CCL13. С использованием известных способов и на основании знаний о последовательности CCL7 можно разрабатывать молекулы двухцепочечной РНК (дцРНК) или одноцепочечной антисмысловой РНК для проявления антагонизма к мишени посредством нацеливания на ее РНК на основании гомологии последовательности. Такие дцРНК или оцРНК могут, как правило, представлять собой малые интерферирующие РНК (миРНК), как правило, в конфигурации стебель-петля ("шпилька"), или микро-РНК (мкРНК). Последовательность такой дцРНК или оцРНК может содержать часть, соответствующую части мРНК, кодирующей мишень. Эта часть, как правило, может являться на 100% комплементарной части-мишени внутри мРНК-мишени, но можно использовать также более низкие уровни комплементарности (например, 90% или более, или 95% или более).

В качестве антагонистов CCL7 авторы настоящего изобретения могут сослаться на антитела против CCL7, обладающие свойствами антагонизма (блокирования) CCL7. Предпочтительными антагонистами являются моноклональные антитела, специфически узнающие эпитоп внутри CCL7 и блокирующие активность CCL7, в частности взаимодействие между CCR2 и CCL7. Специфические моноклональные антитела против CCL7 могут включать в себя моноклональное антитело против CCL7, поставляемое на рынок компанией Pierce antibodies под наименованием CCL7 antibody h.mcp.3; рекомбинантный белок CCL7/MCP3 человека, поставляемый на рынок компанией Sino Biological Inc. (каталожный # 11926-H08E); и антитело против CCL7, поставляемое на рынок компанией Labome под наименованием MA1-21385.

В качестве антагонистов лиганда CCL13 авторы настоящего изобретения могут сослаться на антитела против CCL13, такие как антитела от Novus, Origene, Labome, Sigma Aldrich и т.д. Моноклональные антитела против CCL13 включают в себя H00006357-M03 (Abnova), антитело против MCP-4/CCL13 8C12 (Pierce Antibodies), антитело против MCP-4/CCL13 3G4 (Pierce Antibodies), антитело против CCL13/MCP-4 человека (R&D systems) и т.д.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления, композиции и способы для применения по настоящему изобретению включают в себя антагонисты рецептора хемокинов CCR3, предотвращающие одну или несколько биологических функций или биологическую активность, ассоциированные с CCR3. Такой антагонист функции CCR3 может ингибировать связывание одного или нескольких лигандов (например, CCL11, CCL26, CCL7, CCL13, CCL15, CCL24, CCL5, CCL28, CCL18) с CCR3 и/или ингибировать передачу сигнала, опосредованную через CCR3. Соответственно опосредованные CCR3 процессы и ответы, и функции клеток можно ингибировать посредством антагонистов CCR3. Как применяют в настоящем документе, "CCR3" относится к природному рецептору 3 хемокинов CC (например, CCR3 млекопитающих (например, CCR3 человека (*Homo sapiens*))) и включает в себя природные варианты, такие как аллельные варианты и варианты сплайсинга.

Многочисленные молекулы описаны в данной области в качестве антагонистов одной или нескольких функций рецептора CCR3.

Композиции и способы для применения в соответствии с настоящим изобретением могут включать в себя антагонисты CCR3 на основе малых молекул. В качестве примеров авторы настоящего изобретения могут сослаться на низкомолекулярные антагонисты CCR3, такие как кандидат GW776994 для перорального введения, разработанный в GSK (Neighbour H et al., Clin Exp Allergy. 2014 Apr;44(4):508-16), замещенное бензилпиперидином производное арилмочевины DPC-168 (Pruitt JR et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 07/2007), соединение (S)-метил-2-нафтоиламино-3-(4-нитрофенил)пропионат, поставляемое на рынок компанией Calbiochem под наименованием SB328437 и описанное, среди проче-

го, в Mori A et al., (Int Immunol. 2007 Aug;19(8):913-21), а также этиловый сложный эфир N-бензоил-4-нитроанилина SB297006, описанный также в Mori A. et al., (Int Immunol. 2007 Aug; 19(8):913-21), малые молекулы, разработанные в AstraZeneca, такие как AZD1744 (Neighbour H. et al., Current Opinion in Drug Discovery & Development 2010 13(4):414-427) и AZD 3778 (Greiff L. et al., Respir Res. 2010 Feb 9;11:17), транс-1,2-дизамещенное производное циклогексана, разработанное в Bristol-Myer Squib под наименованием BMS639623 и описанное в Santella JB et al., (Bioorg Med Chem Lett. 2008 Jan 15;18(2):576-85), пероральный антагонист YM-344031, описанный, среди прочего, в Suzuki K et al., (BBRC 2006 Jan 27;339(4):1217-23); A-122058, как описано в Neighbour H et al., (Current Opinion in Drug Discovery & Development 2010 13(4):414-427); (S)-N-((1R,3S,5S)-8-((6-фторнафтален-2-ил)метил)-8-азабицикло[3,2,1]октан-3-ил)-N-(2-нитрофенил)пирролидин-1,2-дикарбоксамид, (R)-1-(1-((6-фторнафтален-2-ил)метил)пирролидин-3-ил)-3-(2-(2-гидроксиэтокси)фенил)мочевину; соединение на основе морфолинацетамида, такое как 4-[[[(2S)-4-[(3,4-дихлорфенил)метил]-2-морфолинилметиламинокарбонил]аминометилбензамид; и соединение на основе морфолинмочевины N-[[[(2S)-4-[(3,4-дифторфенил)метил]-2-морфолинил]-метил]-3-[(метилсульфонил)амино]бензолацетамид.

Другие хорошо известные антагонисты CCR3 включают в себя производные 2-меркаптобензотиазола, производные арил- или фенилсульфонамида (WO 2012051090), соединенные мостиком производные бициклического амина (WO 2004076448), производные диазепамы (WO 2011048032), замещенные пиперидины (WO 2010115836), производные пирролидинилалкиламида (WO 2010013078) бициклические гетероциклы (WO 2011042399), производные пиперидила (WO 2008049874), производные аминокламида (WO 2007034251), производные имидазола (WO 2007025751), производные азетидина (WO 03077907), производные пирана (WO 2010069979), замещенные производные пиримидина (WO 2004004731) или производные морфолинила (WO 03099798).

Антагонисты CCR3 на основе антител также разработаны и включают в себя, например, антитело с PE против CD193 человека (CCR3), доступное из компании Biolegend, антитела против CCR3 ab32512, ab36827, ab36829, ab36827, ab1667, ab16231, ab157139, доступные из Abcam, Y31 от OriGene, eBio5E8-G9-B4 от eBioscience, MAb против CCR3 человека (клон 61828) от R&D systems. См. также патенты США № 6806061 и 6207155, и опубликованные патентные заявки США № 20050191702, 20050069955 и 20020147312 по поводу иллюстративных антител, которые специфически связывают и ингибируют рецептор CCR3, и в патентах США № 6946546 и 6635251, а также опубликованные патентные заявки США 20040191255 и 20040014132 по поводу иллюстративных антител.

