

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390268 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.06

(51) Int. Cl. A61K 31/4704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.23

(54) БЕЛКИ S100 КАК НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ПРИ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

(31) 20187323.9

(32) 2020.07.23

(33) EP

(86) PCT/EP2021/070629

(87) WO 2022/018240 2022.01.27

(71) Заявитель:
ЭРАЗМУС ЮНИВЕРСИТИ
МЕДИКАЛ СЕНТЕР РОТТЕРДАМ
(NL)

(72) Изобретатель:
Шнайдер-Крамани Ребекка Катарина
Марита (NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к ингибитору белка S100, предпочтительно ингибитору белка S100A8 или S100A9, для профилактики или лечения миелопролиферативного новообразования. В частности, изобретение относится к ингибитору белка S100A8 или S100A9 для профилактики или лечения первичного миелофиброза. Данное изобретение также относится к диагностическому способу для идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, включающему стадию обнаружения в биологическом образце белка S100, предпочтительно белка S100A8 или S100A9.

A1

202390268

202390268

A1

БЕЛКИ S100 КАК НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к молекулярной онкологии. Конкретнее, изобретение относится к ингибитору для применения в профилактике, улучшении и/или лечении миелопролиферативного новообразования, предпочтительно миелопролиферативного новообразования, связанного с фиброзной фазой. Изобретение также относится к новому биомаркеру для миелопролиферативного новообразования. Новый биомаркер может определять тяжесть или фазу миелопролиферативного новообразования и/или может быть использован для определения (стратификации), может ли субъект, страдающий от миелопролиферативного новообразования, получить пользу от ингибитора белка S100, как определено в настоящем описании.

Уровень техники

Миелопролиферативные новообразования (MPN) или миелопролиферативные заболевания (MPD) представляют собой группу заболеваний костного мозга, при которых продуцируется избыток клеток. MPN возникают из предшественников миелоидных линий в костном мозге и могут охватывать фиброз костного мозга. Фиброз костного мозга (BM) характеризуется непрерывной заменой кроветворных клеток в костном мозге избыточной рубцовой тканью. Первичный миелофиброз (PMF) является прототипическим примером прогрессирующего развития фиброза BM. Отличительной чертой явного PMF является избыточное отложение внеклеточного матрикса (ECM), которое сопровождается прогрессирующей потерей кроветворения (цитопения), вызывающей зависимость от переливания крови, спленомегалию из-за экстрамедуллярного кроветворения и, в конечном счете, недостаточность костного мозга. В настоящее время единственным доступным и потенциально излечивающим методом лечения MPN с фиброзом является трансплантация костного мозга. Однако трансплантация костного мозга является сложным лечением, содержащим в себе значительный риск серьезных осложнений. Кроме того, для большинства пациентов такая многообещающая процедура неприемлема, например из-за возраста, стадии заболевания, сопутствующих заболеваний и отсутствия подходящего донора.

Хотя молекулярные изменения в гемопоэтических клетках, которые приводят к развитию миелопролиферативных новообразований (MPN), в значительной степени определены (Vainchenker *et al.*, 2011; Rampal *et al.*, 2014), реактивные клеточные

изменения в негемопоэтическом компартменте остаются скорее неясными и не изучены на уровне отдельных клеток.

Морфология костного мозга у пациентов с PMF предполагает, что происходит постепенная эволюция от начальной предфиброзной фазы с отсутствием фиброза или минимальным фиброзом к фиброзной фазе с выраженным ретикулиновым или коллагеновым фиброзом, и часто сопровождается остеосклерозом. Однако начальные изменения и последовательные события, лежащие в основе предфиброзной фазы заболевания, недостаточно хорошо охарактеризованы (Barbui *et al.*, 2018).

Избыток стромальных клеток в нише нормальных здоровых HSC (Baryawno *et al.*, 2019; Tichonova *et al.*, 2019) предполагает, что различные стромальные подтипы играют различную роль не только в нормальном кроветворении, но также в фиброзе костного мозга, включая PMF. При фиброзе солидных органов мезенхимальные стромальные клетки (MSC), которые в контексте настоящего описания также часто называют MSC-подобными клетками, считаются основным клеточным источником клеток, стимулирующих фиброз (El Agha *et al.*, 2017). Такие результаты получены в основном в результате экспериментов по отслеживанию генетического направления развития, которые позволяют изучать дифференцировку клеток в ответ на патологический стимул. Общепринятая гипотеза при фиброзе твердых органов заключается в том, что в присутствии вызывающих фиброз факторов, таких как воздействие провоспалительных и профиброзных цитокинов, поражаются MSC/MCK-подобные клетки и приводят к переключению дифференцировки в сторону миофибробластов, что, в свою очередь, приводит к фиброзу за счет отложения ECM.

Одним из основных открытых вопросов при фиброзе солидных органов является вопрос, являются ли MSC отдельной или гетерогенной клеточной популяцией. Показано, что в костном мозге MSC вносят вклад в стимулирующие фиброз α -SMA+ миофибробласты (Decker *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2017), но остается неизвестным, являются ли они единственным источником стимулирующих фиброз клеток в микроокружении костного мозга или другие типы клеток негемопоэтической ниши костного мозга способствуют фиброзной трансформации.

В уровне техники все еще существует потребность в эффективном и/или более раннем лечении миелопролиферативных новообразований, в частности, лечении первичного миелофиброза. Кроме того, в уровне техники существует потребность в биомаркере, указывающем на миелопролиферативное новообразование.

Сущность изобретения

Изобретение можно кратко изложить в следующих далее воплощениях.

Воплощение 1. Ингибитор белка S100 для применения при предупреждении или лечении миелопролиферативного новообразования, связанного с фиброзной фазой, причем миелопролиферативное новообразование предпочтительно представляет собой, по меньшей мере, одно из первичного миелофиброза, эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии.

Воплощение 2. Ингибитор для применения согласно воплощению 1, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз.

Воплощение 3. Ингибитор для применения согласно воплощению 1 или 2, причем белок S100 представляет собой по меньшей мере один белок из S100A8 и S100A9.

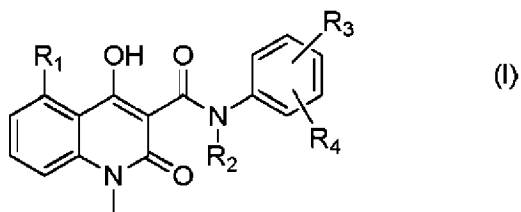
Воплощение 4. Ингибитор для применения согласно любому из предшествующих воплощений, причем ингибитор является по меньшей мере одним из

i) ингибитора, который предотвращает или снижает экспрессию белка S100 в клетке; и

ii) ингибитора, который ингибирует функциональную активность белка S100.

Воплощение 5. Ингибитор для применения согласно любому из предшествующих воплощений, причем ингибитор представляет собой малую некодирующую РНК или малую молекулу.

Воплощение 6. Ингибитор для применения согласно воплощению 5, причем ингибитор представляет собой малую молекулу формулы (I)



или ее фармацевтически приемлемую соль,

причем

R₁ выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси;

R₂ представляет собой C1-C4 алкил;

R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси; и

R₄ выбирают из группы, включающей водород, фтор и хлор, при условии, что R₄ выбирают из фтора и хлора только тогда, когда R₃ выбирают из фтора и хлора.

Воплощение 7. Ингибитор для применения согласно воплощению 6, причем R₂ представляет собой метил или этил.

Воплощение 8. Ингибитор для применения согласно воплощению 6 или 7, причем

R₃ находится в пара-положении и выбирается из группы, включающей метил, метокси, фтор, хлор, трифторметил и трифторметокси.

Воплощение 9. Ингибитор для применения согласно любому из воплощений 6 – 8, причем R₄ представляет собой H.

Воплощение 10. Ингибитор для применения согласно любому из воплощений 6 – 9, причем ингибитор представляет собой 4-гидрокси-5-метокси-N,1-диметил-2-оксо-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксаимид (тасквинимод).

Воплощение 11. Ингибитор для применения согласно любому из предшествующих воплощений, причем предупреждение или лечение осуществляют путем введения ингибитора в общей дозе примерно 0,05 – 10 мг.

Воплощение 12. Ингибитор для применения согласно любому из предшествующих воплощений, причем предупреждение или лечение осуществляют путем перорального введения ингибитора.

Воплощение 13. Ингибитор для применения согласно любому из предшествующих воплощений, причем предупреждение или лечение также включает по меньшей мере одну терапию из лучевой терапии, химиотерапии и трансплантации стволовых клеток.

Воплощение 14. Агент для идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, причем агент связывается с белком S100, предпочтительно с белком S100A8 или S100A9, и где агент также включает детектируемую метку, причем предпочтительно агент представляет собой малую молекулу, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Воплощение 15. Агент согласно воплощению 14, причем агентом является тасквинимод, предпочтительно обогащенный дейтерием тасквинимод.

Воплощение 16. Способ идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, включающий стадию обнаружения присутствия в биологическом образце белка S100, предпочтительно S100A8 или S100A9, причем способ предпочтительно является способом *ex vivo*.

Воплощение 17. Способ согласно воплощению 16, причем присутствие белка S100 обнаруживают путем воздействия на биологический образец агента согласно воплощению 14 или 15.

Воплощение 18. Способ согласно воплощениям 16 или 17, причем биологический образец представляет собой образец крови или образец костного мозга.

Воплощение 19. Способ согласно любому из воплощений 16 – 18, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз.

Воплощение 20. Способ согласно воплощению 19, причем способ идентифицирует

субъекта, страдающего от первичного миелофиброза 0, 1, 2 или 3 степени.

Определения

Во всем описании и формуле изобретения используются различные термины, относящиеся к способам, композициям, препаратам, применениям и другим аспектам настоящего изобретения. Таким терминам следует придавать их обычное значение в области техники, к которой относится изобретение, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать в соответствии с определением, приведенным в настоящем описании. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем описании, можно использовать на практике для тестирования настоящего изобретения, предпочтительные материалы и способы описаны в настоящем описании.

Способы выполнения обычных методов, используемых в способах по изобретению, будут очевидны для специалиста. Применение традиционных методов в молекулярной биологии, биохимии, вычислительной химии, культивировании клеток, рекомбинантных ДНК, биоинформатике, геномике, секвенировании и смежных областях хорошо известно специалистам в данной области техники и обсуждается, например, в следующих литературных источниках: Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987 и периодические обновления; и серия *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.

Термины в форме единственного числа (в английском языке на это указывают артикли “a,” “an” и “the” – *Прим. пер.*) включают ссылки на множественное число, если содержание явно не диктует иное. Неопределенный артикль «a» или «an», таким образом, обычно означает «по меньшей мере один» (здесь делается отсылка к англоязычному тексту описания – *Прим. пер.*). Таким образом, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинацию из двух или больше клеток и т.п.

«Примерно» и «приблизительно». Эти термины, когда они относятся к измеряемой величине, такой как количество, временная продолжительность и т.п., означают охват колебаний в $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, предпочтительнее в $\pm 5\%$, еще предпочтительнее в $\pm 1\%$, даже еще предпочтительнее в $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие колебания являются подходящими для выполнения раскрываемых способов. Кроме того, количества, соотношения и другие численные значения иногда в настоящем описании представлены в формате диапазона. Следует понимать, что такой формат диапазона используется для удобства и краткости и должен пониматься гибко, чтобы включать численные значения, явно указанные в качестве пределов диапазона, но также включать все отдельные

численные значения или поддиапазоны, охватываемые таким диапазоном, как если бы каждое численное значение и поддиапазон были указаны конкретно. Например, соотношение в диапазоне примерно 1 – примерно 200 следует понимать как включающее явно указанные пределы примерно 1 и примерно 200, но также как включающие отдельные соотношения, такие как примерно 2, примерно 3 и примерно 4, и поддиапазоны, такие как примерно 10 – примерно 50, примерно 20 – примерно 100 и так далее.

«И/или». Термин «и/или» относится к ситуации, в которой один или несколько установленных случаев могут происходить по одному или в комбинации с по меньшей мере одним из установленных случаев и так далее вплоть до комбинации со всеми установленными случаями.

При использовании в настоящем описании с «по меньшей мере» определенная величина обозначает такую определенную величину или большую. Например, «по меньшей мере» 2» следует понимать как то же, что «2» или больше, т.е. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ... и т.д.

«Включающий». Этот термин толкуется как всеобъемлющий и открытый, а не исключительный. В частности, термин и его варианты означают, что включены указанные функции, этапы или компоненты. Такие термины не следует толковать как исключающие наличие других функций, стадий или компонентов.

Приведение в качестве примера. Такие выражения означают «служить примером, образцом или иллюстрацией» и не должны толковаться как исключающие другие конфигурации, раскрытые в настоящем описании.

При использовании в настоящем описании термины «рак» и «злокачественный» относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Рак также называют злокачественным новообразованием. Предпочтительным раком является рак крови, предпочтительно рак крови представляет собой миелопролиферативное новообразование.

При использовании в настоящем описании «в комбинации с» предназначен для обозначения всех форм введения, которые обеспечивают первое лекарственное средство вместе с дополнительным (вторым, третьим) лекарственным средством. Лекарственные средства могут вводиться одновременно, отдельно или последовательно и в любом порядке. Лекарственные средства, вводимые в комбинации, обладают биологической активностью у субъекта, которому доставляются лекарственные средства.

При использовании в настоящем описании «одновременное» введение относится к введению более одного лекарственного средства в одно и то же время, но не обязательно

одним и тем же путем введения или в форме одного комбинированного препарата. Например, одно лекарственное средство может предоставляться перорально, в то время как другое лекарственное средство может предоставляться внутривенно. Раздельное введение включает введение лекарственных средств в отдельной форме и/или в различные моменты времени, но снова не обязательно одним и тем же путем введения. «Последовательно» указывает, что за введением первого лекарственного средства следует, немедленно или со временем, введение второго лекарственного средства.

Используемые в настоящем описании «композиции», «продукты» или «комбинации», применимые в способах по настоящему изобретению, включают те композиции, продукты или комбинации, которые подходят для различных путей введения, включая, но без ограничения, внутривенное, подкожное, внутрикожное, субдермальное, интранодальное, внутриопухолевое, внутримышечное, интраперитонеальное, пероральное, назальное, местное (включая трансбуккальное и подъязычное), ректальное, вагинальное, аэрозольное и/или парентеральное или мукозальное применение. Композиции, препараты и продукты согласно описанию изобретения обычно включают лекарственные средства (по отдельности или в комбинации) и один или несколько подходящих фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

При использовании в контексте изобретения термины «предотвращать», «предотвращение» и «профилактика» относятся к предотвращению или уменьшению рецидива, начала, развития или прогрессирования заболевания, предпочтительно миелопролиферативного новообразования, определенного в настоящем описании, или предотвращению или уменьшению тяжести и/или продолжительность заболевания, или одного или нескольких его симптомов.

При использовании в настоящем описании термины «лечить», «лечение» и «терапия» относятся к уменьшению или облегчению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности заболевания, предпочтительно миелопролиферативного новообразования, определенного в настоящем описании, и/или уменьшению или облегчению одного или нескольких симптомов заболевания.

При использовании в контексте изобретения термины «методы лечения» и «терапия» могут относиться к любому протоколу(ам), способу(ам) и/или агенту(ам), предпочтительно описанным в настоящем описании ниже, которые можно использовать при профилактике, лечении, контроле или улучшении состояния при заболевании, предпочтительно миелопролиферативном новообразовании, как определено в настоящем описании ниже, или при одном или нескольких его симптомах.

При использовании в настоящем описании термин «эффективное количество» относится к количеству агента, например, ингибитора, определенного в настоящем описании, которое является достаточным для уменьшения тяжести и/или продолжительности миелопролиферативного новообразования, для уменьшения интенсивности одного или нескольких его симптомов, предотвращения прогрессирования миелопролиферативного новообразования, или вызывает регрессию миелопролиферативного новообразования, или которого достаточно, чтобы привести к предотвращению развития, рецидива, начала или прогрессирования миелопролиферативного новообразования или одного или нескольких его симптомов. С другой стороны или кроме того, эффективное количество ингибитора может являться количеством, которое усиливает или улучшает профилактический(е) и/или терапевтический(е) эффект(ы) другой терапии. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, предотвращает начало, уменьшает и/или реверсирует прогрессирование первичного миелофиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, предотвращает начало первичного миелофиброза у субъекта, нуждающегося в этом. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, уменьшает прогрессирование первичного миелофиброза у субъекта, нуждающегося в этом.

Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, предотвращает наступление, уменьшает и/или реверсирует прогрессирование первичного миелофиброза у субъекта, имеющего миелопролиферативное новообразование. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, предотвращает начало первичного миелофиброза у субъекта, имеющего миелопролиферативное новообразование. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, предотвращает прогрессирование первичного миелофиброза у субъекта, имеющего миелопролиферативное новообразование. Предпочтительно эффективное количество ингибитора, определенного в настоящем описании, реверсирует прогрессирование первичного миелофиброза у субъекта, имеющего миелопролиферативное новообразование.

Эффективное количество ингибитора, используемого на практике по настоящему изобретению для терапевтического лечения миелопролиферативного новообразования, может изменяться в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. В конечном счете, лечащий врач или ветеринар будет

принимать решение о соответствующем количестве и схеме приема. Такое количество называют «эффективным» количеством. Таким образом, в связи с введением ингибитора, который в контексте настоящего раскрытия «эффективным против» миелопролиферативного новообразования указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к благоприятному эффекту, по меньшей мере, для статистически значимой части пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, уменьшение по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, продление жизни, улучшение качества жизни, или другому эффекту, обычно признаваемому в качестве положительного врачами, знакомыми с лечением конкретного типа заболевания или состояния.

Ингибитор, описанный в настоящем описании, предпочтительно является (активным) агентом. Термин «агент» относится в целом к любому объекту, который обычно не присутствует или не присутствует на уровнях, вводимых в клетку, ткань или субъекту. Агент может представлять собой соединение или композицию. Агент можно выбрать, например, из группы, включающей полинуклеотиды, полипептиды, малые молекулы, антитела и их функциональные фрагменты.

Описанное в настоящем описании медицинское применение формулируется как соединение, определенное в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства для лечения установленного(ых) заболевания(й), но в равной степени может быть сформулировано как способ лечения установленного(ых) заболевания(й) с использованием соединения, определенного в настоящем описании, определенного в настоящем описании соединения для применения при получении лекарственного средства для лечения установленного(ых) заболевания(й) и использование соединения, определенного в настоящем описании, для лечения установленного(ых) заболевания(й) путем введения эффективного количества. Все такие медицинские применения предусмотрены настоящим изобретением.

При использовании в настоящем описании термин «малая молекула» может относиться к соединениям, которые являются «подобными натуральному продукту», но главным образом будет относиться к синтетическим соединениям. Малая молекула обычно характеризуется тем, что она содержит несколько углерод-углеродных связей и имеет молекулярную массу менее 5000 дальтон (5 кДа), предпочтительно менее 3 кДа, еще предпочтительнее менее 2 кДа и наиболее предпочтительно менее 1 кДа. В некоторых случаях предпочтительно, чтобы малая молекула имела молекулярную массу, равную или меньше 700 дальтон.

Термин «белок» или «полипептид» относится к молекуле, состоящей из цепи

аминокислот, без ссылки на конкретный способ действия, размер, 3-мерную структуру или происхождение. Таким образом, «фрагмент» или «часть» белка все еще может называться «белком». Белок, по определению в настоящем описании и при использовании в любом способе, определенном в настоящем описании, может быть выделенным белком. «Выделенный белок» используется для обозначения белка, который более не находится в своей естественной среде, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или животной клетке-хозяине. Предпочтительно белок включает более 50 аминокислотных остатков.

Термин «белковая молекула» в настоящем описании понимается как молекула, включающая короткую цепь аминокислотных мономеров, соединенных пептидными (амидными) связями. Короткая цепь аминокислотных мономеров включает 2 или более аминокислотных остатков. Предпочтительно цепь аминокислот имеет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 аминокислотных остатков. Предпочтительно в цепи имеется не более 100 аминокислотных остатков. Предпочтительно в белковой молекуле имеется не более 50 аминокислотных остатков. Предпочтительно белковая молекула имеет примерно 2-100, 3-50, 4-40 или 5-30, или 6-20 аминокислотных остатков. Предпочтительно белковая молекула имеет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных остатков. Необязательно белковая молекула включает одну или больше дополнительных органических частей, таких как, но без ограничения, связующая группа для получения циклизованной белковой молекулы.

«Аптамер» предпочтительно представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую определенную нуклеотидную последовательность. Аптамер может включать любое подходящее число нуклеотидов. Аптамер может включать РНК или ДНК или включает как рибонуклеотидные остатки, так и дезоксирибонуклеотидные остатки. Аптамер может быть одноцепочечным, двухцепочечным или содержать двухцепочечные или трехцепочечные участки. Кроме того, аптамер может включать химически модифицированные остатки, например, для улучшения его стабильности. Длина аптамера обычно будет составлять от примерно 10 до примерно 300 нуклеотидов. Чаще всего длина аптамера будет составлять от примерно 30 до примерно 100 нуклеотидов. Аптамеры к заданной мишени (т.е. белку S100, как определено в настоящем описании) включают нуклеиновые кислоты, которые можно идентифицировать из смеси нуклеиновых кислот-кандидатов с использованием способа, включающего стадии (а) контактирования смеси кандидатов с мишенью, причем нуклеиновые кислоты, имеющие повышенную аффинность к мишени по сравнению с другими нуклеиновыми кислотами в смеси кандидатов, можно отделить от остальных в смеси кандидатов; (b) отделения

нуклеиновых кислот с повышенной аффинностью от остальной части смеси кандидатов и (с) амплификации нуклеиновых кислот с повышенной аффинностью с получением обогащенной смеси нуклеиновых кислот, посредством чего идентифицируются аптамеры молекулы-мишени.