Дополнительные соединения для ингибирования рецептора CCR3 включают в себя аптамеры на основе РНК, ДНК или РНК/ДНК, нацеленные против CCR3. В частности, аптамеры описаны в патентах США № 5270163, 5840867, 6180348 и 6699843. Другие соединения для ингибирования рецептора CCR3 включают в себя антисмысловые олигонуклеотиды или миРНК, нацеленные против CCR3, эотаксина-1, эотаксина-2 или эотаксина-3, включая антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные против рецептора CCR3, такие как описанные в патенте США № 6822087.

Антагонисты CCR3 на основе пептидов можно получать из фаговой библиотеки, например, такие как, пептид CPWYFWPC (SEQ ID NO: 9) как описано в Houimel M et al. (Eur. J. Immunol. 2001 Dec; 31(12):3535-45) или пептидные аналоги CCR3, как описано в международной публикации WO 1999043711.

В объем изобретения включены также антагонисты лиганда CCR3, например, такие как антагонисты CCL11, которые могут включать в себя малые органические или синтетические молекулы, природные продукты, пептиды, белки, пептидомиметики, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, средства на основе нуклеиновой кислоты и т.п. Укороченные варианты, варианты, мутантные белки или "мутеины" CCL11, обладающие способностью связывать CCR3 и обладающие антагонистической активностью, также можно использовать для осуществления способа по изобретению на практике. Особенно предпочтительным антагонистом CCR3 является производное нафталинилкарбонила SB 328437.

Антагонисты CCR2, CCR3 и/или CXCR4, пригодные для использования в соответствии с настоящим изобретением, можно вводить отдельно, но, как правило, их вводят для терапии человека, в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем, разбавителем или носителем, выбранным принимая во внимание намеченный способ введения и стандартную фармацевтическую практику. Такой фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель может присутствовать в количестве между 0,1 и менее 100% по массе. Оптимизация соотношений лекарственное средство-наполнитель доступна специалисту в данной области, например, желательное массовое отношение лекарственное средство/наполнитель в композиции может быть меньшим или равным соотношению растворимостей лекарственного средства/наполнителя, в подходящей среде.

Таким образом, композиции в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляют собой фармацевтические композиции для применения в способе лечения и/или предотвращения COPD и AECOPD и, таким образом, содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного антагониста или ингибитора пар рецептор/лиганд CCR2/CCL2, CCR2/CCL7, CCR2/CCL13, CXCR4/CXCL12 и/или CCR3/CCL11 и фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции являются эффективными для уменьшения привлечения и миграции фиброцитов, ассоцииро-

ванных с COPD и модулируемых посредством CCR2, и/или CCR3, и/или CXCR4.

Терапевтически эффективное количество представляет собой predetermined количество, достаточное для достижения эффективной системной концентрации или местной концентрации в ткани и желательного действия, т.е. ингибирования или блокирования/антагонизма одной или нескольких из вышеуказанных пар рецептор/лиганд. Конкретную дозу соединения, вводимую по этому изобретению для получения терапевтических и/или профилактических эффектов, может, естественно, определять терапевт в зависимости от состояния пациентов, массы, возраста и пола, вводимого соединения, способа введения и т.д.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить орально, буккально или подъязычно, и они могут находиться в форме таблеток, капсул (включая мягкие желатиновые капсулы), множества частиц, гелей, пленок, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать вкусовые вещества или красители, для способов доставки с немедленным, отложенным, модифицированным, замедленным, двойным, контролируемым высвобождением или пульсирующей доставки. Такие соединения также можно вводить посредством быстро диспергируемых или быстро растворимых лекарственных форм, или в форме высокоэнергетической дисперсии, или в форме покрытых частиц. Подходящие фармацевтические составы могут находиться в покрытой или непокрытой форме, как желательно.

Такие фармацевтические композиции, например таблетки, могут содержать наполнители, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция, глицин и крахмал, дезинтегрирующие средства, такие как гликолят крахмала натрия, кроскармеллоза натрия и конкретные комплексные силикаты, и связующие вещества для грануляции, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), гидроксипропилметилацетат-сукцинат целлюлозы (HPMCAS), сахароза, желатин и гуммиарабик. Кроме того, можно включать смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк. Твердые композиции сходного типа можно также применять в качестве наполнителей в желатиновых капсулах или капсулах HPMC. Наполнители в отношении этого включают в себя лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров антагонисты CCR2, CCR3 и/или CXCR4 можно комбинировать с различными подсластителями или ароматизаторами, окрашивающими веществами или красителями, с эмульгирующими и/или суспендирующими средствами и с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин и их сочетания.

Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и пульсирующим высвобождением могут содержать наполнители, такие как наполнители, подробно описанные для лекарственных форм с немедленным высвобождением, вместе с дополнительными наполнителями, которые действуют как модификаторы скорости высвобождения, покрывающими устройство и/или включенные в конструкцию устройства. Модификаторы скорости высвобождения включают в себя, но без исключительного ограничения, HPMC, HPMCAS, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу, ацетат целлюлозы, полиэтиленоксид, ксантановую смолу, карбомер, сополимер аммонийметакрилата, гидрогенизированное касторовое масло, карнаубский воск, парафиновый воск, ацетат-фталат целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сополимер метакриловой кислоты и их смеси. Лекарственные формы с модифицирующим высвобождением и пульсирующим высвобождением могут содержать один или комбинацию наполнителей, модифицирующих скорость высвобождения. Наполнители, модифицирующие скорость высвобождения, могут присутствовать как внутри лекарственной формы, т.е. внутри матрикса, и/или на лекарственной форме, т.е. на поверхности или в покрытии.

Быстро диспергируемые или быстро растворимые лекарственные формы (FDDF) могут содержать следующие ингредиенты: аспартам, ацесульфам калия, лимонную кислоту, кроскармеллозу натрия, крошпидон, диаскорбиновую кислоту, этилакрилат, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилметилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, метилметакрилат, мятное вкусовое вещество, полиэтиленгликоль, высокодисперсный диоксид кремния, диоксид кремния, натриевую соль гликолята крахмала, стеарилфумарат натрия, сорбит, ксилит. Термины диспергируемые или растворимые, как применяют в настоящем документе для описания FDDF, зависят от растворимости используемого вещества лекарственного средства, т.е. в случаях, когда вещество лекарственного средства является нерастворимым, можно получать быстро диспергируемую лекарственную форму, и в случаях, когда вещество лекарственного средства является растворимым, можно получать быстро растворимую лекарственную форму.