Признано, что аффинные взаимодействия являются вопросом степени; однако в настоящем контексте «специфическая аффинность связывания» аптамера с его мишенью означает, что аптамер связывается со своей мишенью обычно с гораздо более высокой степенью аффинности, чем он связывается с другими нецелевыми компонентами в смеси или образце.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, например, моноклональные антитела, включая агонисты и антагонист, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультивалентные антитела, одноцепочечные антитела и функциональные фрагменты антител, включая Fab, Fab', F(ab')₂ и фрагменты Fv, диатела, триатела, однодоменные антитела (sdAB), антитела из тяжелых цепей, нанотела, до тех пор, пока они проявляют желательную биологическую и/или иммунологическую активность. Антитело может быть человеческим и/или гуманизированным. «Гуманизированные» формы антител, не являющихся человеческими (например, грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из антитела, не являющегося человеческим.

Антитело, «которое связывает» представляющий интерес антиген, предпочтительно белок S100, определенным в настоящем описании, является антителом, которое связывает указанный антиген с достаточной аффинностью, так что антитело применимо для обнаружения белка S100, предпочтительно для обнаружения S100A8 или S100A9, как определено в настоящем описании.

«Фрагменты антитела» включают часть интактного антитела, предпочтительно по меньшей мере антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; триатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном воплощении фрагмент антитела включает сайт связывания с антигеном интактного антитела и, таким образом, сохраняет способность связывать антиген.

Термин «нанотело» хорошо известен в технике. Нанотело представляет собой фрагмент антитела, включающий или состоящий из домена V_HH антитела только с

тяжелой цепью. Предпочтительное нанотело можно получить от семейства верблюжьих, предпочтительно от ламы.

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела в настоящем описании включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же как фрагментам таких антител, до тех пор, пока они проявляют желательную биологическую активность (см. патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Представляющие интерес химерные антитела в настоящем описании включают «приматизированные» антитела, включающие последовательности, связывающие антиген с переменным доменом, полученные от примата, не являющегося человеком (например, обезьяны Старого Света, человекообразной обезьяны и т.д.), и последовательности константной области человека.

Предпочтительно антитело для связывания с диагностическим маркером, определенным в настоящем описании, не вступает в значительную перекрестную реакцию с другими белками.

«Аминокислотная последовательность». Термин относится к порядку аминокислотных остатков белка или в белке. Иными словами, любой порядок аминокислот в белке может называться аминокислотной последовательностью.

«Нуклеотидная последовательность». Термин относится к порядку нуклеотидов нуклеиновой кислоты или в ней. Иными словами, любой порядок нуклеотидов в нуклеиновой кислоте может называться нуклеотидной последовательностью.

Термины «гомология», «идентичность последовательностей» и т.п. используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Идентичность последовательностей в настоящем описании определяется как соотношение между двумя или большим числом аминокислотных (полипептидных или белковых) последовательностей или двумя или большим числом последовательностей нуклеиновых кислот (полинуклеотидных последовательностей), определенное путем сравнения последовательностей. В данной

области техники «идентичность» также означает степень родства последовательностей между аминокислотными или нуклеотидными последовательностями, в зависимости от обстоятельств, определяемую совпадением между расположенными в ряд такими последовательностями. «Подобие» между двумя аминокислотными последовательностями определяют путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных замен одного полипептида с последовательностью второго полипептида.

Термин «комплементарность» в настоящем описании определяется как идентичность последовательности нуклеотидной последовательности полностью комплементарной цепи (например, второй или обратной цепи). Например, последовательность, которая на 100% комплементарна (или полностью комплементарна), в настоящем описании понимается как имеющая 100% идентичность последовательности комплементарной цепи, и, например, последовательность, которая на 80% комплементарна, в настоящем описании понимается как имеющая 80% идентичность последовательности (полностью) комплементарной цепи.

«Идентичность» и «подобие» можно легко вычислить известными методами. «Идентичность последовательности» и «подобие последовательности» можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием глобальных или локальных алгоритмов выравнивания, в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности схожей длины предпочтительно выравнивают с использованием глобального алгоритма выравнивания (например, Нидлмана-Вунша), который оптимально выравнивает последовательности по всей длине, в то время как последовательности существенно различной длины предпочтительно выравнивают с использованием локального алгоритма выравнивания (например, Смита-Ватермана). Последовательности тогда можно называть «по существу идентичными» или «по существу подобными», когда они (при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют по меньшей мере определенный минимальный процент идентичности последовательностей (как определено ниже). GAP использует алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полная длина), максимизируя число совпадений и минимизируя число гэпов. Глобальное выравнивание подходящим образом используется для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют схожую длину. Как правило, используются параметры GAP по умолчанию с штрафом за создание гэпа = 50 (нуклеотиды) / 8 (белки) и штрафом за расширение гэпа = 3 (нуклеотиды) / 2 (белки). Для нуклеотидов по умолчанию используют матрицу оценок `nwsgapdna`, а для белков по

умолчанию используют матрицу оценок Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивание последовательностей и баллы для идентичности последовательностей в процентах можно определить с использованием компьютерных программ, таких как пакет GCG Wisconsin, версия 10.3, имеющийся у Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San-Diego, CA 92121-3752 USA, или с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом, такого как программа «needle» (с использованием глобального алгоритма Нидлмана-Вунша) или «water» (с использованием локального алгоритма Смита-Ватермана) в EmplossWIN, версии 2.10.0, используя те же параметры, что и для GAP, указанные выше, или используя настройки по умолчанию (как для «needle», так и для «water», и для выравнивания как белка, так и ДНК, штраф за открытие гэпа по умолчанию равен 10,0, и штраф за расширение гэпа по умолчанию равен 0,5; матрицами оценок по умолчанию являются Blosum62 для белков и DNABFull для ДНК). Когда последовательности имеют существенно различающуюся общую длину, предпочтительны локальные выравнивания, такие как с использованием алгоритма Смита-Ватермана.

С другой стороны, подобие или идентичность в процентах можно определить путем поиска в общедоступных базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д. Таким образом, нуклеотидные и белковые последовательности по настоящему изобретению можно дополнительно использовать в качестве «последовательности для запроса» для выполнения поиска по общедоступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такой поиск можно выполнить с использованием программ BLASTn и BLASTx (версия 2.0) Altschul, et al. (1990), J. Mol. Biol., 215:403—10. Поиск нуклеотидов по BLAST можно выполнить с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по изобретению. Поиск белка по BLAST можно выполнить с помощью программы BLASTx, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка по изобретению. Для того, чтобы получить выравнивания с гэпами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTx и BLASTn). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Нуклеотидные последовательности по изобретению также можно определить по их

способности к гибридизации со специфическими нуклеотидными последовательностями, раскрытыми в настоящем описании, или их частями, при умеренных или предпочтительно при строгих условиях гибридизации. Строгие условия гибридизации в настоящем описании определяются как условия, которые позволяют нуклеотидной последовательности по меньшей мере из примерно 25, предпочтительно примерно 50 нуклеотидов, 75 или 100 и наиболее предпочтительно из примерно 200 или большего числа нуклеотидов, гибридизоваться при температуре примерно 65°C в растворе, включающем примерно 1 М соли или менее, предпочтительно $6 \times \text{SSC}$, или любом другом растворе, имеющем сопоставимую ионную силу, и допускают промывку при 65°C в растворе, включающем примерно 0,1 М соли, предпочтительно $0,2 \times \text{SSC}$, или любом другом растворе, имеющем сопоставимую ионную силу. Предпочтительно гибридизацию проводят в течение ночи, т.е. по меньшей мере в течение 10 часов, и предпочтительно промывку выполняют в течение по меньшей мере одного часа с по меньшей мере двумя сменами раствора для промывки. Такие условия обычно будут допускать специфическую гибридизацию последовательностей, имеющих примерно 90% или большую идентичности последовательностей.

Умеренные условия в настоящем описании определяются как условия, которые позволяют последовательностям нуклеиновых кислот из по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно из примерно 200 или большего числа нуклеотидов, гибридизоваться при температуре около 45°C в растворе, включающем примерно 1 М соли, предпочтительно $6 \times \text{SSC}$, или любом другом растворе, имеющем сопоставимую ионную силу, и допускают промывку при комнатной температуре в растворе, включающем примерно 1 М соли, предпочтительно $6 \times \text{SSC}$, или любом другом растворе, имеющем сопоставимую ионную силу. Предпочтительно гибридизацию проводят в течение ночи, т.е. по меньшей мере в течение 10 часов, и предпочтительно промывку выполняют в течение по меньшей мере одного часа с по меньшей мере двумя сменами раствора для промывки. Такие условия обычно будут допускать специфическую гибридизацию последовательностей, имеющих идентичность последовательностей до 50%. Специалист в данной области техники сможет модифицировать такие условия гибридизации для того, чтобы конкретно идентифицировать последовательности, отличающиеся идентичностью от 50% до 90%.

Примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли с ионом щелочного металла (в качестве противоиона), например Li^+ , Na^+ или K^+ , или с ионом щелочноземельного элемента, например Mg^{++} или Ca^{++} , или с любым другим фармацевтически приемлемым ионом металла, например Zn^{++} или Al^{3+} ; или

фармацевтически приемлемые соли, образованные органическими основаниями, такими как диэтаноламин, этаноламин, N-метилглюкамин, триэтаноламин или трометамин.

Термин «C1-C4 алкил» относится к разветвленной или неразветвленной алкильной группе, имеющей 1, 2, 3 или 4 атома углерода, т.е. метилу, этилу, n-пропилу, изопропилу, n-бутилу, втор-бутилу, изобутилу или трет-бутилу. Термин «метокси» относится к группе MeO-, или CH₃O-. Термин «этокси» относится к группе EtO- или CH₃CH₂O-. Термины «фтор», «хлор» и «бром» также могут быть представлены как F, Cl и Br. Термин «трифторметил» относится к группе CF₃-. Термин «трифторметокси» относится к группе CF₃O-.

Подробное описание

Авторы изобретения обнаружили, что белки S100, и, в частности, алармины S100A8 и S100A9, активируются в миелопролиферативных новообразованиях рака крови (MPN) у мышинной модели, а также в образцах пациентов. Ингибирование активности S100A8 и S100A9 в MPN мышинной модели поразительно улучшает связанные с заболеванием симптомы и фиброз.

Авторы изобретения обнаружили, что ингибирование активности белка S100, в частности белка S100A8/A9, приводит к эффективному и/или более раннему лечению миелопролиферативных новообразований, в частности лечению первичного миелофиброза. Такое новое лечение может предотвратить прогрессирование миелопролиферативного новообразования и/или реверсировать болезнь. Кроме того, лечение можно использовать в комбинации с другим доступным лечением миелопролиферативного новообразования, в частности, в комбинации с другим лечением первичного миелофиброза, предпочтительно для воздействия на комплементарные пути. Авторы изобретения также обнаружили, что белок S100, предпочтительно белок S100A8/A9, может функционировать как биомаркер, указывающий на миелопролиферативное новообразование, и может быть использован для стратификации пациентов.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к ингибитору белка S100 для применения при профилактике или лечении миелопролиферативного новообразования. Предпочтительно миелопролиферативное новообразование связано с фиброзной фазой.

Предпочтительно профилактика или лечение, описанные в настоящем описании, являются профилактикой или лечением миелопролиферативного новообразования у субъекта млекопитающего, предпочтительно субъекта человека.

Миелопролиферативное новообразование

Миелопролиферативное новообразование (MPN) является типом рака крови, характеризующимся сверхпродукцией по меньшей мере одного вида клеток из красных клеток крови, белых клеток крови и тромбоцитов.

MPN можно классифицировать по наличию или отсутствию так называемой филадельфийской хромосомы, которая является генетической аномалией в хромосоме 22. Конкретнее, (филадельфийская) хромосома 22 включает реципрокную транслокацию, $t(9;22)(q34;q11)$ генетического материала между хромосомой 9 и хромосомой 22 и содержит гибридный ген BCR-ABL1. Предпочтительно MPN является негативным по филадельфийской хромосоме.

MPN может характеризоваться наличием или развитием фиброзной фазы. С другой стороны или кроме того, MPN поэтому предпочтительно ассоциируется с фиброзной фазой. В настоящем описании подразумевается, что профилактика или лечение, подробно описанные в настоящем описании, можно проводить до, во время и/или после начала фиброзной фазы, предпочтительно фиброза костного мозга. Фиброзная фаза предпочтительно характеризуется по меньшей мере одним из коллагеновых фиброзов и ретикулинового фиброза, предпочтительно в костном мозге. MPN, по определению в настоящем описании, предпочтительно может приводить к фиброзной фазе или характеризуется фиброзной фазой, предпочтительно фиброзной фазой костного мозга.

С другой стороны или кроме того, MPN предпочтительно ассоциируется с мутацией JAK2, предпочтительно с мутацией JAK2 V617F или ее функциональным эквивалентом, таким как, но без ограничения, мутация JAK2 экзона 12.

Предпочтительно миелопролиферативное новообразование выбирают из группы, включающей первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию, истинную полицитемию, хронический нейтрофильный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и мастоцитоз. Предпочтительно миелопролиферативное новообразование выбирают из группы, включающей первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию, истинную полицитемию, хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и мастоцитоз. Предпочтительно миелопролиферативное новообразование выбирают из группы, включающей первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию и истинную полицитемию. Эссенциальная тромбоцитемия и истинная полицитемия могут развиваться в первичный миелофиброз.

Эссенциальная тромбоцитемия (ЕТ) представляет собой хронический рак крови (миелопролиферативное новообразование), характеризующийся сверхпродукцией

тромбоцитов мегакариоцитами в костном мозге. Эссенциальная тромбоцитемия может развиваться в миелофиброз.

Истинная полицитемия представляет собой миелопролиферативное новообразование, при котором костный мозг вырабатывает слишком много красных клеток крови. Это также может привести к сверхпродукции белых клеток крови и тромбоцитов. Истинная полицитемия может развиваться в миелофиброз.

Предпочтительно миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз. Первичный миелофиброз (также называемый миелофиброзом, хроническим идиопатическим миелофиброзом или агногенной миелоидной метаплазией) является заболеванием, при котором нормальная ткань костного мозга постепенно заменяется волокнистым материалом, похожим на рубцовый. Со временем это может привести к прогрессирующей недостаточности костного мозга. Миелофиброз может представлять собой прогрессирующую стадию миелопролиферативных новообразований (MPN), негативных по филадельфийской хромосоме. Примерно у трети людей с миелофиброзом ранее была диагностирована полицитемия (постполицитемический миелофиброз) или эссенциальная тромбоцитемия (пост-ЕТ миелофиброз). При первичном миелофиброзе химические вещества, высвобождаемые большим количеством тромбоцитов и аномальных мегакариоцитов (клеток, образующих тромбоциты), могут чрезмерно стимулировать фибробласты. Это может привести к чрезмерному росту толстых грубых волокон в костном мозге, которые постепенно заменяют нормальную ткань костного мозга. Со временем это может разрушить нормальную среду костного мозга, препятствуя продукции адекватного количества красных клеток, белых клеток и тромбоцитов, т.е. приводит к цитопении. Это может привести к анемии, низкому числу тромбоцитов (обобщенно цитопении) и продукции клеток крови в областях за пределами костного мозга, например, в селезенке и печени, которые в результате увеличиваются.

Введение ингибитора белка S100 для предотвращения или лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании, может предотвратить, нормализовать или уменьшить по меньшей мере один симптом, связанный с MPN. Предпочтительно введение ингибитора белка S100 для предотвращения или лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании, может предотвращать, нормализовать или уменьшать по меньшей мере один симптом, связанный с MPN-связанным фиброзом костного мозга. Предпочтительно введение ингибитора белка S100 для предотвращения или лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании, может предотвращать, нормализовать или уменьшать по меньшей мере одно явление из лейкоцитоза, спленомегалии, числа тромбоцитов, тромбоцитоза и

степени фиброза. Предпочтительно введение ингибитора белка S100 для предотвращения или лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании, может снизить степень миелофиброза.

В настоящее время не существует доступной терапии для уменьшения или предотвращения миелофиброза у пациентов, страдающих от MPN. Теперь авторы изобретения обнаружили, что с использованием ингибитора S100A8/A9 прогрессирование заболевания MPN может быть остановлено, в частности, предотвращается и даже реверсируется прогрессирование в фиброзную фазу.

Следовательно, ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор по меньшей мере одного из S100A8/A9, можно использовать для профилактики и/или уменьшения миелофиброза у субъекта, нуждающегося в этом, предпочтительно для профилактики и/или уменьшения миелофиброза у субъекта, страдающего от MPN. Кроме того или с другой стороны, ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор по меньшей мере одного из S100A8/A9, можно использовать для уменьшения 3 степени миелофиброза по меньшей мере до одной из 2, 1 или 0 степени у субъекта, нуждающегося в этом, предпочтительно у субъекта, страдающего от MPN. Ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор по меньшей мере одного из S100A8/A9, можно использовать для снижения 2 степени миелофиброза по меньшей мере до 1 степени или 0 степени у субъекта, нуждающегося в этом, предпочтительно у субъекта, страдающего от MPN. Ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор по меньшей мере одного из S100A8/A9, можно использовать для уменьшения 1 степени миелофиброза до 0 степени у субъекта, нуждающегося в этом, предпочтительно у субъекта, страдающего от MPN.

Белок S100

Авторы изобретения обнаружили, что ингибирование белка S100 можно использовать для профилактики или лечения миелопролиферативного новообразования, предпочтительно миелопролиферативного новообразования, определенного в настоящем описании выше. Белки S100 предпочтительно представляют собой семейство низкомолекулярных белков, характеризующихся двумя сайтами связывания кальция, которые имеют конформацию «спираль-петля-спираль» (тип «EF-руки»). Существует по меньшей мере 21 различных белков S100, и они кодируются семейством генов, символы которых используют префикс S100. Они считаются молекулами молекулярного паттерна, связанного с повреждением (DAMP, также называемыми аларминами). Белки S100 локализованы в цитоплазме и/или ядре широкого спектра клеток и участвуют в регуляции ряда клеточных процессов, таких как прогрессирование клеточного цикла и дифференцировка.

Белок S100 для ингибирования согласно изобретению предпочтительно представляет собой белок S100 млекопитающего, предпочтительнее белок S100 человека. Белок S100 для ингибирования предпочтительно выбирают из группы, включающей S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7 (псориазин), S100A8 (кальгранулин А), S100A9 (кальгранулин В), S100A10, S100A11, S100A12 (кальгранулин С), S100A13, S100A14, S100A15 (кебнеризин), S100A16, S100В и S100Р. Предпочтительнее белок S100 для ингибирования представляет собой белок S100А, из которого предпочтителен по меньшей мере один из S100A8 и S100A9, из которых S100A9 является наиболее предпочтительным. S100A8 и S100A9 образуют гетеродимер, называемый кальпротектином, который секретируется во время воспаления. Другие названия кальпротектина включают MRP8-MRP14, кальгранулин А и В, антиген муковисцидоза, L1, антиген 60ВВ и антиген 27Е10. В одном воплощении белок S100 для ингибирования согласно изобретению предпочтительно представляет собой гетеродимерный кальпротектин.

Ингибитор белка S100

Ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, определяется в настоящем описании как любой агент, который снижает или устраняет активность, предпочтительно специфическую активность, указанного белка S100 в клетке. Предпочтительно, активность белка S100 снижается или устраняется в клетке по меньшей мере одним путем из

- i) снижения или ингибирования функциональной активности белка S100 в клетке и
- ii) снижения или ингибирования экспрессии белка S100 в клетке.

Авторы изобретения обнаружили, что ингибирование белка S100, в частности ингибирование по меньшей мере одного из S100A8 или S100A9, можно использовать для профилактики или лечения MPN. Таким образом, специалист поймет, что изобретение не ограничивается каким-либо конкретным ингибитором белка S100, предпочтительно не ограничивается каким-либо конкретным ингибитором белка S100A8 или S100A9.

Ингибитор, определённый в настоящем описании, можно использовать при профилактике или лечении миелопролиферативного новообразования, предпочтительно миелопролиферативного новообразования, определенного в настоящем описании выше. В одном воплощении ингибитор белка S100, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, представляет собой агент, который предотвращает или уменьшает экспрессию белка S100 в клетке, например, препятствуя транскрипции и/или трансляции белка S100, например, с помощью нуклеиновых кислот ингибирующих белок S100, или векторов генной терапии, которые нарушают экспрессию белка S100. Предпочтительно

ингибитор представляет собой малую некодирующую РНК.

Неограничивающие примеры нуклеиновых кислот, ингибирующих экспрессию белка S100, включают микроРНК (miRNA) и миРНК (siRNA). Однако специалист сразу поймет, что другие типы молекул некодирующих нуклеиновых кислот могут быть пригодны в равной степени для ингибирования экспрессии белка S100, например, путем вмешательства в сплайсинг.

Ингибитором белка S100, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, может быть одна или несколько микроРНК. Ингибирующая экспрессию белка S100 микроРНК предпочтительно включает последовательность, которая комплементарна последовательности, присутствующей в эндогенном гене, кодирующем указанный белок S100. Предпочтительно зрелая микроРНК, ингибирующая белок S100, включает затравочную область на 5'-конце микроРНК, которая комплементарна последовательности в гене белка S100. Предпочтительно затравочная область включает по меньшей мере нуклеотиды 2-7 микроРНК. Затравочная область может включать 2-8 нуклеотидов зрелой микроРНК. микроРНК может включать дополнительные нуклеотиды, которые комплементарны транскрипту белка S100, например, для дополнительного спаривания со стороны 3'. Дополнительное спаривание предпочтительно в случае, если затравочная область не на 100% комплементарна последовательности в транскрипте белка S100. Следовательно, затравочная область может быть по меньшей мере примерно на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% комплементарна смежной последовательности в транскрипте белка S100. Предпочтительно последовательность по меньшей мере затравочной области микроРНК по меньшей мере частично комплементарна последовательности, присутствующей в нетранслируемой области (UTR) гена белка S100, предпочтительно по меньшей мере частично комплементарна последовательности, присутствующей в 3'-UTR. Взаимодействие между микроРНК и транскриптом белка S100 предпочтительно вызывает ингибирование трансляции или деградацию транскрипта белка S100.

Ингибитором белка S100, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, может быть одна или несколько миРНК. В одном воплощении миРНК сконструирована таким образом, что она ингибирует трансляцию транскрипта белка S100, предпочтительно путем RISC-опосредованного расщепления транскрипта. Специалист понимает, как проектировать и конструировать миРНК, нацеленные на транскрипт белка S100. Предпочтительно миРНК конструируют таким образом, что они нацелены на последовательность, специфичную для транскрипта белка S100. Длина миРНК предпочтительно составляет примерно 18-25 нт. Предпочтительно одна цепь миРНК по

меньшей мере примерно на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или примерно на 100% комплементарна смежной последовательности транскрипта белка S100. Предпочтительно одна цепь миРНК (т.е. направляющая цепь) полностью комплементарна смежной последовательности в транскрипте белка S100. Смежная последовательность в транскрипте белка S100 может присутствовать в 3'-UTR, 5'-UTR или кодирующей последовательности.

Ингибитором белка S100, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, может быть одна или несколько кшРНК (shRNA). Специалист понимает, как проектировать и конструировать кшРНК, нацеленную на транскрипт белка S100 и ингибирующую его. Предпочтительно кшРНК конструируют таким образом, что они нацелены на последовательность, которая специфична для транскрипта белка S100. кшРНК можно встроить, например, в каркас микроРНК и/или экспрессировать, например, в виде первичного транскрипта, включающего кшРНК. Процессинг транскрипта кшРНК приводит к функциональной миРНК, которая включается в комплекс RISC. Такой комплекс может впоследствии ингибировать трансляцию транскрипта белка S100, предпочтительно путем расщепления транскрипта мРНК белка S100. Предпочтительно, кшРНК включает смежную последовательность, которая имеет по меньшей мере примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или примерно 100% комплементарность смежной последовательности транскрипта белка S100. Предпочтительно такая смежная последовательность в кшРНК приводит к получению направляющей цепи миРНК после предпочтительно эндогенного процессинга кшРНК. Предпочтительно нуклеотидная последовательность в кшРНК, которая процессируется в направляющую цепь миРНК, полностью комплементарна смежной последовательности в транскрипте белка S100. Смежная последовательность в транскрипте белка S100 может присутствовать в 3'-UTR, 5'-UTR или кодирующей последовательности.

Предпочтительно, агент специфически ингибирует экспрессию по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9. Предпочтительно агент специфически ингибирует экспрессию по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, а не любого другого белка из белков S100.

Ингибирующую нуклеиновую кислоту, определенную в настоящем описании, можно химически модифицировать, например, для повышения эффективности и/или стабильности. Химическая модификация может являться, по меньшей мере, одной из модификаций сахарной составляющей, модификации оснований и фосфатной модификации. Химические модификации сахарной составляющей включают, но без ограничения, заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA), незамкнутые нуклеиновые

кислоты (UNA), 2'-дезокси, 2'-О-метил, 2'-фтор, 2'-метоксиэтил и 2'-аминоэтил. Примеры модификаций оснований включают, но без ограничения, гипоксантин, 2,4-дифтортолуол, дигидроуридин, 2'-тиоуридин и псевдоуридин. Примеры фосфатных модификаций включают, но без ограничения, фосфоротиоат, боранофосфат и пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) (см. модификации, например, в базе данных siRNAmod, Dar et al., Sci Rep. (2016); 6:20031, включенной в настоящее описание в качестве ссылки).

Ингибитор для применения в изобретении может представлять собой комбинацию ингибиторов, например, пул кшРНК, миРНК и/или микроРНК. В качестве неограничивающего примера ингибитор может включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных миРНК и/или ингибитор может включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных микроРНК, или ингибитор может включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных кшРНК.

С другой стороны или кроме того, ингибитор может включать комбинацию микроРНК и миРНК, или микроРНК и кшРНК, или миРНК и кшРНК, или комбинацию миРНК, кшРНК и микроРНК.

Ингибирующую нуклеиновую кислоту можно ввести в клетку, предпочтительно мезенхимальную стромальную клетку, предпочтительно мезенхимальную стромальную клетку, расположенную в костном мозге, с использованием любого обычного способа, известного в технике. Ингибирующую нуклеиновую кислоту можно непосредственно ввести в клетку или экспрессировать с помощью экспрессирующего вектора. Экспрессирующий вектор для использования в изобретении может включать промотор РНК-полимеразы II или III для контроля экспрессии короткой шпильковой РНК, которая впоследствии процессируется в миРНК или микроРНК, предпочтительно микроРНК или миРНК, определенные в настоящем описании. Предпочтительным экспрессирующим вектором является голая ДНК или вирусный вектор. Предпочтительная голая ДНК представляет собой плазмиду, подходящую для экспрессии ингибирующей нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем описании. Плазида относится к кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую можно встроить дополнительные сегменты ДНК, например, с помощью стандартных методов молекулярного клонирования.

В одном воплощении экспрессирующий вектор представляет собой вирусный вектор. Предпочтительным вирусным вектором является рекомбинантный вирус или вирион. В технике известно большое разнообразие вирусных векторов, которые подходят для проведения экспрессии генов в клетке. Так специалист понимает, что изобретение не ограничивается каким-либо конкретным типом вирусного вектора для введения в клетку экспрессии ингибирующей молекулы нуклеиновой кислоты, определенной в настоящем

описании. Вирусные векторы для использования в настоящем изобретении могут представлять собой любые вирусные векторы, пригодные для заражения человека или животного. Векторы могут быть модифицированы любым известным в технике способом, например, путем делеции, вставки, мутирования или модификации любых участков вируса. Вирусный вектор можно выбрать из группы, включающей ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса простого герпеса и вируса коровьей оспы. Вирусный вектор может представлять собой гибрид между двумя или большим числом векторов.

миРНК, кшРНК, микроРНК, плазмиду, экспрессирующую кшРНК, плазмиду, экспрессирующую миРНК, или плазмиду, экспрессирующую микроРНК (или предшественник микроРНК), можно соединить с носителем, подходящим для доставки в клетку. Предпочтительный носитель выбирают из группы, включающей липоплекс, липосому, полимерсому, полиплекс, дендример, неорганическую наночастицу, виросому и проникающие в клетки пептиды.

В одном воплощении ингибитор белка S100 представляет собой агент, который предотвращает или уменьшает экспрессию белка S100 в клетке, предпочтительно мезенхимальной стромальной клетке, предпочтительно мезенхимальной стромальной клетке, расположенной в костном мозге, путем вмешательства в транскрипцию транскрипта белка S100. Транскрипция может быть ингибирована путем нацеливания (например, ингибирования или активации) на эндогенный белок, регулирующий экспрессию белка S100.

В одном воплощении ингибитор, который предотвращает или уменьшает экспрессию белка S100 путем специфической экспрессии или специфического нацеливания на вектор или носитель, является селективным в отношении мезенхимальной стромальной клетки, предпочтительно мезенхимальной стромальной клетки, расположенной в костном мозге, например, кроме того или с другой стороны, специфическая экспрессия может быть достигнута, например, путем применения опухоле- или тканеспецифичных промоторов. Специфическое нацеливание может быть достигнуто, например, путем сочетания вектора или носителя со специфическим лигандом (мезенхимальной стромальной клетки).

Специалист может использовать любые обычные средства для определения того, предотвращает ли или уменьшает ингибитор экспрессию белка S100, как определено в настоящем описании, предпочтительно белка S100A8 или S100A9. Такие обычные средства могут включать, но без ограничения, секвенирование транскриптома, Q-ПЦР и/или обнаружение и, необязательно, количественное определение белка S100.

Ингибитор может снизить по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% экспрессию белка S100, предпочтительно белка S100A8 или S100A9, причем 100% указывает на полное отсутствие экспрессии белка по сравнению с экспрессией в контрольной клетке. Контрольная клетка предпочтительно представляет собой идентичную клетку или тип клетки, но не подвергается воздействию ингибитора.

В одном воплощении ингибитор S100-белка, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, представляет собой агент, которое ингибирует функциональную активность белка S100. Агентом, который ингибирует функциональную активность белка S100, может являться соединение, которое представляет собой одну или несколько малых молекул, пептид, белковую молекулу, аптамер и антитело. Предпочтительно ингибитор представляет собой малую молекулу.

Специалист может использовать любые обычные средства для определения того, ингибирует ли агент функциональную активность белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно ингибирует ли функциональную активность белка S100A8 или S100A9. Такие традиционные средства могут включать, но без ограничения, анализы ELISA, например, для измерения секреции или уменьшения воспаления, и вестерн-блоттинг (см., например, Vogl T. et al., J. Clin. Invest., 2018; 128(5): 1852-1866).

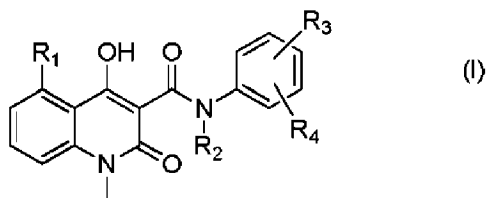
Ингибитор может ингибировать по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% функциональную активность белка S100, предпочтительно белка S100A8 или S100A9, причем 100% указывает на полное отсутствие функциональной активности по сравнению с контролем. Контролем предпочтительно является активность белка S100, предпочтительно белка S100A8 или S100A9, который не подвергается воздействию ингибитора.

Ингибитор может представлять собой антитело или его функциональный фрагмент. Предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент связывает, предпочтительно специфически связывает, белок S100, определенный в настоящем описании. Предпочтительно антитело или его функциональный фрагмент связывает, предпочтительно специфически связывает, по меньшей мере один из S100A8 и S100A9. Предпочтительно, антитело или его функциональный фрагмент связывает, предпочтительно специфически связывает, по меньшей мере один из S100A8 и S100A9 и ингибирует его функциональную активность. Предпочтительно антитело представляет собой антитело, нейтрализующее белок S100, предпочтительно антитело, нейтрализующее S100A8 и/или S100A9. Специалисту понятно, что изобретение не ограничивается каким-либо конкретным антителом или его фрагментом, которые могут связывать,

предпочтительно специфически связывать по меньшей мере один из S100A8 и S100A9. Примеры таких антител включают, но без ограничения, антитела, описанные в работах Hiratsuka et al., (Nat. Cell Biol., 2006; 8(12): 1369-75), и Vogl T. et al., см. выше), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. Предпочтительно антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело, такое как, но без ограничения, гуманизированное анти-S100A9 антитело, описанное в WO2017008153A1.

Ингибитор предпочтительно представляет собой малую молекулу. Ингибитором предпочтительно является хинолинкарбоксамид. Способы получения терапевтически активных хинолинкарбоксамидов описаны в WO 03/106424 и WO 2012/004338, включенных в настоящее описание в качестве ссылок. Дейтерированная форма хинолинкарбоксамида описана в WO 2012/175541, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Фармацевтические композиции, содержащие соль хинолинкарбоксамида, обладающие повышенной стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре, способы производства таких композиций, кристаллические соли хинолинкарбоксамидов и способы получения кристаллических солей хинолинкарбоксамидов описаны в WO 2005/074899, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Предпочтительным ингибитором является малая молекула формулы (I)



или ее фармацевтически приемлемая соль,

причем R₁ предпочтительно выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси. В некоторых воплощениях R₁ выбирают из метила, этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, фтора, хлора, брома, трифторметила и трифторметокси. В некоторых других воплощениях R₁ выбирают из этила, н-пропила, изопропила, метокси, этокси, хлора, брома, трифторметила и трифторметокси. В еще других воплощениях R₁ выбирают из этила, метокси, этокси, хлора и трифторметокси. В некоторых отдельных воплощениях R₁ представляет собой метокси.

Группа R₂ предпочтительно представляет собой радикал C1-C4 алкил, который может быть разветвленным или линейным. В некоторых воплощениях R₂ представляет собой радикал C1-C3 алкил. В некоторых воплощениях R₂ представляет собой метил или этил. В некоторых отдельных воплощениях R₂ представляет собой метил.

Группу R₃ предпочтительно выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, брома, трифторметила и трифторметокси. В некоторых воплощениях R₃ выбирают из метила, метокси, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси. В некоторых воплощениях R₃ представляет собой водород или трифторметил. В некоторых воплощениях R₃ представляет собой трифторметил.

R₄ предпочтительно выбирают из водорода, фтора и хлора, при условии, что R₄ выбирают из фтора и хлора только тогда, когда R₃ выбирают из фтора и хлора. В некоторых воплощениях R₄ представляет собой водород или фтор. В некоторых воплощениях R₄ представляет собой водород.

В некоторых отдельных воплощениях в соединении формулы (I)

R₁ и R₄ имеют значения, указанные выше;

R₂ представляет собой метил или этил, в частности метил; и

R₃ выбирают из метила, метокси, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси.

В некоторых других отдельных воплощениях в соединении формулы (I)

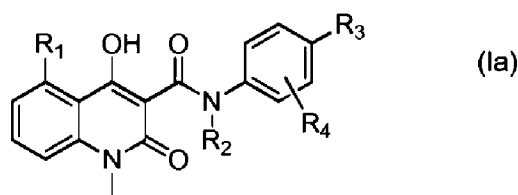
R₁ имеет значения, указанные выше;

R₂ представляет собой метил или этил, в частности метил;

R₃ выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси; и

R₄ представляет собой H.

В некоторых воплощениях R₃ находится в пара-положении, т.е. соединение для применения, как определено в настоящем описании, может быть представлено формулой (Ia)



в которой R₁, R₂, R₃ и R₄ предпочтительно имеют значения, указанные выше.

Например, в некоторых воплощениях соединения формулы (Ia)

R₁ и R₄ предпочтительно имеют значения, указанные выше;

R₂ предпочтительно представляет собой метил или этил, в частности метил; и

R₃ предпочтительно выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси.

В некоторых других отдельных воплощениях в соединении формулы (Ia)

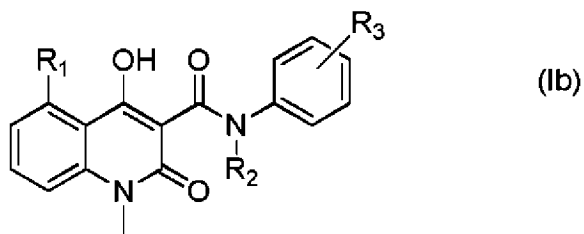
R₁ предпочтительно имеет значения, указанные выше;

R₂ предпочтительно представляет собой метил или этил, в частности метил;

R₃ предпочтительно выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси; и

R₄ предпочтительно представляет собой H.

Как отмечено в настоящем описании выше, в некоторых воплощениях R₄ представляет собой водород. В таких воплощениях соединение формулы (I) может быть представлено формулой (Ib)



в которой R₁, R₂ и R₃ предпочтительно имеют значения, указанные выше.

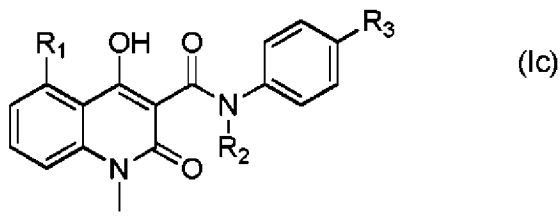
Например, в некоторых воплощениях соединения формулы (Ib)

R₂ предпочтительно представляет собой метил или этил, в частности метил;

R₃ предпочтительно выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси; и

R₁ предпочтительно имеет значения, указанные выше.

В некоторых отдельных воплощениях соединения формулы (I) R₃ находится в пара-положении, а R₄ представляет собой H, и соединение для применения, определенного в настоящем описании, тогда может быть представлено формулой (Ic)



в которой R₁, R₂ и R₃ имеют значения, указанные выше.

В некоторых отдельных воплощениях соединения формулы (Ic)

R₂ предпочтительно представляет собой метил или этил, в частности метил;

R₃ предпочтительно выбирают из метила, метокси, водорода, фтора, хлора, трифторметила и трифторметокси;

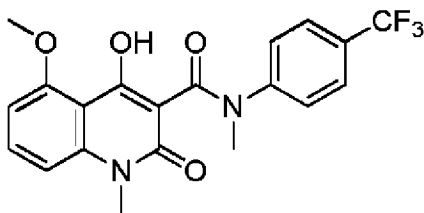
а

R₁ предпочтительно имеет значения, указанные в настоящем описании.

Для целей настоящего изобретения любую ссылку на соединение формулы (I) следует понимать как ссылку на соединение любой из формул (Ia), (Ib) и (Ic), если иное не указано или не очевидно из контекста.

В одном воплощении соединение формулы (I) представляет собой 4-гидрокси-5-

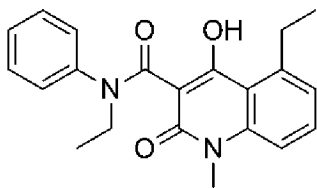
метокси-N,1-диметил-2-оксо-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид (тасквинимод) структурной формулы:



Предпочтительным ингибитором является тасквинимод или его функциональный эквивалент. Предпочтительным ингибитором является тасквинимод или его аналоги, например, малая молекула формулы (I), определенной в настоящем описании. Предпочтительно ингибитором является тасквинимод. Тасквинимод (ABR-215050) является известным ингибитором S100A9 (см., например, JT Isaacs et al., «*Identification of ABR-215050 as lead second generation quinoline-3-carboxamide anti-angiogenic agent for the treatment of prostate cancer*». The Prostate, 66 (16): 1768–78). Соединения формулы (I), их фармацевтически приемлемые соли, их дейтерированные формы, их кристаллические соли и фармацевтические композиции, содержащие соединения и их соли, а также способы получения таких соединений, их солей, дейтерированных форм и фармацевтических композиций, содержащих соединения и их соли, описаны в WO 99/55678, WO 00/03991, WO 03/106424, WO 2005/074899, WO 2012/004338, WO 2012/175541, WO 2016/042112 и WO 2016/078921, полностью включенных в настоящую заявку путем отсылки.

В некоторых воплощениях любая ссылка на соединение формулы (I) также охватывает его дейтерированную форму. Как упоминалось в настоящем описании выше, дейтерированная форма тасквинимода описана в WO 2012/175541. Рядовой специалист в данной области техники будет способен получить аналогично дейтерированные соединения формулы (I), следуя описанию в указанной WO. Таким образом, в некоторых воплощениях соединение формулы (I) обогащено дейтерием в части R₂ формулы (I) по меньшей мере на 70%, предпочтительнее по меньшей мере на 90%. Например, в некоторых воплощениях R₂ представляет собой метил, обогащенный дейтерием по меньшей мере на 70%, предпочтительнее по меньшей мере на 90%. В некоторых отдельных воплощениях соединение формулы (I) представляет собой тасквинимод, обогащенный дейтерием по амид-N-метильной группе по меньшей мере на 70%, предпочтительнее по меньшей мере на 90%. В некоторых других воплощениях соединение формулы (I) является недейтерированным, имеющим содержание дейтерия, соответствующее содержанию дейтерия в природе.

В одном воплощении соединение представляет собой хинолон-3-карбоксамид паквинимод (ABR- 25757), имеющий структурную формулу



Паквинимод является известным ингибитором S100A9 (см., например, Schelbergen RF et al. *Ann. Rheum. Dis.*, 2015; 74(12): 2254-8.). Следовательно, в некоторых воплощениях ингибитор для применения согласно изобретению имеет структурную формулу (I), в которой R₁ и R₂ представляют собой этил, и в которой R₃ и R₄ представляют собой водород.

В одном воплощении низкомолекулярный ингибитор белка S100 представляет собой ингибитор бромдомена BET. Предпочтительным ингибитором бромдомена BET является тиенотриазолодiazепин, предпочтительно известный тиенотриазолодiazепин JQ1. JQ1 известен в технике как подавляющий S100A8 и мРНК S100A9 и уровни белка (Stewart et al., *Bone Brain Res.*, 2018, 31; 2018: 5742954).

Ингибитор белка S100 для применения согласно изобретению, предпочтительно белка S100A8 и/или белка S100A9, предпочтительно не ограничивается ингибитором, который непосредственно влияет на функциональную активность и/или экспрессию белка S100. Кроме того или с другой стороны, ингибитор может блокировать или активировать клеточный компонент позитивно (upstream) или негативно (downstream) (например, белок или РНК), что впоследствии приводит к ингибированию экспрессии и/или ингибированию функциональной активности белка S100, предпочтительно белка S100A8 и/или белка S100A9.

В качестве неограничивающего примера ингибитор может блокировать последующую передачу сигналов рецептора TLR4, что впоследствии приводит к ингибированию экспрессии S100A8/S100A9 и/или функциональной активности S100A8/S100A9. Известные малые молекулы, которые блокируют рецептор TLR4, включают, но без ограничения, CLI-095 (ТАК-242), раскрытый, например, в Li M. et al., 2006. *Mol. Pharmacol.*, 69: 1288-1295, и Kawamoto T. et al., 2008, *Eur. J. Pharmacol.*, 584(1):40-8.

Как другой неограничивающий пример, ингибитор может блокировать взаимодействие между RAC1/RAC2, что впоследствии приводит к ингибированию экспрессии S100A8/S100A9 и/или функциональной активности S100A8/S100A9. Известные малые молекулы, которые блокируют взаимодействие RAC1/RAC2, включают,

но без ограничения, CAS № 1177865-17-6 (химическая формула тригидрохлорид N⁶-[2-[[4-(диэтиламино)-1-метилбутил]амино]-6-метил-4-пиримидинил]-2-метил-4,6-хинолиндиамина).