Композиции и способы для применения в соответствии с настоящим изобретением можно вводить парентерально, например интракавернозно, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интра-текально, интравентрикулярно, интрауретрально, интратерально, интракраниально, внутримышечно или подкожно, или их можно вводить посредством инфузии или безыгольными способами. Для такого парентерального введения их лучше всего использовать в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например достаточное количество соли или глюкозы для получения раствора, изотонического с кровью. Водные растворы следует подходящим образом забуферивать (предпочтительно, до pH приблизительно от 3 до 9) при необходимости. Получение подходящих парентеральных составов в стерильных условиях легко осуществлять стандартными фармацевтическими способами, хорошо известными специалистам в данной области.

Для орального и парентерального введения пациентам ежесуточный уровень дозирования антагонистов CXCR4, CCR2 и/или CCR3 может являться таким, как определил терапевт, и может меняться в зависимости от возраста, массы и ответа конкретного пациента. Доза может представлять собой однократную дозу, дробную ежесуточную дозу или множественные ежесуточные дозы. Альтернативно непрерывное дозирование, например, такое как дозирование посредством лекарственной формы с контролируемым (например, замедленным) высвобождением, можно проводить на ежесуточной основе или в течение более чем одних суток за один раз.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением можно вводить интраназально или посредством ингаляции, и в целях удобства их доставляют в форме ингаляции сухого порошка или аэрозольного спрея, поставляемых из находящихся под давлением контейнера, насоса, распылителя или ингалятора с применением подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, гидрофторалкана, такого как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134A(TM) или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан (HFA 227EA(TM)), диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единицу дозирования можно определять посредством предоставления клапана для доставки дозированного количества. Находящиеся под давлением контейнер, насос, распылитель или ингалятор могут содержать раствор или суспензию активного соединения, например с использованием смеси этанола и пропеллента в качестве растворителя, которые могут, кроме того, содержать смазывающее вещество, например, триолеат сорбитана. Капсулы и картриджи (желатиновые капсулы) для применения в ингаляторе или инсуффляторе можно составлять, чтобы они содержали порошкообразную смесь соединения по изобретению и подходящей порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал.

Аэрозольные или сухие порошкообразные составы предпочтительно составляют так, чтобы каждая отмеренная доза или "выпуск" содержали терапевтически эффективное количество антагонистов CXCR4, CCR2 и/или CCR3 для доставки пациенту, подлежащему лечению. Общая ежесуточная доза в аэрозоле может лежать в диапазоне от 1 до 50 мг, который можно вводить в однократной дозе или, более обычно, в дробных дозах на всем протяжении суток. Антагонисты CXCR4, CCR2 и/или CCR3, пригодные для использования в соответствии с настоящим изобретением, также можно составлять для доставки посредством распылителя. Составы для распыляющих устройств могут содержать следующие ингредиенты в качестве солюбилизаторов, эмульгаторов или суспендирующих средств: воду, этанол, глицерин, пропиленгликоль, низкомолекулярные полиэтиленгликоли, хлорид натрия, фторуглероды, простые эфиры полиэтиленгликоля, триолеат сорбитана и олеиновую кислоту.

Антагонисты CXCR4, CCR2 и/или CCR3, пригодные для использования в соответствии с настоящим изобретением, также можно использовать в комбинации с циклодекстрином. Известно, что циклодекстрины формируют инклюзионные и неинклюзионные комплексы с молекулами лекарственного средства. Формирование комплекса лекарственное средство - циклодекстрин может модифицировать растворимость, скорость растворения, и биодоступность и/или стабильность свойств молекулы лекарственного средства. Комплексы лекарственное средство - циклодекстрин в основном являются полезными для большинства лекарственных форм и способов введения. В качестве альтернативы прямому образованию комплексов с лекарственным средством, циклодекстрин можно использовать в качестве вспомогательной добавки, например в качестве носителя, разбавителя или солюбилизатора. Альфа-, бета- и гамма-циклодекстрины представляют собой некоторые из большинства общеупотребительных циклодекстринов, и подходящие примеры описаны в публикациях PCT WO 91/11172, WO 94/02518 и WO 98/55148. В соответствии с настоящим изобретением пероральное введение является предпочтительным способом.

В условиях, когда реципиент страдает от нарушения глотания или от нарушения абсорбции лекарственного средства после перорального введения, лекарственное средство можно вводить парентерально, подкожно или буккально. В случае когда средство является перорально неактивным, тогда можно применять парентеральное введение.

Другие возможные составы, такие как наночастицы, липосомы и системы на иммунологической основе, также можно использовать для введения подходящей дозы композиций антагонистов в соответствии с настоящим изобретением.

Антагонисты рецепторов CXCR4, CCR2 и/или CCR3 можно вводить отдельно или в любом их сочетании. Кроме того, антагонисты CXCR4, CCR2 и/или CCR3 можно вводить отдельно или в любом их сочетании в смысле времени, то есть их можно вводить одновременно, до и/или после друг друга. В соответствии с описанием, представленным в настоящем документе, антагонисты CXCR4, CCR2 и/или CCR3 можно использовать для уменьшения и/или ингибирования миграции и дифференцировки фиброцитов и, таким образом, можно использовать для лечения и/или предотвращения COPD, а также AECOPD.

Настоящее изобретение также относится к наборам или фармацевтическим упаковкам, включающим соответствующие дозы антагонистов или композиций CXCR4, как описано выше, для применения в способе для предотвращения и/или лечения COPD и AECOPD. В дополнение к композициям в форме, например, таблеток, капсул или лиофилизированных порошков, наборы или фармацевтические упаковки могут включать инструкции для применения и введения композиции для предотвращения и/или лечения COPD и AECOPD. Такие наборы или упаковки можно предоставлять в бутылки или в другой пригодной

форме (например, в блистерной упаковке). Необязательно наборы или фармацевтические упаковки могут также включать другие фармацевтически активные средства и/или материалы, применяемые при введении лекарственного средства(средств), такие как разбавители, иглы, шприцы, аппликаторы и т.п.

В частности, фармацевтические композиции и наборы в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в сочетании с другими фармацевтически активными средствами, например, такими как бронхорасширяющие средства (LABA, LAMA), кортикостероиды и/или ингибиторы фосфодиэстеразы, либо перорально, либо посредством ингаляции.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу супрессии пролиферации, миграции и дифференцировки фиброцитов, опосредуемых и/или модулируемых посредством CXCR4, CCR2 и/или CCR3, у субъекта, имеющего COPD или AECOPD, или подверженного риску развития COPD или AECOPD, включающему в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, как описано выше.

На всем протяжении этого описания различные ссылки обозначают и описывают эти публикации, полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки в этом описании для более полного описания существующего уровня техники в области, к которой относится это изобретение.

Примеры

Пример 1. Включение субъектов в исследование.