Дозировка

В одном воплощении ингибитор белка S100, предпочтительно ингибитор, определенный в настоящем описании выше, предназначен для профилактики или лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании выше, причем ингибитор вводят в общей суточной дозе примерно 0,05 – 10 мг.

Понятно, что термины «суточная доза» и «общая суточная доза» используются в настоящем описании взаимозаменяемо. В частности, общая суточная доза может вводиться в одной или нескольких единицах (дозах) в день, как подробно описано в настоящем описании ниже.

Предпочтительно общая суточная доза является терапевтически эффективной и предпочтительно также хорошо переносится, например, не вызывая побочного эффекта. Побочный эффект в настоящем описании определяется как эффект, терапевтический или неблагоприятный, который является вторичным по отношению к предполагаемому. Побочный эффект предпочтительно является вредным эффектом. Побочные эффекты можно классифицировать как легкие (1 степень), умеренные (2 степень), тяжелые (3 степень) или потенциально опасные для жизни (4 степень). Предпочтительно вводимая общая суточная доза хорошо переносится, например не вызывает никаких побочных эффектов 1, 2, 3 и/или 4 степени, предпочтительно вводимая общая суточная доза не вызывает никаких побочных эффектов 1, 2 и/или 3 степени, и предпочтительнее вводимая общая суточная доза не вызывает никаких побочных эффектов 2 или 3 степени.

Предпочтительно вводимая общая суточная доза не вызывает очень распространенного, распространенного, необычного, редкого или очень редкого побочного эффекта. Предпочтительнее вводимая доза не вызывает очень распространенного, распространенного, необычного или редкого побочного эффекта, еще предпочтительнее вводимая общая суточная доза не вызывает очень распространенного, распространенного или необычного побочного эффекта, и даже предпочтительнее вводимая общая суточная доза не вызывает очень распространенного или распространенного побочного эффекта. Наиболее предпочтительно вводимая общая суточная доза не вызывает очень распространенного побочного эффекта.

В настоящем описании побочный эффект определяется как очень распространенный, когда вероятность (шанс) возникновения побочного эффекта составляет $\geq 1/10$, в настоящем описании побочный эффект определяется как

распространенный (частый), когда вероятность возникновения побочного эффекта составляет $\geq 1/100$ и $< 1/10$, в настоящем описании побочный эффект определяется как необычный (нечастый), когда вероятность возникновения побочного эффекта составляет $\geq 1/1000$ и $< 1/100$, в настоящем описании побочный эффект определяется как редкий, когда вероятность возникновения побочного эффекта составляет $\geq 1/10000$ и $< 1/1000$, и в настоящем описании побочный эффект определяется как очень редкий, когда вероятность возникновения побочного эффекта составляет $< 1/10000$.

Ингибитор можно вводить в рекомендуемой максимальной клинической дозировке или в более низких дозах. Уровни дозировки ингибитора, определенного в настоящем описании, могут изменяться с тем, чтобы получить желательный терапевтический ответ, в зависимости от способа введения, тяжести заболевания и реакции пациента. При введении в комбинации с любыми другими активными агентами активные агенты можно получить в виде отдельных композиций, которые дают в одно и то же время или в разное время, или активные агенты можно вводить в виде единой композиции.

Общая суточная доза ингибитора белка S100 предпочтительно находится в диапазоне 0,05 – 10 мг. Предпочтительно общая суточная доза низкомолекулярного ингибитора белка S100, определенного в настоящем описании, находится в диапазоне 0,05 – 10 мг. Предпочтительно общая суточная доза тасквинимода находится в диапазоне 0,05 – 10 мг.

Предпочтительно общая суточная доза находится в диапазоне примерно 0,05 – 10 мг, 0,06 – 9 мг, 0,07 – 8 мг, 0,08 – 7 мг, 0,09 – 6 мг, 0,1 – 5 мг, 0,2 – 4 мг, 0,3 – 3 мг, 0,4 – 2 мг, 0,5 – 1 мг или 0,25 – 1 мг. Предпочтительно общая суточная доза составляет примерно 0,10 мг, 0,15 мг, 0,20 мг, 0,25 мг, 0,30 мг, 0,40 мг, 0,50 мг, 0,60 мг, 0,70 мг, 0,80 мг, 0,90 мг, 1,0 мг, 1,2 мг, 1,4 мг, 1,6 мг, 1,8 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 3,0 мг, 3,5 мг, 4,0 мг, 4,5 мг или примерно 5,0 мг. Предпочтительно общая суточная доза составляет примерно 0,52 мг, 0,5 мг или 1 мг. Предпочтительно общая суточная доза составляет примерно 1 мг.

Общую суточную дозу можно разделить на несколько приемов в день. Такие отдельные дозы могут различаться по количеству. Например, для каждой общей суточной дозы первая доза может содержать большее количество соединения, чем вторая доза, или наоборот. Однако предпочтительно соединение вводят в схожих или равных дозах. Ингибитор можно вводить 1, 2, 3, 4, 5 раз в день или чаще. Предпочтительно ингибитор вводят один раз в день. Ингибитор также можно вводить один раз в каждые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше дней.

Способы введения

Ингибитор или композицию, включающие ингибитор, определенный в настоящем

описании, можно вводить энтерально, перорально, парентерально, сублингвально, путем ингаляции (например, в виде аэрозолей или спреев), ректально или местно, предпочтительно в виде препаратов в стандартных единицах, содержащих обычные нетоксичные фармацевтически или физиологически приемлемые носители, адъюванты и среды, какие желательны. Предпочтительно ингибитор или композицию, включающие ингибитор, вводят перорально.

Например, подходящие способы введения включают пероральный, подкожный, трансдермальный, трансмукозальный, ионофоретический, внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, интраперитонеальный, интраназальный (например, через слизистую оболочку носа), субдуральный, ректальный, введение через желудочно-кишечный тракт и т.п., и непосредственно в конкретный или пораженный орган или ткань, например, в ткань злокачественной опухоли. Для доставки в центральную нервную систему можно использовать спинальное и эпидуральное введение или введение в желудочки головного мозга. Местное введение может также включать использование трансдермального введения, такого как трансдермальные пластыри или устройства для ионофореза. Термин «парентеральный», используемый в настоящем описании, включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интратеральные инъекции или методы инфузии.

Ингибитор белка S100, определенный в настоящем описании, можно смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями, адъювантами и средами, подходящими для желаемого способа введения. Ингибитор, как он определен в настоящем описании, можно вводить, добавляя через желудочные или чрескожные трубки.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к ингибитору, определенному в настоящем описании выше, для применения при лечении, предупреждении или подавлении симптомов, связанных с MPN, путем введения эффективной общей суточной дозы в течение определенного периода времени.

Лекарственная форма для перорального применения может представлять собой твердую пероральную лекарственную форму. Класс твердых пероральных лекарственных форм состоит в основном из таблеток и капсул, хотя в уровне техники известны и другие формы, которые могут быть в равной степени подходящими. При использовании в виде твердой пероральной лекарственной формы ингибитор или композиция, включающие ингибитор, определенный в настоящем описании, могут, например, вводиться в форме таблетки с немедленным высвобождением (или капсулы и т.п.) или таблетки с замедленным высвобождением (или капсулы и т.п.). В контексте изобретения можно использовать любые подходящие твердые лекарственные формы с немедленным

высвобождением или замедленным высвобождением, что будет очевидно для специалиста.

Композицию, описанную в настоящем описании, для применения, описанного в настоящем описании, можно вводить в твердой форме, в жидкой форме, в аэрозольной форме или в форме таблеток, пилюль, порошковых смесей, капсул, гранул, препаратов для инъекции, кремов, растворов, суппозиториев, клизм, ирригаций, эмульсий, дисперсий, пищевых премиксов, и в других подходящих формах. Композицию также можно вводить в липосомном препарате. Композицию, включающую ингибитор белка S100, можно вводить в виде пролекарств, где пролекарство подвергается трансформации в организме обработанного субъекта в форму, которая является терапевтически эффективной. В технике известны другие способы введения.

Предпочтительно композицию, включающую соединение, определенное в настоящем описании, предпочтительно сульфонамид, как он определен в настоящем описании, вводят перорально или парентерально.

Композиции

В одном аспекте изобретение относится к композиции, включающей ингибитор белка S100, определенный в настоящем описании. Композиция может подходить для применения при культивировании клеток, предпочтительно при культивировании клеток животных, предпочтительнее при культивировании клеток млекопитающих. Композиция предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию. Композиция предпочтительно предназначена для применения при профилактике или лечении миелопролиферативного новообразования (MPN), предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании выше.

Композиция может включать один тип соединения, определенного в настоящем описании, или комбинацию соединений, определенных в настоящем описании, например комбинацию ингибиторов белка S100. Композиция может включать по меньшей мере 1, 2, 3 или больше различных типов ингибиторов белка S100.

Композиция может включать ингибитор белка S100 вместе с физиологически приемлемым носителем. В частности, композицию можно составить как фармацевтическую композицию, получая состав с добавками, такими как фармацевтически или физиологически приемлемые эксципиенты, носители и среды.

Подходящие фармацевтически или физиологически приемлемые эксципиенты, носители и среды могут включать технологические агенты и модификаторы и усилители доставки лекарственных средств, такие как, например, фосфат кальция, стеарат магния, тальк, моносахариды, дисахариды, крахмал, желатин, целлюлоза, метилцеллюлоза,

карбоксиметилцеллюлоза натрия, декстроза, гидроксипропил-Р-циклодекстрин, поливинилпирролидинон, низкоплавкие воски, ионообменные смолы и т.п., а также комбинации любых двух или больше из них. Другие подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Pub. Co., New Jersey (1991), и «Remington: The Science and Practice of Pharmacy», Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 20-е издание (2003), 21-е издание (2005) и 22-е издание (2012), включенных в настоящее описание путем отсылки.

Описанные в настоящем описании фармацевтические композиции для применения согласно изобретению, могут находиться в любой форме, подходящей для предполагаемого способа введения, включая, например, раствор, суспензию или эмульсию. В предпочтительном воплощении композицию, определенную в настоящем описании, вводят в твердой форме или в жидкой форме.

Твердые лекарственные формы для перорального применения могут включать капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах композицию, предпочтительно композицию, включающую ингибитор белка S100, описанный в настоящем описании, можно смешать по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы могут также включать дополнительные вещества, иные, чем инертные разбавители, например, смазывающие вещества, такие как стеарат магния. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы могут также включать буферизирующие вещества. Кроме того, таблетки и пилюли можно получить с энтеросолюбильными покрытиями. Предпочтительно композиция находится в форме капсулы.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут включать фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, обычно используемые в технике, такие как вода или физиологический раствор. Такие композиции могут также включать адъюванты, такие как смачиватели, эмульгаторы и суспендирующие вещества, циклодекстрины и подсластители, ароматизаторы и отдушки.

Жидкие носители обычно используются при получении растворов, суспензий и эмульсий. Жидкие носители/жидкие лекарственные формы, предусмотренные для применения настоящего изобретения на практике, включают, например, воду, физиологический раствор, фармацевтически приемлемый(е) органический(ие) растворитель(и), фармацевтически приемлемые масла или жиры и т.п., а также смеси двух или большего их числа.

Композицию, описанную в настоящем описании, можно перед введением смешать

с водным раствором. Водный раствор должен быть подходящим для введения, и такие водные растворы хорошо известны в технике. Кроме того, в технике известно, что пригодность водного раствора для введения может зависеть от способа введения. Водный раствор представляет собой изотонический водный раствор. Изотонический водный раствор предпочтительно является почти (или полностью) изотоническим по отношению к плазме крови. В еще более предпочтительном воплощении изотонический водный раствор представляет собой физиологический раствор.

Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтически приемлемые добавки, такие как солюбилизаторы, эмульгаторы, питательные вещества, буферы, консерванты, суспендирующие вещества, загустители, регуляторы вязкости, стабилизаторы, корригенты и т.п. Предпочтительными корригентами являются подсластители, такие как моносахариды и/или дисахариды. Подходящие органические растворители включают, например, одноатомные спирты, такие как этанол, и многоатомные спирты, такие как гликоли. Подходящие масла включают, например, соевое масло, кокосовое масло, оливковое масло, сафлоровое масло, хлопковое масло и т.п.

Препараты для инъекций, например, стерильные водные или маслянистые суспензии для инъекций, можно получить в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор для инъекций или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, как раствор в пропиленгликоле. Среди приемлемых сред и растворителей, которые можно использовать, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используются стерильные нелетучие масла. Для такой цели можно использовать любое успокаивающее нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при получении препаратов для инъекции находят применение жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Суппозитории для ректального введения композиции, определенной в настоящем описании, можно получить путем смешивания с подходящим нераздражающим эксципиентом, таким как масло какао и полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при ректальной температуре и, следовательно, будут плавиться в прямой кишке и высвобождать соединение и/или блокирующий иммунные контрольные точки агент.

Для парентерального введения носитель также может представлять собой эфир жирной кислоты, такой как этилолеат, изопропилмиристат и т.п. Композиции для применения в настоящем изобретении также могут находиться в форме микрочастиц, микрокапсул, липосомальных инкапсулятов и т.п., а также комбинаций их любых двух или больше.

Системы доставки с пролонгированным действием, замедленным высвобождением или регулируемым высвобождением можно использовать для введения одной или нескольких композиций, описанных в настоящем описании, таких как матричная система с регулируемой диффузией или разрушающаяся система, как описано, например, в Lee, «Diffusion-Controlled Matrix Systems», pp. 155-198, и Ron and Langer, «Erodible Systems», pp. 199-224, в «Treatise on Controlled Drug Delivery», A. Kydonieus Ed., Marcel Dekker, Inc., New York 1992. Матрица может представлять собой, например, биоразлагаемый материал, который может самопроизвольно разлагаться *in situ* и *in vivo*, например, путем гидролиза или ферментативного расщепления, например, протеазами. Система доставки может представлять собой, например, встречающийся в природе или синтетический полимер или сополимер, например, в форме гидрогеля. Примеры полимеров с расщепляемыми связями включают сложные полиэфиры, полиортоэфиры, полиангидриды, полисахариды, полифосфоэфиры, полиамиды, полиуретаны, полиимидокарбонаты и полифосфазены.

Композицию, определенную в настоящем описании, также можно вводить в форме липосом. Как известно в технике, липосомы обычно получают из фосфолипидов или других липидных веществ. Липосомы образуются моно- или многослойными гидратированными жидкими кристаллами, которые диспергированы в водной среде. Можно использовать любой нетоксичный, физиологически приемлемый и метаболизируемый липид, способный образовывать липосомы. Композиции по настоящему изобретению в форме липосом могут содержать, кроме соединения, агент, блокирующий иммунные контрольные точки, или комбинацию соединения и агента, блокирующего иммунные контрольные точки, определенного в настоящем описании, стабилизаторы, консерванты, эксципиенты и т.п. Предпочтительными липидами являются фосфолипиды и фосфатидилхолины (лецитины), как природные, так и синтетические. Способы образования липосом известны в технике. См., например, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N. Y., p. 33 et seq (1976).

Фармацевтическая композиция, определенная в настоящем описании, т.е. включающая ингибитор белка S100, может включать препарат в стандартной дозе, причем стандартная доза представляет собой дозу, достаточную для получения терапевтического или профилактического эффекта от миелопролиферативного новообразования,

определенного в настоящем описании, и/или количество, эффективное для снижения или подавления экспрессии белка S100 в клетке, предпочтительно мезенхимальной стромальной клетке, предпочтительно мезенхимальной стромальной клетке, расположенной в костном мозге.

Стандартная доза может являться достаточной в качестве разовой дозы для получения профилактического и/или терапевтического эффекта при MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании. С другой стороны, стандартная доза может представлять собой дозу, вводимую периодически в ходе лечения MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании. Во время курса лечения можно контролировать концентрацию композиций у субъекта, чтобы гарантировать поддержание желательного уровня.

Хотя соединение для применения, описанное в настоящем описании, можно вводить в качестве единственного активного фармацевтического агента, его также можно использовать в комбинации с одним или несколькими другими агентами, известными в технике для применения для лечения или профилактики MPN.

В настоящее время целью лечения MPN является снижение числа увеличенных клеток крови и помощь в контроле за любыми осложнениями, такими как кровотечение или свертывание крови.

Венесекция (или флеботомия) представляет собой процедуру, при которой из кровотока удаляется контролируемое количество крови. Для многих людей, особенно молодых пациентов и тех, у кого заболевание протекает в легкой форме, регулярная венесекция (каждые несколько месяцев) может представлять все, что необходимо для контроля за их заболеванием в течение многих лет. Еще одним выбором является химиотерапия, главным образом, миелосупрессивными средствами, такими как гидроксимочевина (пероральная капсульная химиотерапия). Молодым пациентам для того, чтобы помочь контролировать продукцию клеток крови, иногда назначают интерферон. Интерферон можно вводить в виде инъекции под кожу (подкожная инъекция). Многим людям назначают ежедневные дозы аспирина, который, как показано, снижает риск тромбоза. Препаратом, используемым для снижения высокого количества тромбоцитов, является анагрелида гидрохлорид (агрилин). Анагрелид можно принимать перорально в форме капсул.

Миелофиброз обычно связан с гипертрофией селезенки (спленомегалией). Для уменьшения гипертрофии селезенки можно использовать химиотерапию, например, гидроксимочевиной или талидомидом. В некоторых случаях можно рассматривать хирургическое удаление селезенки (спленэктомия). Также для уменьшения размера

селезенки можно давать небольшие дозы облучения. Обычно это обеспечивает временное облегчение примерно на три-шесть месяцев. Миелофиброз обычно считается неизлечимым. Некоторым молодым пациентам, у которых есть подходящий донор, может быть предложена аллогенная (донорская) трансплантация стволовых клеток. Трансплантация стволовых клеток влечет за собой значительные риски и подходит лишь для небольшого числа молодых пациентов (обычно моложе 60 лет). Другим распространенным методом лечения миелофиброза являются ингибиторы JAK2, которые действуют путем блокирования активности белка JAK2, что может привести к редукции спленомегалии и ослабленным симптомам. Они также работают у пациентов с миелофиброзом без мутации JAK2. Ряд ингибиторов JAK2 находятся в стадии клинических испытаний. Проблема в том, что некоторые пациенты никогда не реагируют на ингибирование JAK2 или со временем становятся резистентными. Более того, известно, что ингибиторы JAK2 вызывают цитопению (уменьшение количества зрелых клеток крови), что делает ингибиторы JAK2 непригодными для применения при лечении пациентов с миелофиброзом в комбинации с цитопенией.

До настоящего изобретения не существовало лечения, доступного для субъекта, страдающего от миелофиброза в комбинации с цитопенией. Таким образом, ингибиторы белка S100, описанные в настоящем описании, в частности, ингибиторы белка S100A8/A9, описанные в настоящем описании, могут быть особенно применимыми для лечения субъекта, страдающего от миелофиброза в комбинации с цитопенией.

Кроме того или с другой стороны, ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении MPN, определенного в настоящем описании, можно использовать в комбинации по меньшей мере с одним методом из лучевой терапии, химиотерапии и трансплантации стволовых клеток. Трансплантация стволовых клеток предпочтительно представляет собой трансплантацию стволовых клеток костного мозга.

Ингибитор белка S100 для использования в профилактике или лечении MPN, определенного в настоящем описании, можно использовать в комбинации с миелосупрессором. Ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении MPN, определенного в настоящем описании, можно использовать в комбинации с агентом, выбранным из группы, включающей гидроксимочевину, талидомид, интерферон, аспирин, гидрохлорид анагрелида и ингибитор JAK2, или их любой комбинацией. Ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении MPN, определенного в настоящем описании, можно использовать в комбинации с ингибитором JAK2. Предпочтительным ингибитором JAK2 может являться руксолитиниб или федратиниб. Авторы изобретения обнаружили, что комбинированное ингибирование на

воспаления центральной оси (inflammatory axis) через S100A8/S100A9 в комбинации с руксолитинибом приведет к более эффективному ингибированию MPN-ассоциированного воспаления (данные не приводятся).

Кроме того или с другой стороны, ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении MPN, определенного в настоящем описании, можно использовать в комбинации, по меньшей мере, с одной операцией из веносекции, спленэктомии и трансплантации стволовых клеток.

Другие типичные агенты, применимые в комбинации с ингибитором для лечения MPN, включают, но без ограничения, кофермент Q, витамин E, идебенон, MitoQ, EPI-743, витамин K и его аналоги, нафтохиноны и их производные, другие витамины и антиоксидантные соединения.

Когда дополнительные активные агенты используются в комбинации с ингибитором, определенным в настоящем описании, дополнительные активные агенты, как правило, можно использовать в терапевтических количествах, указанных в Physicians' Desk Reference (PDR) 53rd Edition (1999), 53-ье издание (1999), который включен в настоящее описание в качестве ссылки, или в таких терапевтически полезных количествах, которые могут быть известны рядовому специалисту в данной области техники.

Композицию, описанную в настоящем описании, можно получить в виде лекарственного или косметического препарата или в различных других средах, таких как пищевые продукты для людей или животных, включая медицинские пищевые продукты и пищевые добавки.

«Лечебное питание» представляет собой продукт, предназначенный для специфического диетического лечения заболевания или состояния, при котором существуют особые требования к питанию. В качестве примера, но без ограничения, лечебные пищевые продукты могут включать витаминные и минеральные композиции, подаваемые через питательную трубку (такое введение называется энтеральным введением).

«Пищевая добавка» должна означать продукт, который предназначен для дополнения рациона человека и обычно предоставляется в форме пилюли, капсулы и таблетки или подобного препарата. В качестве примера, но без ограничения, пищевая добавка может включать один или несколько из следующих ингредиентов: витамины, минералы, травы, растительные компоненты; аминокислоты, пищевые вещества, предназначенные для дополнения рациона путем увеличения общего потребления с пищей, и концентраты, метаболиты, компоненты, экстракты или комбинации любых из

вышеназванных. Пищевые добавки также могут быть включены в пищевые продукты, включая, но без ограничения, пищевые батончики, напитки, порошки, крупы, готовые продукты, пищевые добавки и конфеты.

Таким образом, рассматриваемую композицию можно смешивать с другими физиологически приемлемыми материалами, которые можно принимать внутрь, включая, но без ограничения, пищевые продукты. Кроме того или с другой стороны, композиции для применения, описанные в настоящем описании, можно вводить перорально в комбинации с (раздельным) приемом пищи.

Набор из частей

Одна или несколько фармацевтических композиций, определенных в настоящем описании, могут содержаться в наборе из частей. В одном аспекте изобретение относится к набору из частей, включающих одну или несколько композиций, предпочтительно фармацевтических композиций, определенных в настоящем описании выше. Предпочтительно набор из частей, определенный в настоящем описании, является набором для применения при лечении MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании.

Необязательно набор из частей также включает информационный листок. Информационный листок может включать инструкции по применению. Кроме того или с другой стороны, информационный листок может представлять собой по меньшей мере информационный листок с информацией для пациента и кратким описанием характеристик продукта (SmPC). Предпочтительно инструкции точно определяют применение ингибитора белка S100, определенного в настоящем описании, или композиции, включающей ингибитор, для профилактики или лечения MPN, предпочтительно MPN, как определено в настоящем описании.

Способ диагностики

MPN, определенный в настоящем описании, может характеризоваться миелопролиферацией и последующим миелофиброзом. В начале миелофиброза пациенты часто слишком больны, чтобы начинать какое-либо лечение. Следовательно, ключевое значение имеет определение на ранней стадии, имеется ли у субъекта миелофиброз или ожидается его развитие. Присутствие или повышенное присутствие белка S100, предпочтительно белка S100A8/A9, в биологическом образце может указывать на миелопролиферативное новообразование. Более того, увеличение содержания белков S100, предпочтительно по меньшей мере, одного из S100A8 и S100A9, указывает на прогрессирование заболевания от миелопролиферативной фазы к фазе миелофиброза. Действительно, авторы изобретения обнаружили, что уровни S100A8/S100A9

увеличиваются с прогрессированием заболевания и прогрессирующим фиброзом. Таким образом, белки S100 и, в частности, S100A8/A9 могут функционировать в качестве надежного биомаркера для прогнозирования перехода у индивидуума от миелопролиферативной фазы к фазе миелофиброза, угрожающей жизни.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к (диагностическому) способу идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, включающему стадию обнаружения присутствия белка S100, предпочтительно S100A8 или S100A9, в биологическом образце.

Способ может быть способом *in vivo*. Предпочтительно способ является способом *ex vivo*, предпочтительно способом *in vitro*. В таком воплощении белок S100, предпочтительно по меньшей мере один из S100A8 и S100A9, функционирует как диагностический маркер миелопролиферативного новообразования. Предпочтительно белок S100 является диагностическим маркером тяжести миелопролиферативного новообразования, например, степени фиброза 0, 1, 2 или 3. MPN со степенью фиброза 0 характеризуется миелопролиферацией, в то время как MPN со степенями фиброза 1, 2 и 3 характеризуются повышенной тяжестью миелофиброза.

Термины «диагностический маркер», «маркер для диагностики» и «маркер для постановки диагноза», используемые в настоящем описании, предназначены для обозначения биологического параметра, способного к (способствующего) идентификации миелопролиферативного новообразования. Точнее, присутствие или повышенное присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8/A9, указывает на миелопролиферативное новообразование (MPN), причем предпочтительно MPN выбирают из группы, включающей первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию, истинную полицитемию, хронический нейтрофильный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и мастоцитоз. Предпочтительно присутствие или повышенное присутствие в биологическом образце белка S100, определенного в настоящем описании, указывает на первичный миелофиброз, предпочтительно на первичный миелофиброз 0, 1, 2 или 3 степени.

Повышение в биологическом образце количества белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8/A9, может указывать на то, прогрессирует ли заболевание от миелопролиферативной фазы (т.е. «миелофиброза 0 степени») к миелофиброзной фазе (т.е. миелофиброзу 1, 2 или 3 степени). Например, в то время как в миелопролиферативной фазе медианная выживаемости при истинной полицитемии (PV) и эссенциальной тромбоцитемии (ET)

составляет примерно 15 лет, она резко снижается до примерно 1,5 лет, как только заболевание прогрессирует до миелофиброза (MF), что сравнимо с медианной выживаемостью при запущенных солидных опухолях. Следовательно, биомаркер S100, в частности S100A8/A9, по изобретению может помочь определить группы риска у пациентов и индивидуально контролировать течение заболевания со временем. Кроме того, биомаркер специфически позволяет определить «точку риска» ускорения заболевания, которая является критической для принятия клинических решений. В то время как при обычной диагностике фиброз выявляется только на довольно поздних стадиях, биомаркер S100 предсказывает фиброзную трансформацию (пример на фиг. 5).

Биологический образец может представлять собой любой биологический образец, подходящий для обнаружения белка S100, определенного в настоящем описании. Биологический образец предпочтительно представляет собой образец костного мозга или образец крови. Присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно присутствие по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, предпочтительно обнаруживают в образце сыворотки или плазмы. С другой стороны или кроме того, присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере, одного из S100A8 и S100A9, обнаруживают в образце костного мозга. Предпочтительно белок S100 обнаруживают в мезенхимальных стромальных клетках костного мозга. Предпочтительно присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, обнаруживают в одной или нескольких клетках с фиброзом. Предпочтительно присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, обнаруживают в одной или нескольких клетках МСК-1. Предпочтительно присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, обнаруживают в одной или нескольких клетках МСК-2. Предпочтительно, присутствие белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, обнаруживают в одной или нескольких клетках Gli1+ МСК.

Обнаруженный уровень белка S100 в биологическом образце можно сравнить с уровнем белка S100 в контрольном образце. Уровень белка S100 в контрольном образце может быть известен в технике, и контрольный образец не обязательно включать в диагностический метод. С другой стороны, способ также включает обнаружение белка S100, предпочтительно S100A8 или S100A9, в контрольном образце. Контрольный образец предпочтительно представляет собой биологический образец от индивидуума, предпочтительно образец крови или костного мозга, не страдающего от MPN. Увеличение

уровня белка S100, предпочтительно S100A8 или S100A9, может указывать на MPN. Субъекту может быть поставлен диагноз MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании, если уровень белка S100 повышен по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или больше.

С другой стороны или кроме того, контрольный образец представляет собой биологический образец, предпочтительно образец крови или костного мозга, взятый у того же индивидуума, причем образец получен в более ранний момент времени. Следовательно, уровень белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно по меньшей мере, одного из S100A8 и S100A9, можно контролировать с течением времени и сравнивать с ранее полученным биологическим образцом от того же индивидуума. Контрольным образцом может являться образец, взятым у того же индивидуума, причем контрольный образец был получен по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев раньше или, например, по меньшей мере на 1, 2, 3, 4 или 5 лет раньше. Контрольным образцом может являться образец, взятый у того же индивидуума, контрольный образец которого был получен самое большее на 1, 2, 3, 4 или 5 лет раньше или, например, самое большее на 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев раньше.

С использованием (диагностического) метода по изобретению субъекту может быть поставлен диагноз MPN даже до начала фиброзной фазы, когда уровни белка S100, предпочтительно уровень по меньшей мере одного из S100A8 и S100A9, могут быть повышенными в биологическом образце еще до того, как фиброз костного мозга можно обнаружить (как показано на фиг. 5). В одном воплощении с течением времени могут быть взяты несколько биологических образцов, например, для мониторинга прогрессирования MPN. Уровень белка S100, предпочтительно белка S100A8 и/или белка S100A9, можно контролировать в биологическом образце по меньшей мере один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или реже. С другой стороны или кроме того, уровень белка S100, предпочтительно белка S100A8 и/или белка S100A9, можно контролировать по меньшей мере раз каждые 1, 2, 3, 4 или 5 лет или реже.

Авторы изобретения обнаружили, что повышение уровней белка S100, в частности уровней белка S100A8 и/или S100A9, коррелирует с прогрессированием MPN. Таким образом, повышение уровней белка S100, в частности уровней белка S100A8/A9, можно использовать в качестве биомаркера тяжести MPN и для стратификации пациентов. Изобретение относится к диагностическому методу для стратификации пациентов, включающему стадию обнаружения присутствия белка S100, предпочтительно белка S100, определенного в настоящем описании, путем воздействия на биологический образец агента, определенного в настоящем описании. Биомаркер может служить биомаркером

для стратификации пациентов.

Субъекта можно быть распределить по наличию первичного миелофиброза 0 степени, 1 степени, 2 степени или 3 степени. У субъекта может быть диагностирован первичный миелофиброз 0 степени, если уровень белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышен по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, предпочтительно по сравнению с контрольным образцом. У субъекта может быть диагностирован первичный миелофиброз 1 степени, если уровень белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышен по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, предпочтительно по сравнению с контрольным образцом. У субъекта может быть диагностирован первичный миелофиброз 2 степени, если уровень белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышен по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, предпочтительно по сравнению с контрольным образцом. У субъекта может быть диагностирован первичный миелофиброз 3 степени, если уровень белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышен по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, предпочтительно по сравнению с контрольным образцом.

У субъекта может иметься миелопролиферативное новообразование, которое характеризуется избыточной продукцией зрелых клеток крови (миелопролиферация). Авторы изобретения обнаружили, что повышение уровней белка S100, предпочтительно S100A8/A9, указывает на то, что миелопролиферативная фаза переходит в фазу миелофиброза. Следовательно, способом по изобретению у субъекта можно диагностировать повышенный риск прогрессирования в фазу миелофиброза, когда уровни белка S100 повышаются, предпочтительно повышаются по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, и предпочтительно по сравнению с контрольным образцом. Предпочтительно, у субъекта, страдающего от MPN, имеющего миелопролиферативную фазу, можно диагностировать повышенный риск прогрессирования в фазу миелофиброза, когда уровни белка S100 повышаются, предпочтительно повышаются по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10 раз или более, и предпочтительно по сравнению с контрольным образцом. (Диагностический) способ по изобретению может включать стадию обнаружения присутствия белка S100, предпочтительно белка S100, определенного в настоящем описании, путем воздействия на биологический образец агента, определенного в настоящем описании.

С другой стороны или кроме того, диагностический способ может быть сопутствующим диагностическим способом, например, для мониторинга лечения и/или для определения эффективности лечения, предпочтительно лечения, определенного в настоящем описании. Предпочтительно изобретение относится к способу идентификации

субъекта, который получит благоприятный результат от лечения ингибитором белка S100, определенного в настоящем описании, предпочтительно способ будет идентифицировать субъекта, который получит благоприятный результат от лечения ингибитором белка S100A8 и/или S100A9, определенного в настоящем описании. Способ предпочтительно включает стадию обнаружения присутствия белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, в биологическом образце, предпочтительно биологическом образце, определенном в настоящем описании. Способ предпочтительно является способом *ex vivo*. Предпочтительно, субъекта идентифицируют как получающего пользу от лечения, когда присутствие белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышен по сравнению с контрольным образцом. Контрольный образец предпочтительно является контрольным образцом, определенным в настоящем описании. Предпочтительно субъект, получающий пользу от лечения, страдает от первичного миелофиброза 0, 1, 2 или 3 степени.

В предпочтительном способе по изобретению субъект может быть отнесен к группе чувствительных или нечувствительных к ингибитору белка S100, определенного в настоящем описании. Предпочтительно в способе по изобретению субъект может быть отнесен к группе чувствительных или нечувствительных к ингибитору белка S100A8/A9, определенного в настоящем описании.

В одном аспекте изобретение относится к агенту для идентификации субъекта, страдающего от или подверженного риску миелопролиферативного новообразования, причем агент связывается с белком S100, предпочтительно с белком S100A8 или S100A9. Предпочтительно агент специфически связывается по меньшей мере с одним из белков S100A8 и S100A9. Предпочтительнее агент специфически связывается по меньшей мере с одним из белков S100A8 и S100A9, а не с каким-либо из других белков S100.

Агент, связывающий диагностический маркер, описанный в настоящем описании, можно выбрать из группы, включающей малую молекулу, антитело, нуклеиновую кислоту, белковую молекулу, аптамер или их антигенсвязывающий фрагмент. Такие агенты также могут включать обнаруживаемый сигнал или метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентная молекула или биотин.

Агент, связывающийся с белком S100, предпочтительно белком S100A8 или S100A9, определенным в настоящем описании, может являться ингибитором белка S100, предпочтительно ингибитором, определенным в настоящем описании выше. Агент, связывающийся с белком S100, предпочтительно с белком S100A8 или S100A9, определенным в настоящем описании, может представлять собой антитело или его функциональный фрагмент, определенные в настоящем описании выше. С другой стороны, агент, связывающийся с белком S100, предпочтительно с белком S100A8 или

S100A9, определенным в настоящем описании, может представлять собой малую молекулу, предпочтительно малую молекулу, определенную в настоящем описании выше. Агентом, связывающимся с белком S100, предпочтительно с белком S100A8 или S100A9, определенным в настоящем описании, может представлять собой тасквинимод, предпочтительно обогащенный дейтерием тасквинимод.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для обнаружения биомаркера, описанного в настоящем описании, может избирательно связываться с биомаркером, описанным в настоящем описании. Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с белком S100, описанным в настоящем описании, причем предпочтительно белок S100 является по меньшей мере одним из S100A8 или S100A9.

Стадию обнаружения диагностического маркера можно выполнить с использованием любого общепринятого способа, известного в уровне техники. Как неограничивающий пример, диагностический маркер можно обнаружить с использованием агента, способного связывать диагностический маркер, описанный в настоящем описании.

Неограничивающие примеры обнаружения биомаркера, определенного в настоящем описании, включают, но без ограничения, (количественную) ПЦР, иммуноферментный анализ (ELISA), гель-электрофорез, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), белковая матрица BioCD для измерения масс, поверхностно-усиленную рамановскую спектроскопию (SERS), колориметрический анализ, электрохимический анализ и флуоресцентные способы.

Изобретение также относится к набору, включающему агент, определенный в настоящем описании, и к применению агента, определенного в настоящем описании, для идентификации субъекта, который страдает от MPN, предпочтительно MPN, определенного в настоящем описании.

Настоящее изобретение описано выше со ссылкой на ряд примерных воплощений, как показано на чертежах. Модификации и альтернативные реализации некоторых частей или элементов возможны и включены в объем охраны, определенный в прилагаемой формуле изобретения.

Надписи на фигурах

Фиг. 1. Мезенхимальные стромальные клетки -1 и -2 перепрограммированы в сторону профиброзного профиля при первичном миелофиброзе, индуцированном JAK2V617F, и позитивно регулируют S100a8/S100a9. (A) Репрезентативное окрашивание ГЭ и ретикулином (увеличение 20×) костного мозга, проанализированного с помощью

секвенирования РНК единичной клетки, при фиброзе костного мозга, индуцированном JAK2(V617F), или контроле (JAK2 EV, n=4 мыши на условие). (B) Визуализация с использованием UMAP кластеризации цветовых кодов ниши негемопоэтических клеток костного мозга, идентифицированных с помощью неконтролируемой кластеризации (n = 1292 клетки). Пунктирными линиями выделены четыре основные популяции клеток. (C) Гребнеобразный график, сравнивающий экспрессию характерных наборов генов матрисома в кластерах MCK и OLC, сравнивающий экспериментальное (JAK2(V617F); синий) и контрольное (JAK2(EV); красный) состояние. Для агрегированной экспрессии генов кумулятивную экспрессию генов каждого набора генов на клетку нормализуют, как описано (Butler, A. et al. (2018), *Nature biotechnology*, 36(5), pp. 411-420) (Butler et al., 2018). Значимость определяют с помощью анализа обогащения конкурентного набора генов. (D) Нормализованная дифференциальная экспрессия (ThPO против EV) указанных генов в четырех популяциях MCK, сгруппированных по биологическим процессам/терминам (критерий суммы рангов Уилкоксона, двусторонний).

Фиг. 2. Мезенхимальные стромальные клетки у пациентов с первичным миелофиброзом, индуцированным JAK2V617F, приобретают профиброзный профиль и позитивно регулируют S100A8/S100A9. (A) Репрезентативное окрашивание ГЭ и ретикулином (увеличение 20×) костного мозга, проанализированного с помощью секвенирования РНК единичной клетки у пациента с JAK2(V617F)-первичным миелофиброзом (PMF) (MF 2 степени) и 2 контрольных пациентов (лимфома, не задействовавшая костный мозг). (B) Визуализация с использованием UMAP кластеризации цветных кодов ниши негемопоэтических клеток костного мозга, идентифицированной с помощью неконтролируемой кластеризации. Пунктирными линиями выделены четыре основные популяции клеток. Сравнение популяций при PMF и нормальном костном мозге показывает, что все клеточные популяции присутствуют в обоих состояниях. (C) Гребнеобразный график, сравнивающий экспрессию 1) поддержки кроветворения, 2) сигнатуры MCK, 3) характерных коллагенов у пациента с PMF (синий) и у контроля (красный). Для агрегированной экспрессии генов кумулятивную экспрессию генов каждого набора генов на клетку нормализуют, как описано (Butler et al., см. выше) (Butler et al., 2018). Значимость определяют с помощью анализа обогащения конкурентного набора генов. (D) Нормализованная дифференциальная экспрессия генов (ThPO против EV) S100A8/S100A9 (критерий суммы рангов Уилкоксона, двусторонний). (E) Взаимодействия рецептор-лиганд, проанализированные с помощью CellPhoneDB, показывают усиленное взаимодействие между S100A8 / S100A9 и RAC1 / RAC2, и RAC1 действительно является позитивно регулируемым рецептором как у мышиных моделей,

так и в образцах пациентов при PMF, показывая, что это также является интересной терапевтической мишенью после S00A8 / S100A9.

Фиг. 3. S100A8/S100A9 являются биомаркерами прогрессирования заболевания MPN. (A) Количественное определение S100A8 в плазме (периферической крови) способом ELISA. Пациентов без гематологической злокачественности (n=96) сравнивают с пациентами с верифицированным MPN (n=155; t-критерий, двусторонний; A) и с различными стадиями ретикулинового фиброза (B; Односторонний ANOVA, post-hoc парный t-критерий). Резкое повышение уровней S100A8 с началом фиброза (от MF0 до MF1) указывает на то, что S100A8 показывает прогрессирование/начало фиброза костного мозга. (C) Репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание клеток S100A8+ (увеличение 20×) в контрольных костных мозгах (миелофиброз/ретикулин степень 0) и у пациентов с MPN с фиброзом костного мозга различной степени. (D) Количественная оценка экспрессии S100A8 в строме пациентов в соответствии с недавно установленной оценкой S100A8: 0 = отсутствие экспрессии в строме; 1 = слабая экспрессия в веретенообразных клетках и клетках, выравнивающих кости; 2= экспрессия в интерстициальном пространстве; 3= сильное окрашивание.

Фиг. 4. Лечение тасквинимодом при фиброзе, вызванном JAK2(V617F), нормализует спленомегалию и лейкоцитоз и уменьшает фиброз в костном мозге. (A) Мыши, которым трансплантировали JAK2(V617F)- или JAK2(WT)-трансдуцированные skit+ клетки, получали лечение тасквинимодом (ABR-215050) (30 мг/кг/сут в питьевой воде) или средой от 5 недель до 10 недель и от 13 до 20 недель после трансплантации. N=7-10/группа. (B) Число лейкоцитов в периферической крови, измеренное со временем. (C) Общие изображения селезенки мышей, трансплантированных клетками JAK2(V617F)- или JAK2(WT)-BM, получавших лечение тасквинимодом или носителем. (D) Масса селезенки, нормализованная к массе мыши. (E) Число тромбоцитов в периферической крови, измеренное со временем. (F) Репрезентативные изображения окрашивания ретикулином у мышей, которым трансплантированы клетки JAK2(V617F)- или JAK2(WT)-BM, получавших лечение тасквинимодом или средой. 10×, столбчатая шкала: 250 мкм. (G) Средний уровень ретикулина у мышей, которым трансплантировали JAK2(V617F)- или JAK2(WT)-BM клетки, получавших лечение тасквинимодом или средой. (H) Репрезентативные изображения окрашивания ГЭ у контрольных и обработанных мышей. 20×, 100 мкм.

Фиг. 5. Схематическое представление применения S100A8/A9 в качестве целевых биомаркеров. При наблюдении за гетерогенной группой пациентов с МПН обычно берут биопсию костного мозга и образцы крови. Уровни S100A8/S100A9 будут определять в

крови и/или костном мозге с течением времени/во время лечения. Биомаркер S100A8/S100A9 поможет не только определить группы риска у пациентов, но и индивидуально контролировать течение заболевания со временем. Биомаркер специфически определяет «точку риска» ускорения заболевания, которая является критической для принятия клинических решений. В то время как фиброз при обычной диагностике проявляется только на довольно поздних стадиях, биомаркер может определить фиброзную трансформацию. Кроме того, это будет критическим для мониторинга реакции на терапию и будет сопутствующей диагностикой, например, при лечении тасквинимодом.