Субъекты в возрасте более 40 лет являются подходящими для включения, если они имели клинический диагноз обострение COPD в соответствии с руководством GOLD (Gold 1998. Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких. Публикация NIH - обновлено в 2011). Пациентов с COPD с обострением регистрировали во время госпитализации в отделении интенсивной терапии или в качестве амбулаторных пациентов в центре клинических исследований CHU de Bordeaux. Регистрировали 48 здоровых добровольцев без какого-либо заболевания легких в анамнезе и с нормальной функцией легких при тестировании. Субъектов разделяли на 2 подгруппы в соответствии с курением в анамнезе (никогда не курившие, бывшие курильщики или курящие в настоящее время) и подбирали им пары из пациентов в соответствии с возрастом и полом.

Основными критериями исключения для пациентов с COPD и здоровых субъектов являлись астма, фиброз легких, идиопатическая легочная гипертензия и хронические вирусные инфекции (гепатит, ВИЧ). Пациентов с COPD с обострением и контрольных субъектов регистрировали для исследования "Firebrob". Кроме того, пациентов с COPD, не имеющих обострения в течение минимального периода один год, также регистрировали в качестве амбулаторных пациентов в центре клинических исследований CHU de Bordeaux (исследование "Cobra"). Они обозначены как "пациенты с COPD без обострения" в следующем тексте. Все субъекты предоставляли письменное информированное согласие. Протокол исследования был одобрен местным комитетом по этике в научных исследованиях и Французским национальным агентством по безопасности лекарственных средств и товаров медицинского назначения.

Пример 2. Дизайн исследования "Firebrob".

Исследование проводили в группах центров клинических исследований в течение 3 лет. Сущность исследования представлена на фиг. 1. Исследование зарегистрировано под № NCT01196832 в ClinicalTrials.gov (т.е. исследование "Firebrob").

Присутствовали два осмотра для пациентов с COPD с обострением: осмотр во время обострения (включение, V1), осмотр через два месяца ± 7 суток после обострения (стабильное состояние, V2). Осмотр для включения (V1) состоял из предоставления информации и подписания информированного согласия, забора образца крови (50 мл) для анализа фиброцитов. Второй осмотр (V2) состоял из клинической и функциональной оценки (плетизмография, TLCО, анализ газов артериальной крови) и забора образца крови для анализа фиброцитов. Присутствовал один осмотр для контрольных субъектов и "пациентов с COPD без обострения", во время которого было подписано информированное согласие, проводили клиническую и функциональную оценку (плетизмографию, TLCО, анализ газов артериальной крови) и отбирали образец крови для анализа фиброцитов.

Пример 3. Дизайн исследования "Cobra".

Присутствовал один осмотр для "пациентов с COPD без обострения", во время которого было подписано информированное согласие, проводили клиническую и функциональную оценку (плетизмографию, TLCО, анализ газов артериальной крови) и отбирали образец крови для анализа фиброцитов.

Исследование зарегистрировано под № CPP 0811738 (т.е. исследование "Cobra").

Пример 4. Подсчет фиброцитов.

Проводили очистку неадгерентных не относящихся к Т (NANT) клеток. Кратко, мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли из цельной крови посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипак. После первого центрифугирования при 150 g в течение 15 мин верхний слой плазмы собирали и сохраняли при -80°C для дальнейшего анализа. Мононуклеарные клетки на поверхности раздела собирали, промывали один раз с использованием 1X PBS. Лизис эритроцитов проводили посредством добавления 20 мл гипотонического раствора 0,2% NaCl в течение 30 с, с последующим добавлением 20 мл 1,6% NaCl, чтобы закончить с изотоническим раствором. Мононуклеарные

клетки снова промывали с использованием 1X PBS, ресуспендировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), 4,5 г/л глюкозы, L-глутамин, дополненной 20% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), пенициллином/стрептомицином и не являющимися необходимыми аминокислотами для MEM, и инкубировали 1 ч при 37°C. Отбирали фракцию неадгерентных мононуклеарных клеток и промывали холодным 1X PBS 0,5% BSA, 2 mM ЭДТА. Т-клетки далее истошали с использованием моноклонального антитела против CD3 (Miltenyi Biotech). По меньшей мере $0,2 \times 10^6$ неадгерентных не относящихся к Т (NANT) клеток распределяли в каждой пробирке для FACS и фиксировали в течение ночи с использованием Cytofix/Cytoperm (eBioscience).

Пример 5. Идентификация и характеристика циркулирующих фиброцитов.

Фиброциты идентифицировали посредством проточной цитометрии как двойные положительные по поверхностному маркеру CD45 и внутриклеточному маркеру коллагену I. Фиксированные клетки крови NANT промывали в буфере для пермеабиллизации (eBioscience) и инкубировали либо с антителами мыши против коллагена I человека (Millipore Кат. □ MAB3391, RRID:AB_94839), либо с совпадающим по изотипу контрольным IgG1 (Santa Cruz Biotechnology Кат. □ sc-3877, RRID:AB_737222), затем с конъюгированными с флуоресценцизотиоцианатом (FITC) антителами против антител мыши (Beckman Coulter Кат. □ IM0819). Затем осадок клеток инкубировали либо с конъюгированными с аллофикоцианином (APC) антителами против CD45 (BD Biosciences Кат. □ 555485, RRID:AB_398600), либо с конъюгированным с APC, совпадающим по изотипу контрольным IgG1 (BD Biosciences Кат. □ 555751, RRID:AB_398613). Суспензию клеток анализировали с использованием проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA). Анализ без подключения к сети Интернет проводили с использованием программного обеспечения FACSDiva. Порог для отрицательного определения CD45 устанавливали с использованием конъюгированного с APC совпадающего по изотипу контрольного IgG1, и все последующие образцы ограничивали положительной по CD45 областью. Клетки, ограниченные по CD45, анализировали по экспрессии коллагена-1, где пороги для отрицательного контроля устанавливали с использованием окрашенных FITC клеток. Специфическое окрашивание по коллагену-1 определяли как увеличение количества положительных событий по сравнению с этим порогом. Количество фиброцитов выражали как процент от общего количества PBMC.

Пример 6. Миграция фиброцитов.

Миграцию фиброцитов оценивали с использованием модифицированного анализа в камере Бойдена. Вставки transwell (размер пор 8 мкм) и лунки покрывали в течение 1 ч при комнатной температуре полилизин-этиленгликолем (PEG-PLL, Susos) для предотвращения адгезии клеток. Вставки и лунки промывали с использованием PBS. $0,3 \times 10^6$ неадгерентных не относящихся к Т (NANT) клеток ресуспендировали в 0,2 мл DMEM, 4,5 г/л глюкозы, L-глутамин, дополнительную DMEM, 4,5 г/л глюкозы, L-глутамин, дополненную ITS, пенициллином/стрептомицином и не являющимися необходимыми аминокислотами для MEM, добавляли в верхний отдел каждой лунки. Где указано, клетки NANT предварительно обрабатывали в течение 1 ч при 37° с использованием 25 мкг/мл плериксафора (Sigma-Aldrich) или 10 мкМ SB 328437 (R&D Systems) перед добавлением в верхний отсек. Рекombинантный CXCL12 человека (от 25 нг/мл до 200 нг/мл; R&D Systems), рекombинантный CCL11 человека (от 25 до 200 нг/мл; R&D Systems) или плазму (в разведении 50%), выделенную из крови, полученной от пациента с COPD на VI или контрольного субъекта, добавляли в нижний отсек каждой лунки. Через приблизительно 12 ч содержимое нижнего отсека удаляли для оценки миграции фиброцитов посредством проточной цитометрии с использованием двойного мечения по CD45-коллагену I. Для получения абсолютных количеств мигрирующих клеток значения при проточной цитометрии для каждого состояния получали в течение постоянного предопределенного периода времени (1 мин). Фракцию мигрирующих фиброцитов определяли по соотношению между количеством CD45+coll I+ клеток, подсчитанных в нижней камере, деленным на количество CD45+coll I+ клеток, добавленных в верхний отсек. Эти значения нормализовали по фракции мигрирующих фиброцитов, полученных в исходном состоянии (только среда).