Примеры

Материалы и способы

Трансдукция

Для ретровирусной и лентивирусной трансдукции обогащенные c-kit⁺ клетки от 8-12-недельных мышей дикого типа (WT) выделяют путем измельчения компактного слоя кости, и численность клеток линейно сокращают с помощью магнитной сепарации (Miltenyi Biotec). Клетки c-kit⁺ BM предварительно стимулируют в течение 24 часов в среде CellGro (Corning) с добавлением мышинового фактора стволовых клеток (m-Scf, 50 нг/мл, Peprotech) и мышинового тромбопоэтина (m-Tpo, 50 нг/мл, Peprotech). Онкоретровирусные векторы псевдотипируют по экотропной оболочке и получают с использованием стандартных протоколов. Ретровирусную трансдукцию проводят в чашках для культивирования клеток, сенсibilизированных ретронектином (Takara Bio), загруженных неконцентрированным вирусом. Клетки ресуспендируют в среде, содержащей вирус, в присутствии 4 мкг/мл полибрена при 37°C в течение минимум 24 часов. Лентивирусные частицы получают путем временной трансфекции лентивирусной плазмидой вместе с плазмидами, упаковывающими рSPAX и VSFG, с использованием фугена. Лентивирусные и ретровирусные частицы концентрируют ультрацентрифугированием при 4°C.

Выделение стромальных клеток костного мозга для секвенирования малых цитоплазматических РНК (scRNA)

После умерщвления кости (бедря, тазобедренный сустав, позвоночник) измельчают в PBS/10% FCS на льду. Клетки диссоциируют путем фильтрации через нейлоновую сетку с 70-мкм ячейками. Клетки для магнитно-активированной сортировки инкубируют с биотинилированными антителами, направленными против клеточных линий (CD11b, GR1, NK1.1, TER119, CD4, CD8 и B220), CD45, CD71 и CD41 (BioLegend; 6 мкг/мл/1e7 клеток), в течение 10 минут. После центрифугирования в течение 5 минут при 300 × g и 4°

клетки ресуспендируют в 80 мкл/1e7 клеток, ФСБ/10% фетальной телячьей сыворотке (FCS), смешивают с 20 мкл/1e7 клеток магнитными антибиотинowymi шариками (Biolegend) и инкубируют в течение 15 минут при 4°C при легком перемешивании. Для магнитного истощения клетки ресуспендируют в 1 мл ФСБ/10% FCS и помещают в магнитное устройство для сепарации клеток (BD) на 15 минут при 4°C. Для дополнительной очистки отрицательную фракцию переносят в новую пробирку FACS и помещают в магнитное устройство для сепарации еще на 30 минут. Супернатант центрифугируют в течение 5 минут при 300×g при 4°C.

FACS-окрашивание и сортировка стромальных клеток костного мозга для секвенирования scRNA

Клетки ресуспендируют в 300 мкл ФСБ/2% FCS и окрашивают при 4°C в течение 20 минут. Промывку проводят путем добавления 1 мл ФСБ/2% FCS и центрифугирования в течение 5 минут при 300 × g, 4°C. После ресуспендирования и добавления хехста (1:10000) отрицательные клетки линия/CD45/Ter119 сортируют в 50 мкл минимальной эссенциальной среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко, (DMEM)/10% FCS (BD Aгia III). Неокрашенные клетки используют в качестве отрицательного контроля для определения дискриминационного окна. Все антитела получают от Biolegend. Используют следующие конъюгированные с флуорохромом антитела: CD41-APC-Cy7, CD3-APC-Cy7, CD11b-APC-Cy7, Gr1-APC-Cy7, Ter119-APC-Cy7, B220-APC-Cy7, CD45.1-APC-Cy7, CD45.2-APC-Cy7, Sca1-PerCP, CD31-APC, CD51-PE.

Получение библиотеки единичных клеток и секвенирование

Библиотеки получают с использованием наборов реагентов Chromium Single Cell 3' Reagents Kits (v2): Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v2 (PN-120237), Chromium Single Cell A Chip Kit v2 (PN-120236) и мультиплексного набора i7 Multiplex Kit (PN-120262) (10× Genomics), и следуя руководству пользователя Single Cell 3' Reagent Kits (v2) (часть руководства № CG00052, Rev D). Завершенные библиотеки секвенируют на платформе Novaseq6000 (Illumina), нацеливая на минимум 50000 считываний на клетку, используя 10× рекомендуемое Genomics количество циклов (28-8-0-91 циклов).

Анализ данных RNAseq единичных клеток

Авторы изобретения используют cellranger (версия 2.1.1) для выравнивания считываемых данных по геному мыши mm10 и для обнаружения клеток с параметрами по умолчанию. Затем авторы использовали Seurat (v2.3.4, v3.1.0) для высокоуровневого анализа scRNA-seq (Satija, R. et al. (2015), Nature biotechnology, 33(5), pp. 495-502). Авторы изобретения отфильтровали клетки, оставив только клетки с низким количеством митохондриальных генов (< 0,03), низким количеством рибосомных генов (< 0,6). Авторы

удалили клетки с более 30000 UMI, поскольку они представляют собой потенциальные дубликаты. Наконец, отфильтровали гены, обнаруженные менее чем в 30 клетках. Затем регрессировали клеточный цикл, соотношение чисел митохондрий, рибосом и UMI и выполнили log-нормализацию количества считанных данных с использованием Seurat. Затем данные экспериментов ThPO (или Jak2) объединили с каноническим корреляционным анализом (CCA), основанным на первых 15 CC (Butler et al., см. выше). Затем авторы выполнили кластеризацию с SNN $k = 15$ и получили представление t-SNE с перплексией (perplexity), установленной на отметке 75. Выполнили дифференциальный анализ экспрессии генов с помощью Seurat, чтобы найти специфические для кластера гены или гены, изменяющиеся между различными фенотипами.

GO и анализ обогащения путей основаны на clusterProfiler (версия 3.12.0; Yu, G. et al. (2012), Omics: a journal of integrative biology, 16(5), pp. 284–287), и CAMERA from edgeR (Version 3.26.7; McCarthy, D. J., Chen, Y. and Smyth, G. K. (2012), Nucleic acids research, 40 (10), pp. 4288–4297). Авторы изобретения также предложили наборы генов, описывающие «поддержку кроветворения», «фенотип предшественника МСК», «неколлагенозный внеклеточный матрикс (ECM)» и «коллагенозный ECM». Анализ GSEA предварительно ранжированных списков был выполнен, как описано (версия 4.0; Subramanian, A. et al. (2005), «Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(43), pp. 15545–15550). Все P-значения скорректированы с помощью поправки Бенджамини-Хохберга.

Количественное определение S100A8 в образцах плазмы человека

Образцы от пациентов собраны и предоставлены Университетской клиникой Гамбург-Эппендорф (УКЭ); Университетской клиникой RWTH, Аахен, и университетом. Образцы деидентифицированы в момент включения. Все пациенты дали информированное согласие, и сбор данных выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией. Контрольная плазма получена у института клинической химии в медицинском центре Эразмус в Роттердаме. Избыточный материал собран у дерматологических и кардиологических пациентов после диагностики в соответствии с этикой голосования MEC-2018-1445 и обработан в день сбора. У всех испытуемых не было в анамнезе какой-либо гематологической или негематологической злокачественности или ее признаков. Плазму выделяли из цельной обработанной антикоагулянтом ЭДТК крови центрифугированием ($2000 \times g$, 7 минут) и хранили при -80°C . Образцы осторожно размораживали на льду и центрифугировали в течение 5 минут при $2500 \times g$ перед дальнейшей обработкой. Образцы разбавляли 1:100 и определяли

концентрацию S100A8 количественно с использованием ELISA Human S100A8 DuoSet (R&D Systems, DY4570-05) в соответствии с инструкциями производителя.

Гистологический и иммуногистологический анализ

Органы мышцы фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 24 часов и переносят в 70% этанол. Бедренные кости декальцинируют в 10% растворе ЭДТА/трис-HCl (pH 6,6) в течение 72 часов, обезвоживают и заливают парафином. Окрашивание H&E и ретикулином проводят на срезах толщиной 4 мкм в соответствии с установленными стандартными протоколами.

Отбирают для гистологического исследования биоптаты костного мозга человека у пациентов, чью плазму использовали для количественного определения S100A8 в плазме, из архивных образцов ткани пациентов, пропитанных парафином, из Биобанка д-ра Г. Буше на кафедре патологии Ганновской медицинской школы, Ганновер, Германия. Биопсию в основном брали во время более ранней госпитализации. Биоптаты костного мозга фиксируют в течение 24 часов с использованием ганновского раствора (12% забуференного формальдегида плюс 64% метанола), декальцинируют (ЭДТК), обезвоживают и погружают в парафин. Контрольные препараты костного мозга приобретают в отделении патологии Медицинского центра Эразмус. Все контрольные пациенты демонстрируют нормальные характеристики костного мозга и имеют признаки или историю болезни гематологических злокачественных новообразований.

Для иммуногистохимического анализа S100A8 извлечение антигена выполняют с использованием цитратного буфера в обычной лабораторной микроволновой печи (Vector, раствор для демаскирования антигена). Срезы обрабатывают 3% H₂O₂ и блокируют с помощью набора для блокирования авидин/биотин (Vector), и затем инкубируют с первичным антителом (кроличье анти-S100A8: ab92231 (Abcam), 1:200; кроличье анти-CD56: RBK050 (Zytomed Systems), 1:100) в течение одного часа при комнатной температуре. Бiotинилированное моноклональное козье антикроличье антитело (Vector) используют в качестве вторичного антитела в течение 30 минут при комнатной температуре. Препараты инкубируют с комплексом АВ в течение 30 минут при комнатной температуре, промывают и инкубируют еще 10 минут с субстратом ДАБ. Препараты окрашивают гематоксилином и закрепляют с помощью покровного стекла с использованием заливочной среды DPX (Sigma).

Статистический анализ

Статистический анализ – за исключением данных по RNAseq единичных клеток – проводят с использованием или версии GraphPad Prism, или R версии 3.6.1. Данные представляют в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка средней величины (SEM). Две

независимые группы с (приблизительно) нормально распределенными выборками сравнивают с помощью непарного t-критерия. Когда нормальность нельзя допустить, используют критерий суммы рангов Уилкоксона. Для ≥ 2 групп используют ANOVA с post-hoc парным t-критерием и поправкой Бонферрони для проверки множественных гипотез.

Мыши

Для исследований JAK2V617F клетки WT BM трансдуцируют ретровирусом JAK2(V617F) (JAK2) или контрольным ретровирусом рMIG (контроль: пустой вектор JAK2) и трансплантируют облученным 10,5 Гр 8-10-недельным самкам-реципиентам B6.SJL. Мышей произвольно распределяют по группам трансплантации. Мышей из ранней когорты ThPO умерщвляют через 5 недель после трансплантации, в то время как мышей из поздней когорты ThPO умерщвляют через 10 недель после трансплантации. Мышей, используемых в эксперименте с JAK2, умерщвляют через 28 недель после трансплантации BM, когда уровни гемоглобина снижаются из-за различной фенотипической тяжести JAK2V617F.

Периодически у мышей берут кровь через подчелюстные кровотечения в пробирки Microtainer, покрытые K₂EDTA (Becton Dickinson, NJ, USA), и выполняют полный анализ крови на гематологической системе Horiba SciI Vet abc Plus.

Мыши после трансплантации

Для исследований тасквинимода WT мышей-реципиентов (n=7-10/группа) подвергают летальному облучению (10,5 Гр) и получают клетки skit⁺, трансдуцированные ретровирусным вирусом JAK2^(V617F)- или JAK2^(WT). Для лечения тасквинимод (ABR-215050, Biorbyt) вводят с питьевой водой в дозе 30 мг/кг/день, растворенной в стерилизованной в автоклаве воде с 3% сахарозы. Тасквинимод сначала растворяют в ДМСО и смешивают с 3% сахарозой, 2% ПЭГ300 (Sigma) в воде. Группы, обработанные средой, получают воду, обработанную ДМСО, ПЭГ300, с 3% сахарозой. Бутылки для питья обновляют дважды в неделю. Лечение начинают через 5 недель после трансплантации до 10 недель после трансплантации и возобновляют через 13 недель после трансплантации до умерщвления через 20 недель после трансплантации. Мышей распределяют по группам трансплантации и лечения произвольно.

Результаты

Анализ микроокружения костного мозга на единичные клетки подтверждает, что MCK-1 и -2 являются клетками, стимулирующими фиброз

Мутация JAK2V617F обнаруживается у большинства (50-60%) пациентов с PMF. Ретровирусная экспрессия мутации JAK2V617F в трансплантированных HSPC приводит к

фенотипу MPN, включая спленомегалию из-за экстрамедуллярного гемопоэза и развитие миелофиброза после короткой задержки с высокой степенью проникновения (Mullally, A. et al. (2012), *Hematology/oncology clinics of North America*, 26(5), pp. 1065–1081; Schneider, R. K. et al. (2017), *Cell stem cell*, 20(6), pp. 785–800.e8). Таким образом, авторы изобретения трансплантировали смертельно облученным мышам или *c-kit*⁺ HSCP, экспрессирующие мутацию JAK2V617F, или контрольный пустой вектор (EV). Примерно через 24 недели после трансплантации гистология костного мозга показывает тяжелый фиброз, характеризующийся толстыми перекрещивающимися ретикулин-положительными волокнами, и также тяжелым остеосклерозом, указывающим на миелофиброз 3 степени (фиг. 1A). Неконтролируемая кластеризация 1292 высококачественных клеток негемопоэтической ниши приводит к идентификации 8 различных кластеров/популяций (фиг. 1B): 1-4) кластеры мезенхимальных стромальных клеток (MCK-1: адипогенные, MCK-2: остеогенные, MCK-3: переходные, MCK-4: с высоким интерфероном), 5) и 6) кластеры предшественников шванновских клеток (SCP; 1: немиелинизирующие SCP, nmSCP; 2: миелинизирующие SCP, mSCP), 7) клетки остеобластной линии (OLC) и 8) артериальные клетки (AC). MCK-1 и MCK-2 показывают самую высокую позитивную регуляцию белков внеклеточного матрикса (ECM), в частности «корового матрисома» и коллагенов, подтверждая, что эти две популяции MCK являются клеточными драйверами фиброзной прогрессии и при фиброзе приобретают характеристики миофибробластов (фиг. 1C). Наиболее значительно дерегулируемые гены в MCK можно сгруппировать в 1) негативно регулируемые гены и 2) позитивно регулируемые гены с начинающим проявляться фенотипом MPN (фиг. 1D). Негативно регулируемые гены включают 1) маркеры MCK (*Vcam*, *Lepg*, *Adipoq*) и 2) гемопоэз-поддержку (*Kitl*, *Il7*, *Igf1*, *Cxcl12*, *Csfl*, *Bmp4*). В частности, MCK-1 демонстрирует весьма значительную негативную регуляцию маркеров MCK и генов, участвующих в регуляции гемопоэтических стволовых клеток. Значительная негативная регуляция *Vcam1* происходит в MCK-1, MCK-2 и -3, что также указывает на пространственную активацию и миграцию MCK, так как VCAM1 играет центральную роль в прочной адгезии MCK к ECM. Позитивно регулируемые гены определяют по четырем основным биологическим процессам: 1) секретируемые факторы (*S100a8*, *S100a9*, *Pdgfa*), 2) остеогенез (*Mgp*, *Fndc1*), 3) неоангиогенез (*Vegfa*, *C3*) и 4) синтез ECM (*Col8a1*, *Colla1*). Интересно, что среди секретируемых факторов алармины *S100a8/S100a9*, молекулярные паттерны, связанные с опасностью (DAMP), которые, как известно, способствуют воспалительным реакциям, значимо позитивно регулируются в их экспрессии в MCK-1 и -2, субпопуляциях, демонстрирующих наиболее значительные изменения.

Анализ отдельных клеток микроокружения костного мозга у пациентов с первичным миелофиброзом (PMF/MPN) подтверждает, что MSC являются клетками, стимулирующими фиброз, и позитивно регулируемыми S100A8/S100A9

Авторы изобретения стремились подтвердить результаты транскрипционных изменений в микроокружении костного мозга в биопсии костного мозга пациента. Отдельные клетки микроокружения костного мозга выделяли у пациента с PMF с миелофиброзом 2 степени (прогрессирующим) из небольшого кусочка пункционной биопсии костного мозга и у двух сопоставимых по возрасту контрольных пациентов с периферической лимфомой без содействия костного мозга. Анализ ГЭ костного мозга показал гиперцеллюлярный костный мозг у пациента с PMF с диспластическими мегакариоцитами и толстыми грубыми черными волокнами при окрашивании ретикулином (фиг. 2A). Напротив, контрольные пациенты показывают нормальный по клеткам костный мозг без наличия каких-либо волокон. Неконтролируемая кластеризация высококачественных клеток негемопоетической ниши приводит к идентификации 5 различных кластеров/популяций (abuehf 2B): 1) мезенхимальные стромальные клетки (MSC), 2) мегакариоциты (Meg), 3) фибробласты (Fib), 4) миелоидные/гранулоцитарные (myel) и 5) шванновские клетки (SC). Точно так же, как показано на мышинной модели PMF/MPN МСК функционально перепрограммированы, потеряли свою поддержку гемопоэза (поддержание нормального кроветворения) и сигнатуру МСК и являлись клетками, стимулирующими фиброз, значимо позитивно регулируемыми коллагены (фиг. 2C). Интересно, и снова точно так же, как показано на мышинной модели, МСК, которые обычно вообще не экспрессируют S100A8/S100A9, показали сильную позитивную регуляцию S100A8/S100A9 (фиг. 2D). Это указывает на то, что позитивная регуляция S100A8/S100A9 является специфичным для заболевания/ специфичным для MPN механизмом, который может быть как маркером заболевания, так и терапевтической мишенью. При проверке взаимодействие S100A8 с рецепторами в прямом направлении, становится очевидно, что в основном усиливается взаимодействие с RAC1/RAC2 (фиг. 2E).

S100A8 как биомаркер прогрессирования заболевания/начала фиброза при MPN

Авторы изобретения задались вопросом, может ли S100A8 служить маркером прогрессирования фиброза костного мозга (человека), так как они также наблюдали повышенную экспрессию S100a8/S100a9 в МСК на мышинных моделях уже с предварительным фиброзом (по сравнению с контролем), которая затем значительно увеличивалась на стадиях фиброза почти во всех клетках ниши, предполагая, что S100A8 является чувствительным маркером прогрессирования заболевания/фиброза.

Поэтому авторы изобретения количественно определили S100A8 в образцах плазмы (периферической крови) у пациентов с MPN ($n = 155$) и сопоставимых по возрасту пациентов без первичного гематологического заболевания ($n = 96$) с помощью ELISA. S100A8 значительно повышен у пациентов с MPN (фиг. 3A) и четко обозначает переход от MF0 к MF1 и более высоким степеням MF в целом, указывая на S100A8 как на чувствительный биомаркер начала или прогрессирования фиброза при PMF (при последующем взятии образцов; фиг. 3B). В предыдущей работе авторы изобретения связали повышенную экспрессию S100A8 в строме (при МДС) со снижением поддержки гемопоэза (Ribezzo, F. et al. (2019), *Leukemia*, 33(7), pp. 1759-1772), подчеркивая, что S100A8 является хорошим маркером для перепрограммирования стромы от гемопоэз-поддержки к фиброзной трансформации, в частности, при последующем наблюдении за пациентами.

Авторы изобретения дополнительно провели иммуногистохимический анализ S100A8 в биопсиях костного мозга пациентов и контроля (фиг. 3C). В контрольных биопсиях костного мозга (MF0) S100A8 специфически маркирует нейтрофилы (S100A8 0 степени). Уже при низких степенях фиброза S100A8 экспрессируется не только в кроветворных клетках, но и положительно окрашивается в интерстиции (1-2 степень), в то время как при прогрессирующем фиброзе (MF3) стромальные клетки сильно окрашены положительно (3 степень). Количественная оценка показателя S100A8 показывает, что он коррелирует с тяжестью заболевания, отражаемой степенью MF (фиг. 3D).

Тасквинимод в качестве ингибитора S100A8/S100A9 улучшает фенотип MPN и уменьшает интенсивность фиброза костного мозга

Для того, чтобы дополнительно подтвердить роль S100A8/S100A9 в инициации и прогрессировании фиброза, авторы изобретения попытались использовать ингибитор S100A9, известный как тасквинимод (ABR-215050), для мышей, у которых развивается JAK2(V617F)-опосредованный миелофиброз. Тасквинимод, хинолиновое соединение с антиангиогенной и противоопухолевой активностью, находящееся на стадии исследования на предмет применимости при солидных опухолях (Isaacs et al., 2006, выше), связывается с белком S100A9 и препятствует его взаимодействию с рецепторами TLR4 и RAGE. Тасквинимод при лечении вводили через питьевую воду, начиная с 5 недель после трансплантации, до умерщвления через 20 недель после трансплантации с перерывом в лечении через 10 недель после трансплантации для минимизации вредного воздействия на нормальную функцию гранулоцитов (фиг. 4A).

Самое главное, что у мышей JAK2^(V617F), получающих тасквинимод, не развивается MPN-специфический лейкоцитоз, который наблюдают у мышей, получающих JAK2^(V617F).

среду (фиг. 4B). Тяжелая спленомегалия, которая является основным клиническим проявлением у пациентов с PMF, наблюдалась у мышей, получающих среду JAK2^(V617F), но полностью нормализуется при лечении тасквинимодом (фиг. 4C-D).

Авторы изобретения наблюдали прогрессирующее увеличение числа периферических тромбоцитов до 10 недель после трансплантации у мышей JAK2^(V617F), за которым последовало резкое снижение числа тромбоцитов, связанное с прогрессирующей заменой кроветворных клеток в костном мозге (фиг. 4E).

Самое главное, что у мышей JAK2^(V617F), получавших тасквинимод, не развивается тромбоцитоз. Кроме того, лечение тасквинимодом у мышей JAK2^(V617F) снижает степень фиброза по сравнению с мышами, получавшими JAK2^(V617F)-среду, у которых развивается фиброз 2-3 степени и остеосклероз (фиг. 4F-H), действительно показывая, что ингибирование S100A8/S100A9 с помощью тасквинимода оказывает поразительный эффект на уменьшение опасных для жизни симптомы у пациентов с MPN/PMF.

Выводы

- S100A8/S100A9 значимо позитивно регулируется в плазме крови пациентов с MPN
- S100A8/S100A9 при MPN/PMF позитивно регулируются в клетках, стимулирующих фиброз
- Позитивная регуляция S100A8/S100A9 в плазме пациентов указывает на прогрессирование MPN в фиброзный фенотип/прогрессирование заболевания
- Кинетику S100A8/S100A9 у пациентов с MPN можно использовать для отслеживания хода заболевания у пациента
- S100A8/S100A9 являются привлекательной терапевтической мишенью при MPN
- Тасквинимод улучшает у пациентов фенотип MPN и подавляет фиброз костного мозга и спленомегалию как опасные для жизни симптомы

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении миелопролиферативного новообразования, связанного с фиброзной фазой, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой предпочтительно по меньшей мере одно из первичного миелофиброза, эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии.

2. Ингибитор для применения по п. 1, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз.

3. Ингибитор для применения по п. 1 или 2, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз в комбинации с цитопенией.

4. Ингибитор для применения по любому из пп. 1-3, причем белок S100 представляет собой по меньшей мере один из S100A8 и S100A9.

5. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., предотвращающий начало и/или уменьшающий прогрессирование первичного миелофиброза.

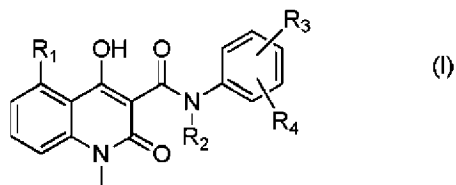
6. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., являющийся по меньшей мере одним из

i) ингибитора, который предотвращает или снижает экспрессию белка S100 в клетке; и

ii) ингибитора, который ингибирует функциональную активность белка S100.

7. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., представляющий собой малую некодирующую РНК или малую молекулу.

8. Ингибитор для применения по п. 7, представляющий собой малую молекулу формулы (I)



или ее фармацевтически приемлемую соль,

причем

R₁ выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси;

R₂ представляет собой C1-C4 алкил, причем предпочтительно R₂ представляет собой метил или этил;

R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси; и

R₄ выбирают из группы, включающей водород, фтор и хлор, при условии, что R₄ выбирают из фтор и хлор только тогда, когда R₃ выбирают из фтор и хлор.

9. Ингибитор для применения по п. 8, причем по меньшей мере имеется одно из следующего:

- R₃ находится в пара-положении и выбирается из группы, включающей метил, метокси, фтор, хлор, трифторметил и трифторметокси; и

- R₄ представляет собой H.

10. Ингибитор для применения по п. 8 или 9, представляющий собой 4-гидрокси-5-метокси-N,1-диметил-2-оксо-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид (тасквинимод).

11. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем предупреждение или лечение осуществляют путем введения ингибитора в общей дозе примерно 0,05 – 10 мг и/или путем перорального введения ингибитора.

12. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем ингибитор применяют в комбинации с ингибитором JAK2.

13. Агент для идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, связывающийся с белком S100, предпочтительно белком S100A8 или S100A9, также включающий детектируемую метку, предпочтительно представляющий собой малую молекулу, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем предпочтительно агент представляет собой тасквинимод, предпочтительно обогащенный дейтерием тасквинимод.

14. Способ идентификации субъекта, страдающего от миелопролиферативного новообразования, включающий стадию обнаружения в биологическом образце присутствия белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, предпочтительно представляющий собой способ *ex vivo*, и причем субъекта идентифицируют как страдающего от миелопролиферативного новообразования, когда присутствие белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышено по сравнению с контрольным образцом.

15. Способ по п. 14, причем присутствие белка S100 обнаруживают путем воздействия на биологический образец агента по п. 13, и/или причем биологический образец представляет собой образец крови или образец костного мозга.

16. Способ по п. 14 или 15, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой первичный миелофиброз.

17. Способ по любому из пп. 14-16, для идентификации субъекта, страдающего от первичного миелофиброза 0, 1, 2 или 3 степени.

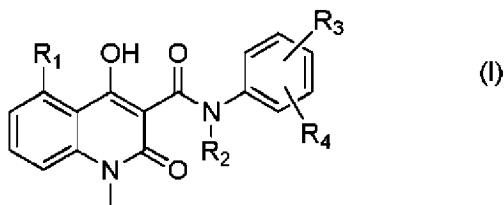
18. Способ идентификации субъекта с риском развития миелофиброза, включающий стадию обнаружения присутствия в биологическом образце белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, предпочтительно представляющий собой способ *ex vivo*, и причем субъекта идентифицируют как субъекта с риском развития миелофиброза, когда присутствие белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышено по сравнению с контрольным образцом.

19. Способ по п. 18, причем субъект является субъектом с миелопролиферативным новообразованием, связанным с фиброзной фазой.

20. Способ идентификации субъекта, который получает пользу от лечения ингибитором по любому из пп. 1-12, включающий стадию обнаружения присутствия в биологическом образце белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, предпочтительно представляющий собой способ *ex vivo*, и причем субъекта идентифицируют как субъекта, получающего пользу от лечения, когда присутствие белка S100, предпочтительно S100A8 и/или S100A9, повышено по сравнению с контрольным образцом.

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ.34 РСТ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Ингибитор белка S100 для применения при профилактике или лечении миелопролиферативного новообразования, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой миелофиброз, и причем ингибитор представляет собой соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль,
причем

R₁ выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси;

R₂ представляет собой C1-C4 алкил;

R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси; и

R₄ выбирают из группы, включающей водород, фтор и хлор, при условии, что R₄ выбирают из фтора и хлора только тогда, когда R₃ выбирают из фтора и хлора.

2. Ингибитор для применения по п. 1, причем профилактика или лечение включает предотвращение начала и/или уменьшение прогрессирования фиброзной фазы миелофиброза.

3. Ингибитор для применения по п. 2, причем фиброзная фаза является фиброзной фазой костного мозга.

4. Ингибитор для применения по любому из пп. 1-3, причем белок S100 представляет собой по меньшей мере один из S100A8 и S100A9,

5. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем ингибитор применяют для предотвращения начала и/или уменьшения прогрессирования миелофиброза.

6. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем R₂ представляет собой метил или этил.

7. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем R₃ находится в пара-положении.

8. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром,

трифторметил и трифторметокси.

9. Ингибитор для применения по п. 8, причем R₃ выбирают из группы, включающей водород и трифторметил.

10. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем R₄ представляет собой водород.

11. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., представляющий собой 4-гидрокси-5-метокси-N,1-диметил-2-оксо-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,2-дигидрохиолин-3-карбоксамид (тасквинимод) или его фармацевтически приемлемую соль.

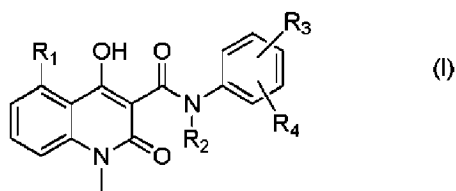
12. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем профилактику или лечение осуществляют путем введения ингибитора в общей суточной дозе примерно 0,05-10 мг.

13. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем профилактику или лечение осуществляют путем перорального введения ингибитора.

14. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем ингибитор применяют в комбинации с по меньшей мере одним из следующего: лучевой терапии, химиотерапии и трансплантации стволовых клеток.

15. Ингибитор для применения по любому из предшествующих пп., причем ингибитор применяют в комбинации с ингибитором JAK2.

16. Применение ингибитора белка S100 при производстве лекарственного средства для профилактики или лечения миелопролиферативного новообразования, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой миелофиброз, и причем ингибитор представляет собой соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль,
причем

R₁ выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси;

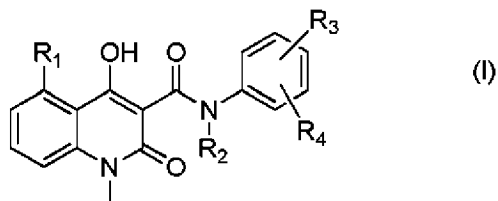
R₂ представляет собой C1-C4 алкил;

R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси; и

R₄ выбирают из группы, включающей водород, фтор и хлор, при условии, что R₄

выбирают из фтора и хлора только тогда, когда R₃ выбирают из фтора и хлора.

17. Способ профилактики или лечения миелопролиферативного новообразования путем введения млекопитающему, нуждающемуся в этом, ингибитора белка S100, причем миелопролиферативное новообразование представляет собой миелофиброз, и причем ингибитор представляет собой соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемую соль,

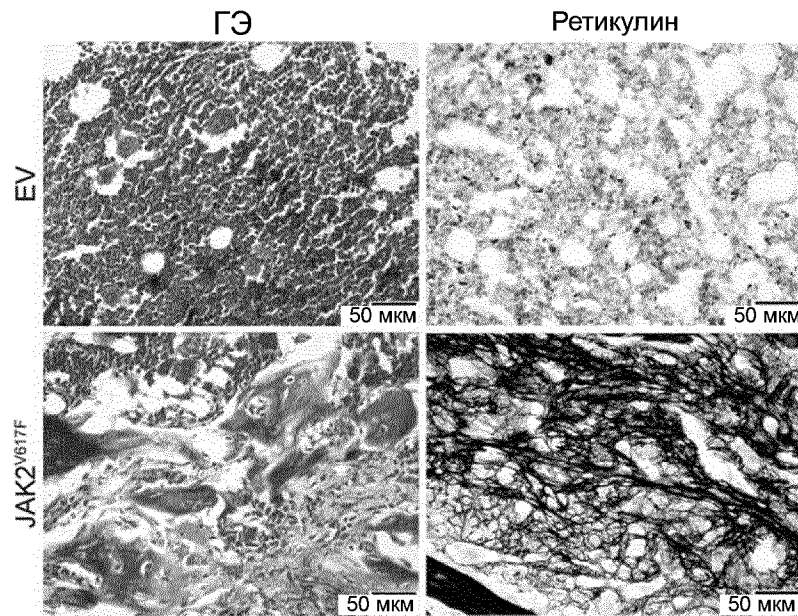
причем

R₁ выбирают из группы, включающей H, метил, этил, н-пропил, изопропил, метокси, этокси, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси;

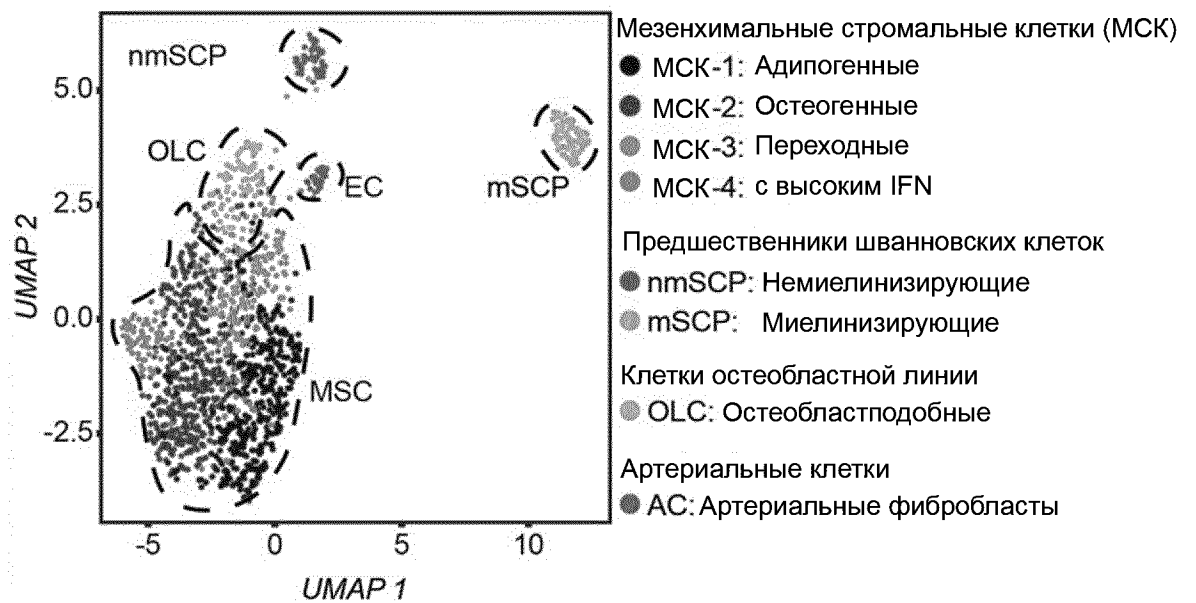
R₂ представляет собой C1-C4 алкил;

R₃ выбирают из группы, включающей метил, метокси, водород, фтор, хлор, бром, трифторметил и трифторметокси; и

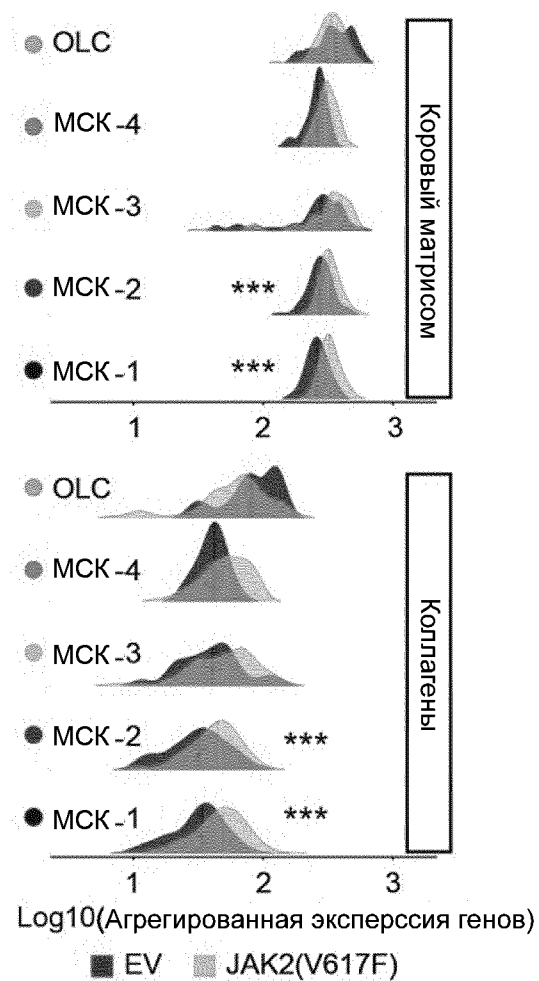
R₄ выбирают из группы, включающей водород, фтор и хлор, при условии, что R₄ выбирают из фтора и хлора только тогда, когда R₃ выбирают из фтора и хлора.