Пример 7. Измерение CXCL12 и CCL11 в плазме.

CXCL12 и CCL11 в плазме измеряли посредством ELISA в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems).

Пример 8. Результаты клинических исследований.

Включение в исследование и исходные характеристики.

58 пациентов с COPD с обострением и 48 контрольных субъектов включали в исследование (фиг. 1). Затем количественно оценивали уровень фиброцитов у 48 пациентов с COPD с обострением (VI), у 9 пациентов с COPD без обострения и у 38 контрольных субъектов. Затем количественно оценивали уровень фиброцитов у 27 пациентов с COPD в стабильном состоянии (V2).

Циркулирующие фиброциты в крови.

Процентное содержание фиброцитов (CD45+ Coll+ клеток) в крови было выше у пациентов с COPD во время обострения ("VI", медиана=9,6 (95% доверительный интервал [CI], 9,5-15,7) из PBMC, n=48), по сравнению с "пациентами с COPD без обострения" ("Nex", медиана=2,4 (95% CI, 0,3-6,8) из PBMC, n=9, p<0,05) и у контрольных субъектов (медиана=3,0 (95% CI, 3,1-5,3) из PBMC, n=38, p<0,001) (фиг. 2A).

Сходные результаты получали для уровня фиброцитов, выраженного как абсолютное количество на миллилитр крови (фиг. 2B). Как процентное содержание (фиг. 2C), так и абсолютное количество (фиг. 2D) циркулирующих положительных по CD34 фиброцитов были увеличены у пациентов с COPD с обострением по сравнению с контрольными субъектами. Однако при разделении подгрупп пациентов с COPD с обострением на основании их лечения против обострения COPD (антибиотик, пероральные кортикостероиды), способа вентиляции (спонтанная вентиляция, неинвазивная вентиляция или интубация), присутствия или отсутствия госпитализации, значимых отличий уровня фиброцитов между различными подгруппами не наблюдали (данные не представлены).

Через два месяца после обострения ("V2"), как процентное содержание (фиг. 2E), так и абсолютное количество (фиг. 2F) фиброцитов были значимо уменьшены по сравнению с оцененными при V1 ($p < 0,01$). Более того, присутствовало значимое увеличение процентного содержания фиброцитов при V2 в подгруппе пациентов с 2 или более внеплановыми осмотрами по поводу COPD за год до V1 и у пациентов без каких-либо внеплановых осмотров (фиг. E1).

Связь между фиброцитами, выживаемостью и функциональными и клиническими параметрами.

Данные выживаемости получали для пациентов с COPD в течение медианного периода 1,4 года и вплоть до 3 лет после V1. Анализ выживаемости Каплана-Мейера проводили в 2 подгруппах пациентов на основании процентного содержания фиброцитов, оцененного при V1. Пациенты с более 28% фиброцитов обладали значимо уменьшенной продолжительностью жизни по сравнению с пациентами с менее 28% фиброцитов (фиг. 3A). Не присутствовало значимого различия между 2 подгруппами в отношении соотношения полов, возраста, FEV1, FVC, PaO₂ (данные не представлены). Подгруппа пациентов с более 28% фиброцитов состояла из 6 пациентов с острым приступом, где все требовали госпитализации, в то время как подгруппа пациентов с менее 28% фиброцитов состояла из 36 пациентов с острым приступом (где 20 требовали госпитализации и 16 без госпитализации).

Определяли также коэффициенты корреляции между процентами фиброцитов, оцененными при втором осмотре (т.е. при V2 через два месяца после обострения в стабильном состоянии), и определяли также различные функциональные параметры. Процентное содержание фиброцитов отрицательно и значимо коррелировало с FEV1 (прогнозируемый %, фиг. 3B), FVC (прогнозируемый %, фиг. 3C), соотношением FEV1/FVC (%), фиг. 3D), TLCO (прогнозируемый %, фиг. 3E) и PaO₂ (мм рт.ст., фиг. 3F). Сходные отрицательные корреляции получали между процентным содержанием циркулирующих фиброцитов при втором осмотре и FEV1 (L), FVC (L) или FEF₂₅₋₇₅ (л/с и прогнозируемый %) (фиг. E2). В отличие от этого не присутствовало значимой корреляции между процентами циркулирующих фиброцитов у пациентов с обострением и возрастом (данные не представлены).

Экспрессия рецепторов хемокинов в фиброцитах.

Кроме того, экспрессию рецепторов хемокинов в фиброцитах оценивали посредством проточной цитометрии. CXCR4, CCR2 и CCR3 экспрессировал большой процент фиброцитов (фиг. 4A, C, E), в то время как CCR5 и CCR7 обнаружены только на небольшом проценте CD45+CD11+ клеток (фиг. 4G и H). Присутствовал более высокий уровень CXCR4+ и CCR3+ фиброцитов у пациентов с COPD, чем у контрольных субъектов (фиг. 4B, D и F).

Роль осей CXCL12/CXCR4 и CCL11/CCR3 в миграции фиброцитов.

Поскольку больше CXCR4+ и CCR3+ фиброцитов обнаружено в крови пациентов с COPD с обострением, роль как CXCR4, так и CCR3 в индуцированной плазмой миграции фиброцитов исследовали в анализе *in vitro*. Плериксафор, антагонист CXCR4 (De Clercq, E. 2003. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2(7):581-7) индуцировал значимое уменьшение индуцированной плазмой привлечения фиброцитов, полученных от пациентов с COPD с обострением но не значимое уменьшение миграции фиброцитов, полученных от нормальных субъектов (фиг. 5A). В отличие от этого, на индуцированную плазмой миграцию фиброцитов от пациентов с COPD с обострением или от контрольных субъектов не влиял SB 328437, антагонист CCR3 (White, J. R., et al. 2000. *J Biol Chem* 275(47):36626-31) (фиг. E3A). Сравнивали также концентрации в плазме некоторых из лигандов CXCR4 и CCR3. Концентрации в плазме CXCL12 альфа (лиганда CXCR4), и CCL11 и CCL13 (лигандов CCR3) значимо не отличались между группами (фиг. 5B, фиг. E3B). Таким образом, исследовали ответ миграции фиброцитов на увеличивающиеся концентрации CXCL12 альфа и CCL11. CXCL12 альфа (фиг. 5C), но не CCL11 (фиг. E3C), индуцировал значительную миграцию фиброцитов зависимым от дозы образом. Интересно, что 100 нг/мл CXCL12 альфа запускали значимо более высокую миграцию фиброцитов от пациентов с COPD с обострением по сравнению с фиброцитами от контрольных субъектов (фиг. 5C), что позволяет предполагать, что фиброциты от пациентов с COPD с обострением обладали усиленной чувствительностью к химическому воздействию CXCL12 по сравнению с фиброцитами из контроля. Этот ответ полностью прекращали посредством обработки плериксафором, показывая, что этот ответ являлся полностью опосредованным CXCR4 (фиг. 5D).

Пример 9. Эффекты композиций и способов для применения по изобретению на модель COPD на мышах.

Модель на мышах подвергали воздействию сигаретного дыма (CS) в комбинации с вызванными вирусом обострениями. Указанные вызванные вирусом обострения провоцировали посредством инъекции

двухпочечной РНК, индуцирующей ответы, сходные с ответами, индуцированными вирусными инфекциями, а именно поли(I:C).

Мышей подвергали воздействию сигаретного дыма (CS) или комнатного воздуха (RA) в течение 5 недель. В последние 2 недели протокола поли(I:C) или носитель (PBS) инъецировали дважды в неделю. Как показано на фиг. 9, подвергание воздействию CS и поли(I:C) вызывало умеренное увеличение выделения тотальных клеток и макрофагов после бронхоальвеолярного лаважа (BAL). Однако наблюдали значительное увеличение выделения нейтрофилов и лимфоцитов (фиг. 9).

Также анализ изображений после электронной микроскопии срезов бронхов, полученных от мышей, подвергнутых воздействию CS и поли(I:C) по сравнению с контрольными мышами, подвергнутыми воздействию комнатного воздуха и PBS, показал, что CS и поли(I:C) индуцировал фиброз малых, но не больших дыхательных путей (фиг. 10A). Таким образом, комбинация CS и поли(I:C) вызывает воспаление бронхиальных дыхательных путей и структурные изменения, характерные для заболевания COPD. Увеличение воспаления бронхиальных дыхательных путей, а также увеличение перибронхиального фиброза, как наблюдали у пациентов с COPD, ясно показано на фиг. 10B.

Более того, увеличение процентного содержания циркулирующих фиброцитов ("Кровь", фиг. 11) и фиброцитов в легком ("Легкое", фиг. 11) показано у мышей, подвергнутых воздействию как сигаретного дыма, так и поли(I:C). Интересно, что процентное содержание фиброцитов в легком коррелировало с фиброзом малых дыхательных путей (фиг. 12), что позволяет предполагать роль фиброцитов в этом патофизиологическом процессе. Совместно эти данные подтверждают результаты, полученные для пациентов с COPD, и добавляют существенную информацию о привлечении фиброцитов в легкое, где они могут играть ключевую роль в перибронхиальном фиброзе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции для изготовления лекарственного средства для предупреждения и/или лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) и острых приступов хронического обструктивного заболевания легких (AECOPD), где указанная композиция состоит по существу из терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4 и фармацевтически приемлемого носителя, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов, и где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 ингибирует миграцию и/или рекрутирование фибробластов во время обострения у пациентов с хроническим обструктивным заболеванием легких (COPD).

2. Применение композиции для изготовления лекарственного средства по п.1, где указанный антагонист CXCR4 выбран из соединений на основе параксилилендиамина.

3. Применение композиции для изготовления лекарственного средства по п.2, где указанный антагонист CXCR4 представляет собой плериксафор.

4. Применение композиции для изготовления лекарственного средства по любому из предшествующих пунктов, где указанная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

5. Применение композиции для изготовления лекарственного средства по любому из предшествующих пунктов, где указанная композиция дополнительно содержит бронхорасширяющие средства, кортикостероиды и/или ингибиторы фосфодиэстеразы.

6. Способ подавления миграции фиброцитов у пациентов с COPD или AECOPD, включающий введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антагонистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов.

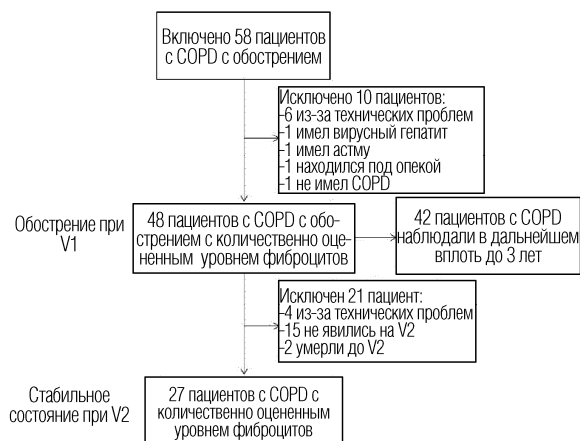
7. Способ по п.6, где указанный антагонист или ингибитор рецептора хемокинов CXCR4 вводят орально, буккально или подязычно, и он находится в форме таблеток, капсул (включая мягкие желатиновые капсулы), множества частиц, гелей, пленок, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать вкусовые вещества или красители, для доставки с немедленным, отложенным, модифицированным, замедленным, двойным, контролируемым высвобождением или пульсирующей доставкой.

8. Способ по п.7, где указанный антагонист или ингибитор рецептора хемокинов CXCR4 вводят посредством ингаляции, и он находится в форме ингаляции сухого порошка или аэрозольного спрея, представляемых из находящихся под давлением контейнера, насоса, распылителя или небулайзера.

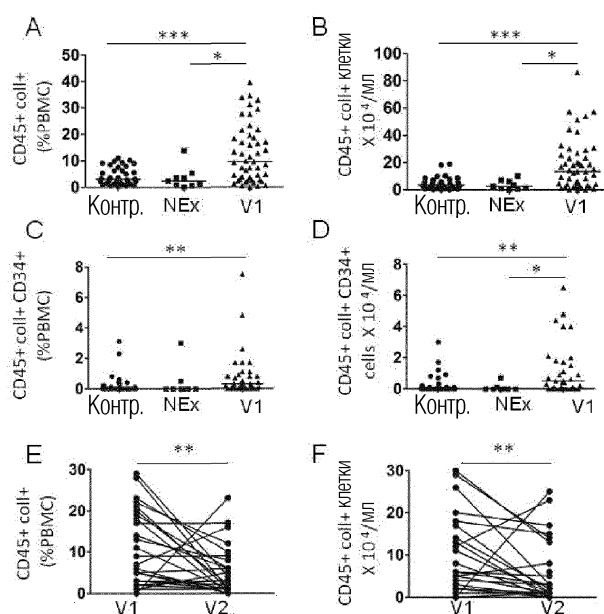
9. Применение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного антагониста или ингибитора рецептора хемокинов CXCR4, где указанный антагонист или ингибитор CXCR4 представляет собой малую молекулу, выбранную из бициклов, антагонистов CXCR4 на основе хинолона, антаго-

нистов CXCR4 на основе тетрагидрохинолина, антагонистов CXCR4 на основе гуанидина, антагонистов CXCR4 на основе N-замещенного индола и/или антагонистов CXCR4 на основе пиримидина, производных 1,4-фениленбис(метилена) и N-содержащих гетероциклов для лечения и/или предупреждения COPD и AECOPD.

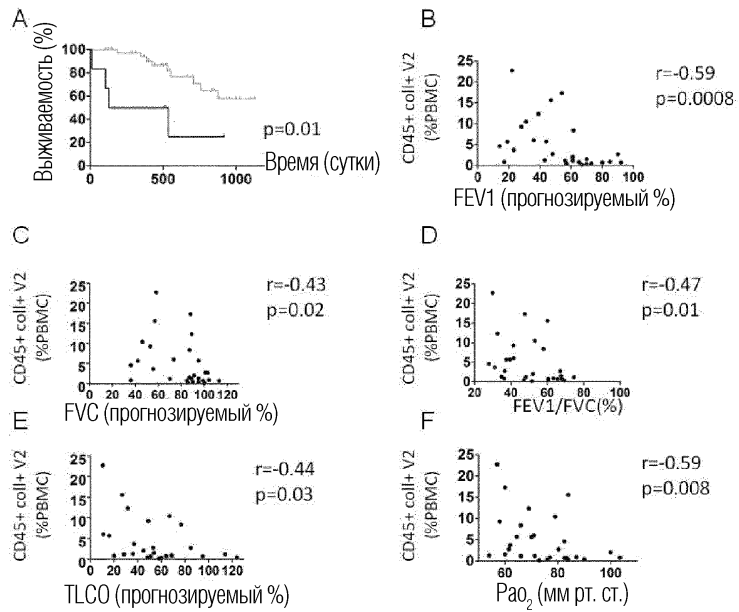
10. Применение по п.9 для подавления миграции фиброцитов у пациентов с COPD и AECOPD или у пациентов с риском развития COPD и AECOPD.



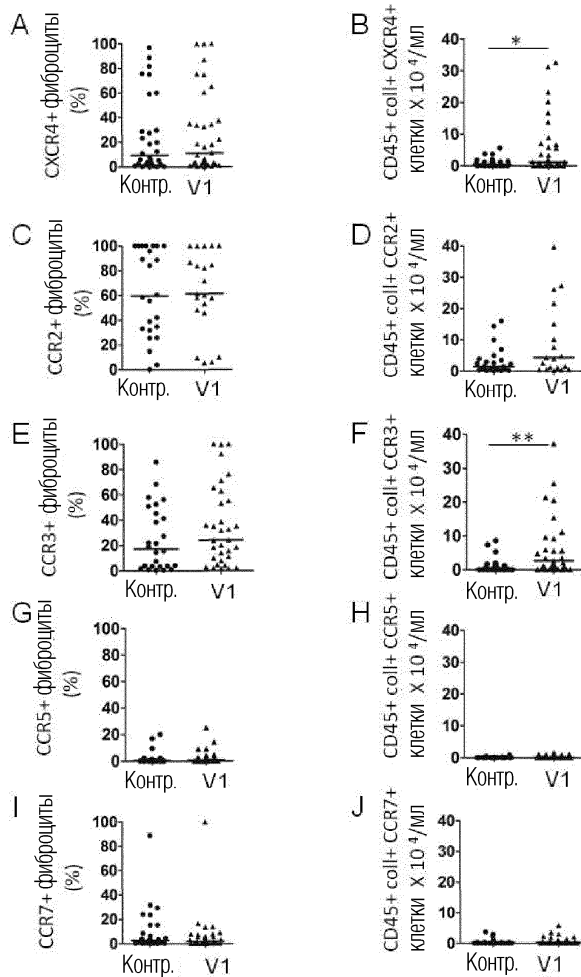
Фиг. 1



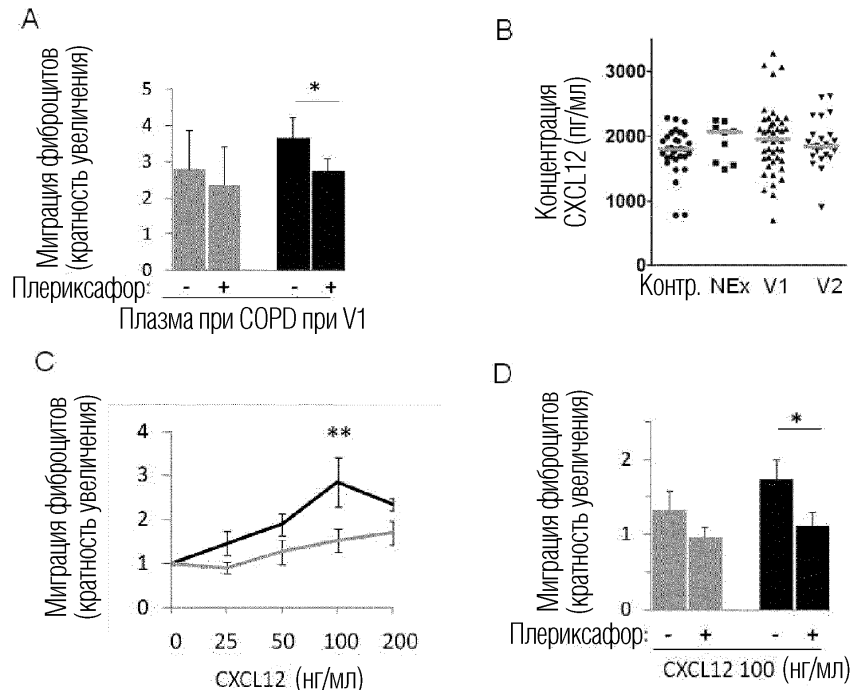
Фиг. 2



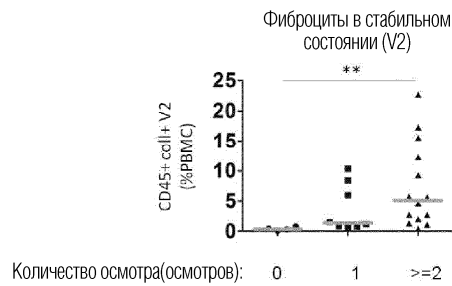
Фиг. 3



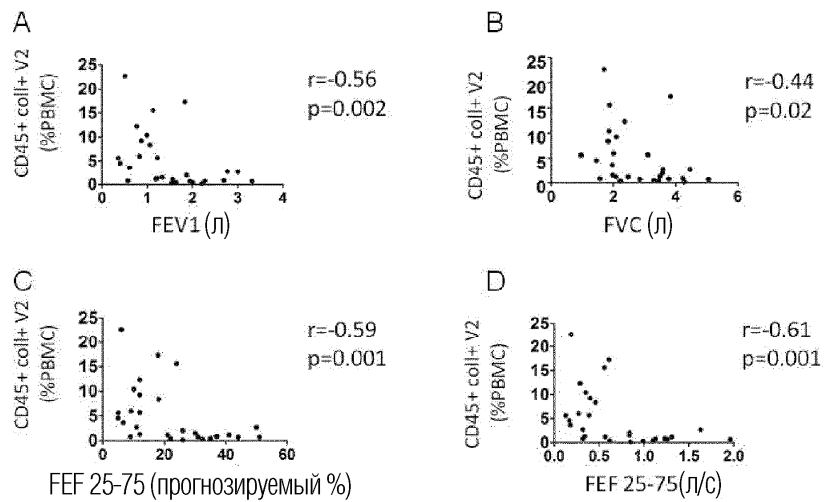
Фиг. 4



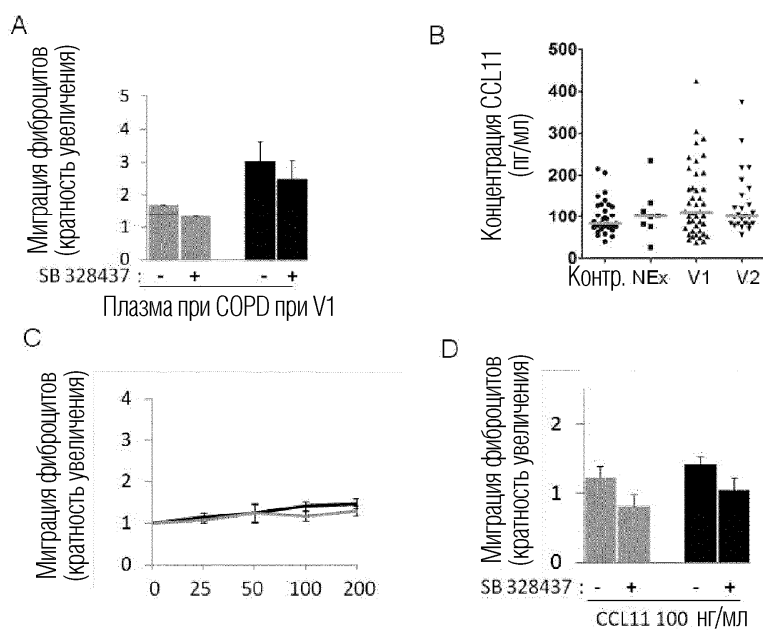
Фиг. 5



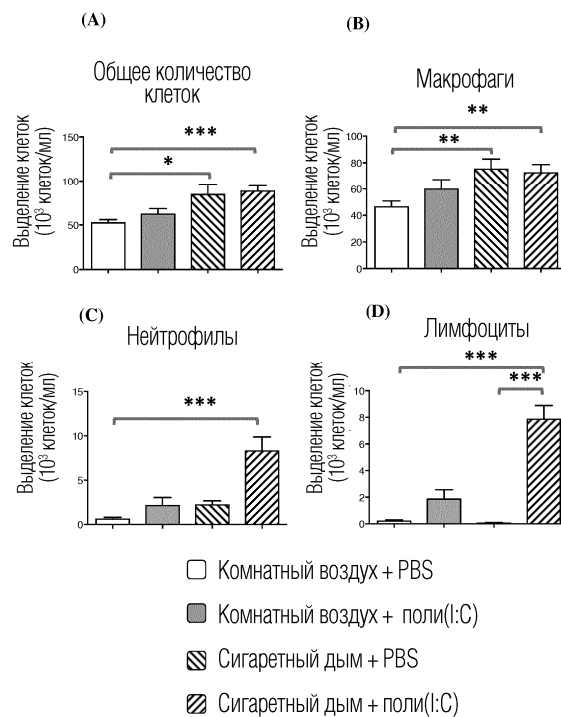
Фиг. 6



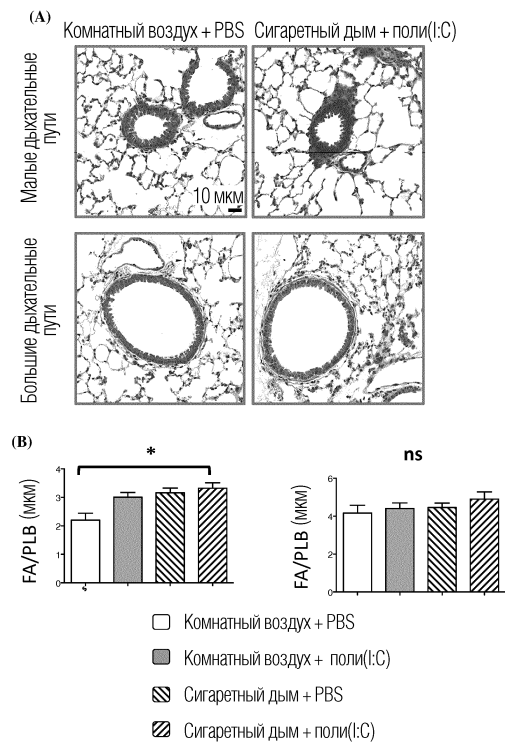
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



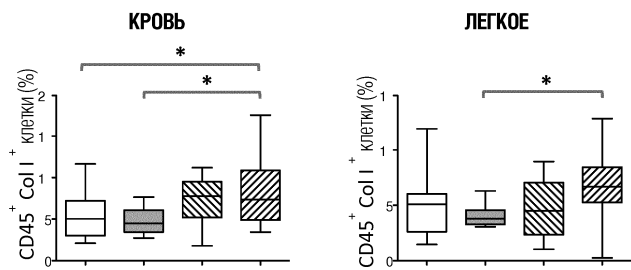
Фиг. 10

Комнатный воздух + CD45⁺ Col I⁺ = фиброциты

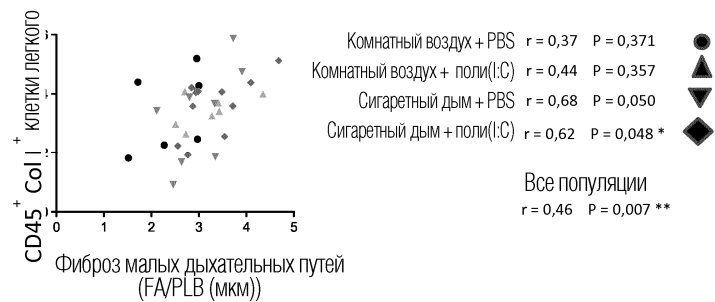
Комнатный воздух +

Сигаретный дым +

Сигаретный дым +



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2