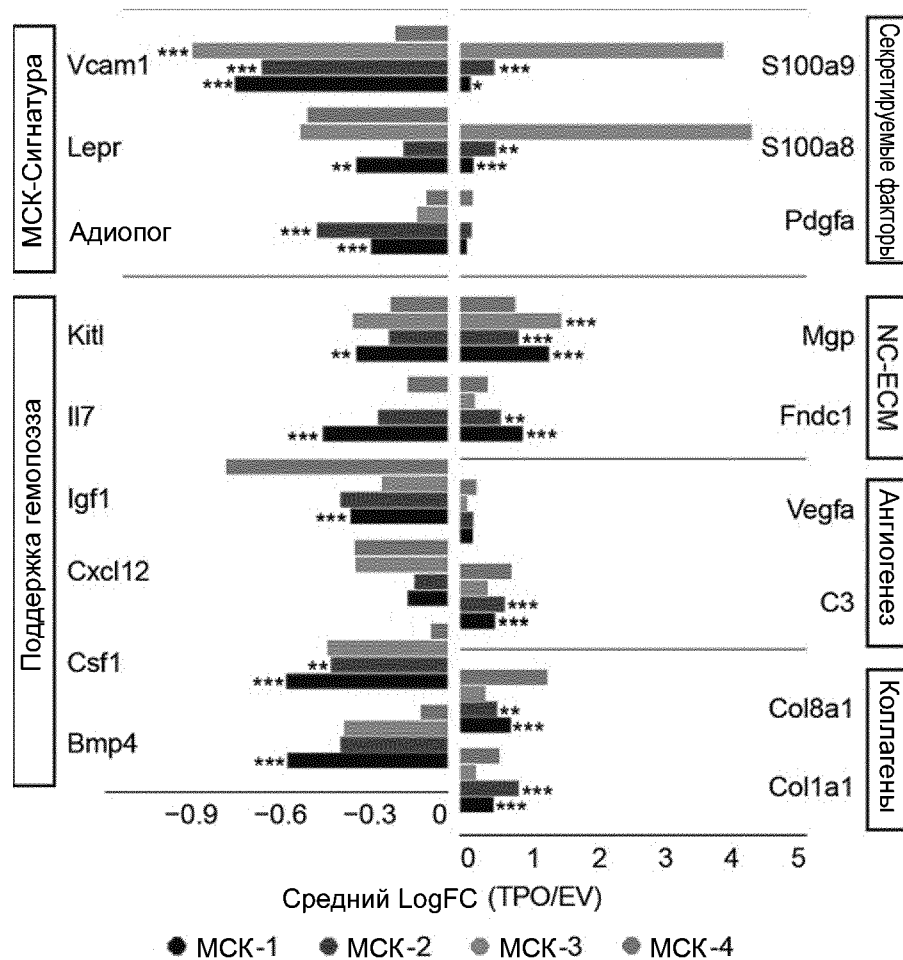
Фиг. 1А



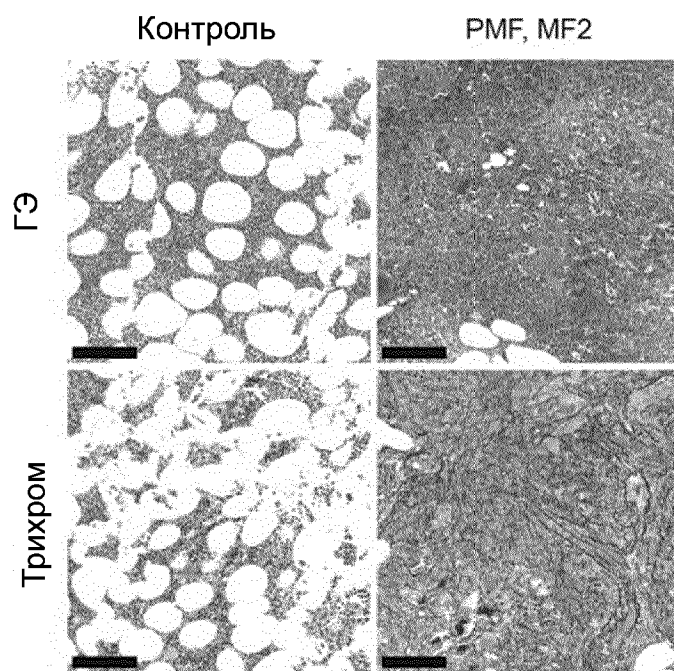
Фиг. 1В



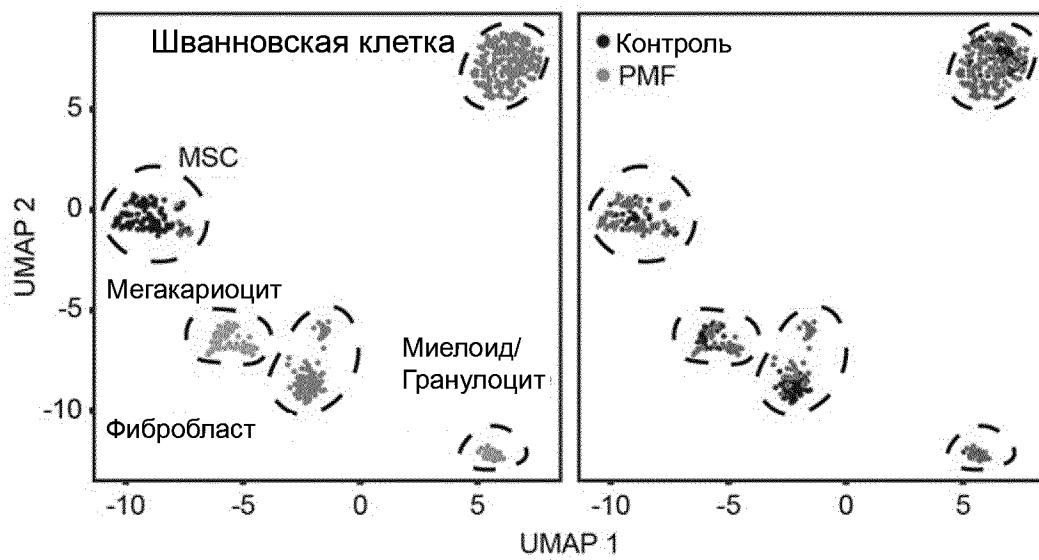
Фиг. 1С



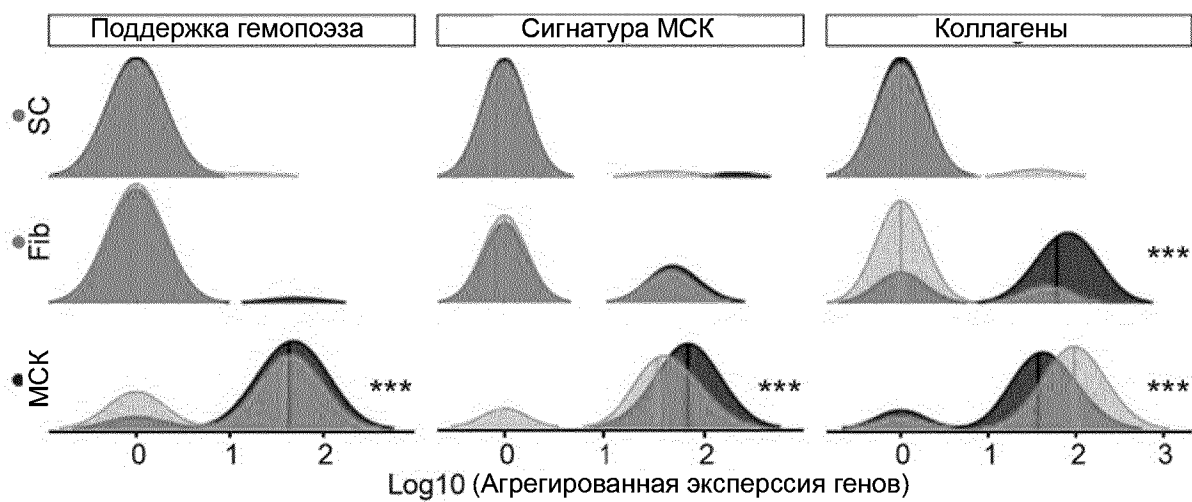
Фиг. 1D



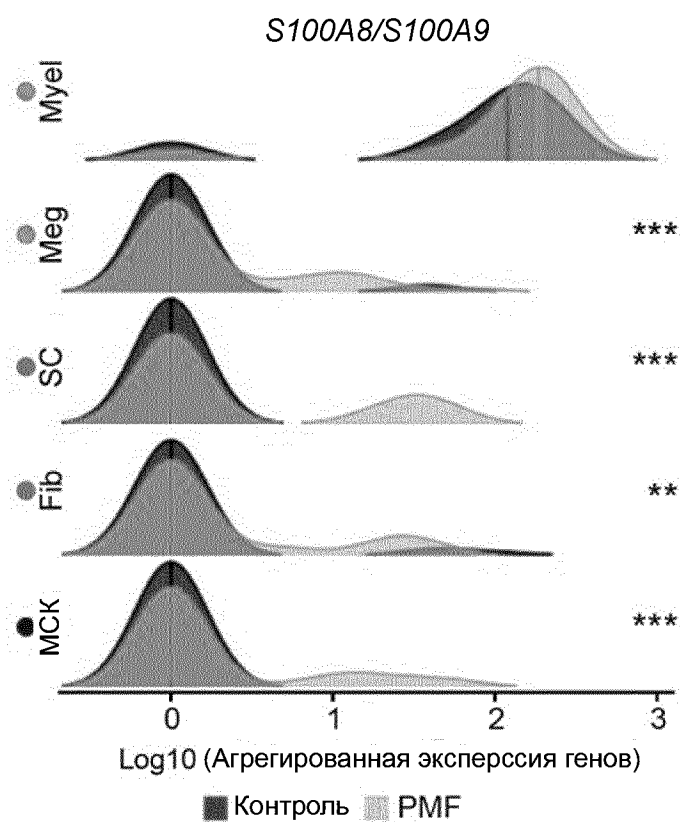
Фиг. 2А



Фиг. 2В

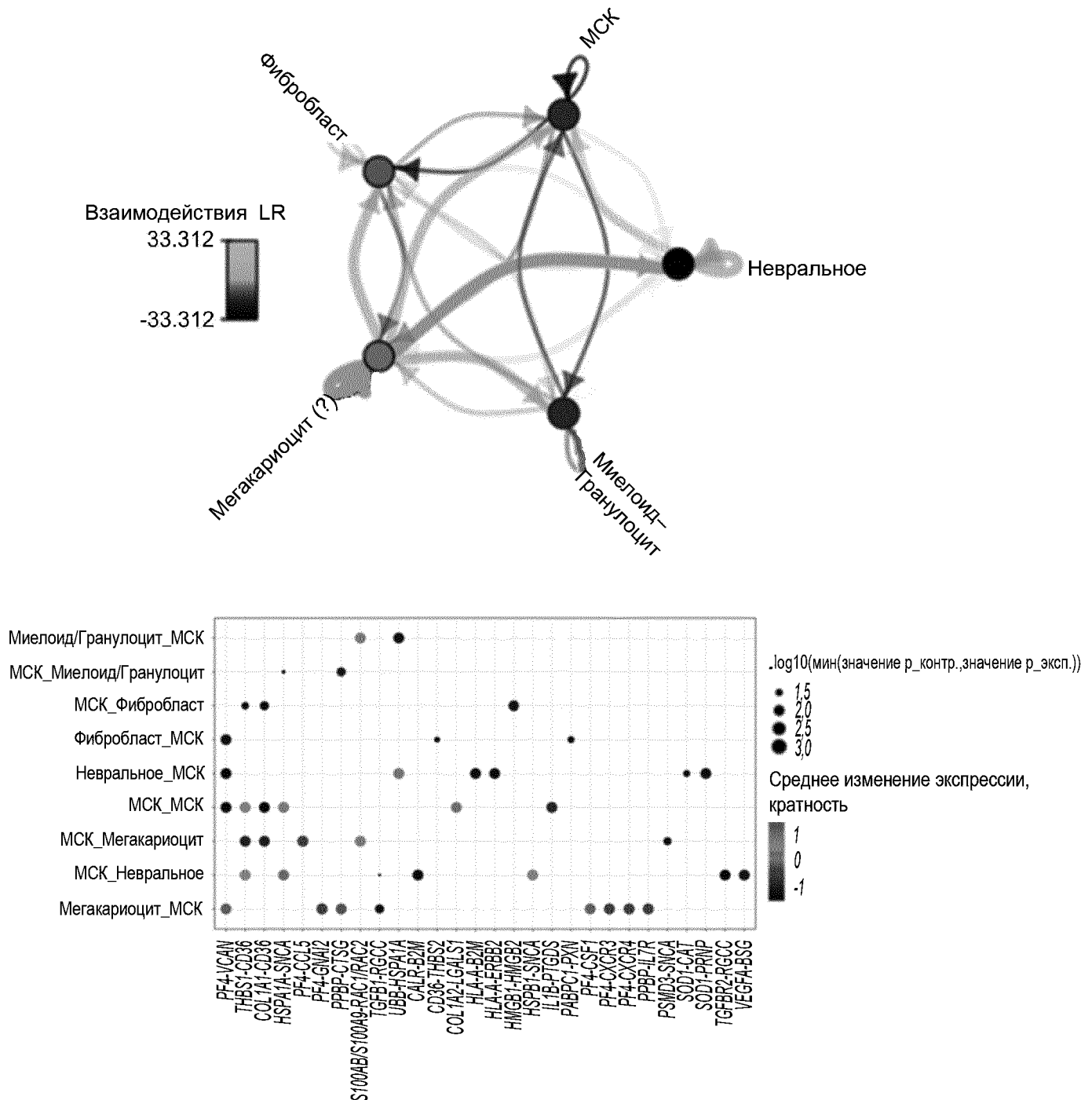


Фиг. 2С

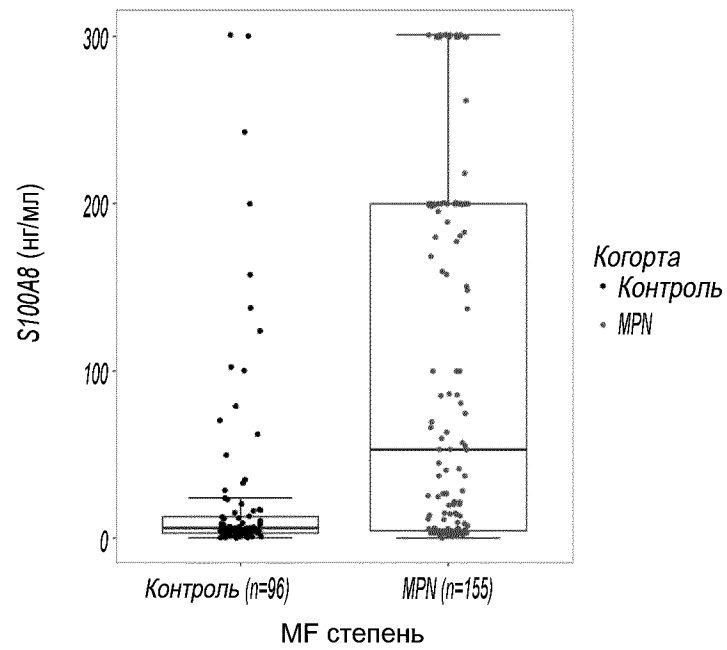


Фиг. 2D

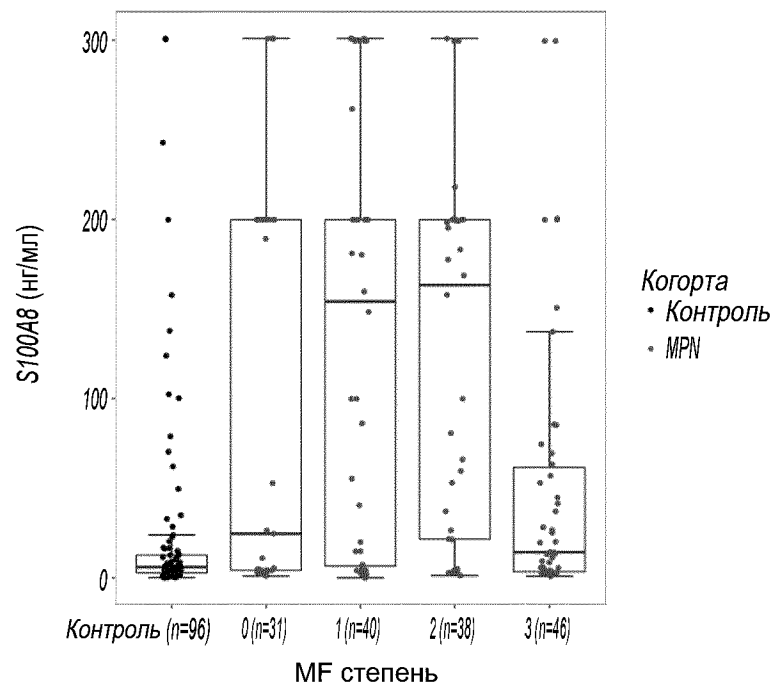
Клеточное взаимодействие рецептор/лиганд



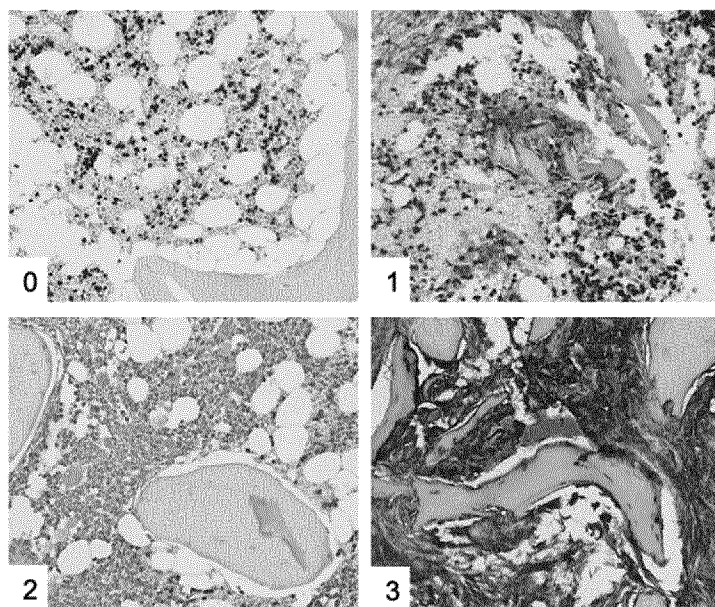
Фиг. 2Е



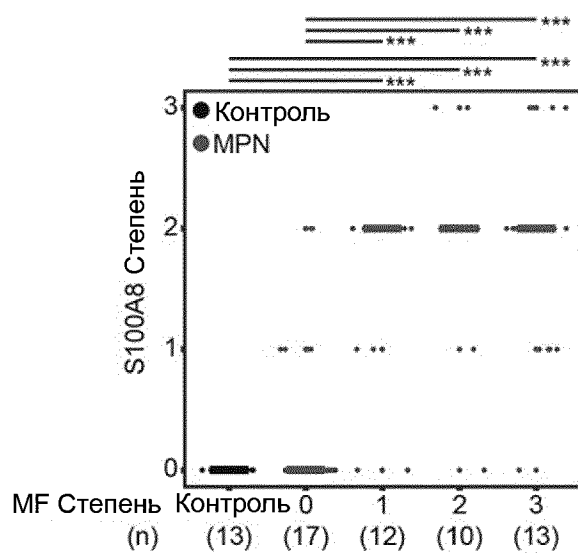
Фиг. 3А



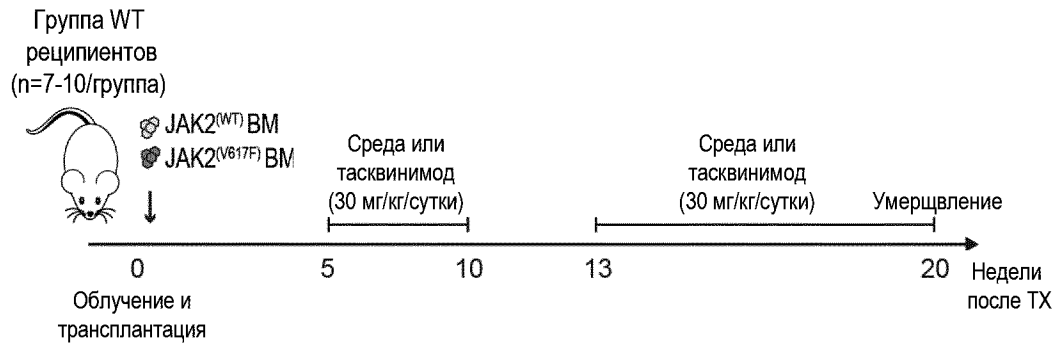
Фиг. 3В



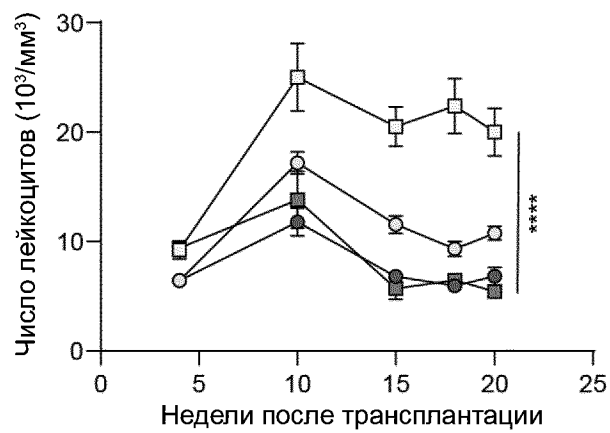
Фиг. 3С



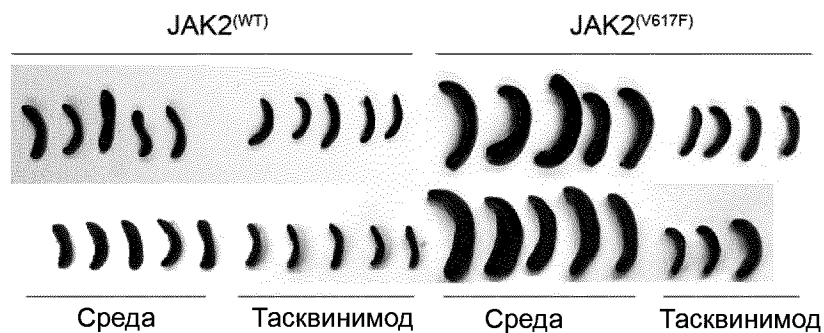
Фиг. 3D



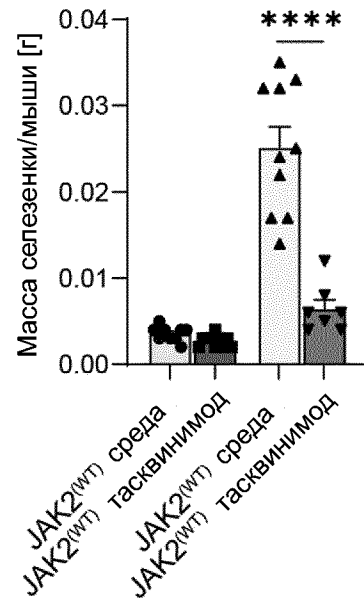
Фиг. 4А



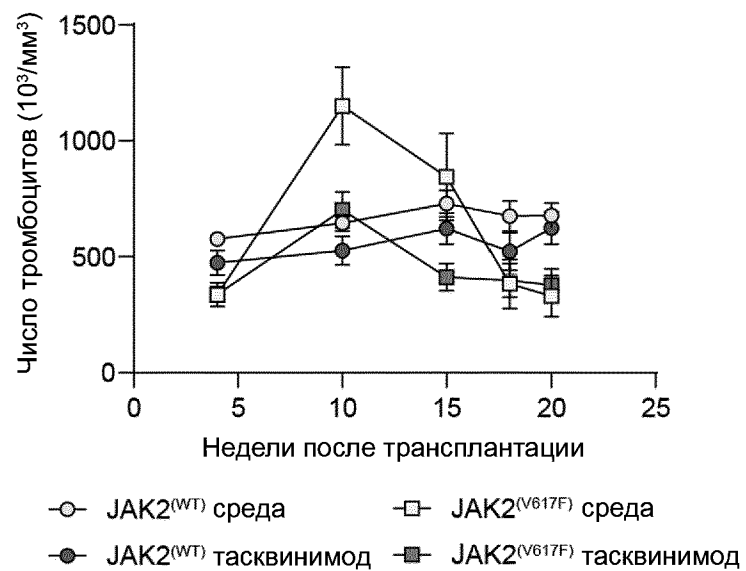
Фиг. 4В



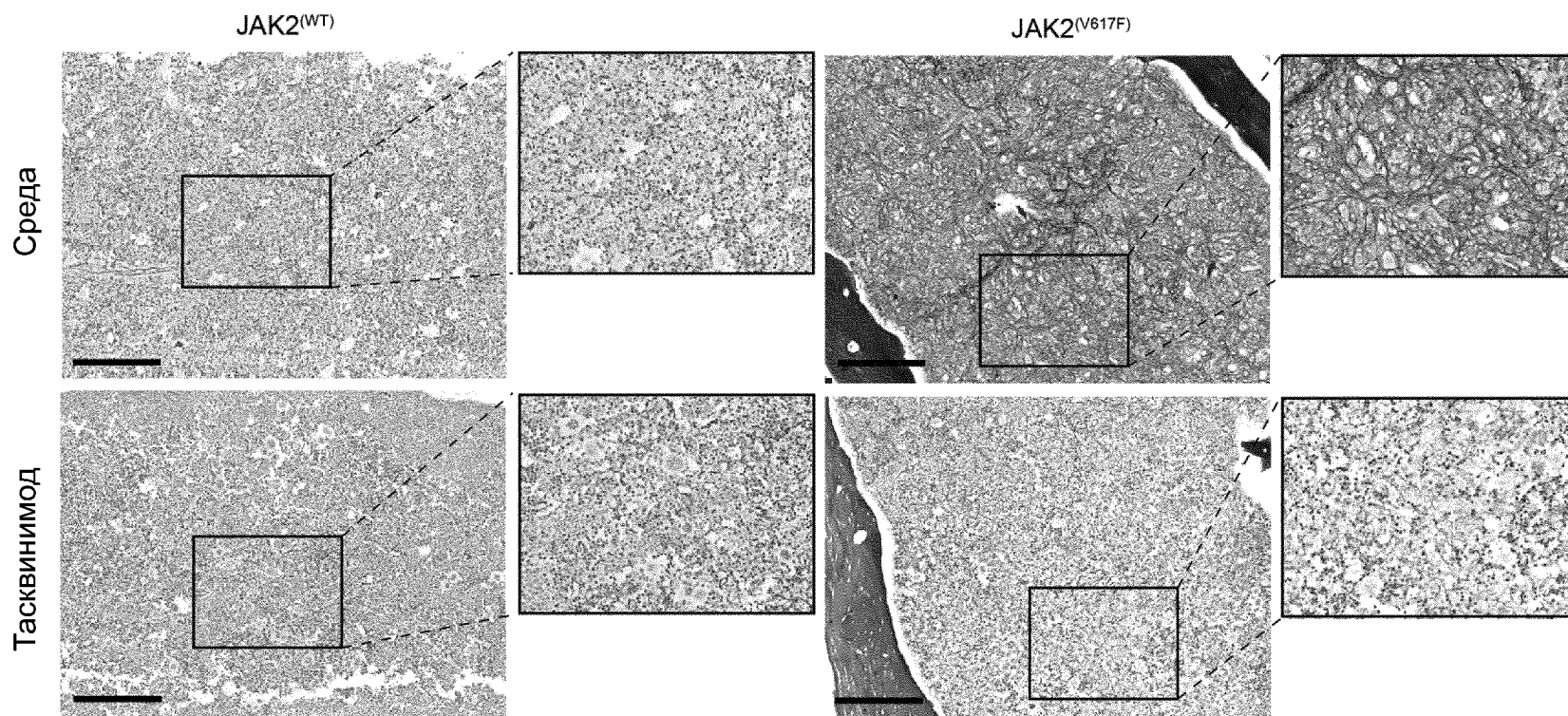
Фиг. 4С



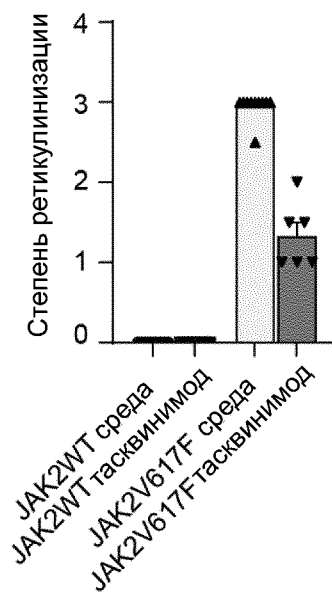
Фиг. 4D



Фиг. 4E

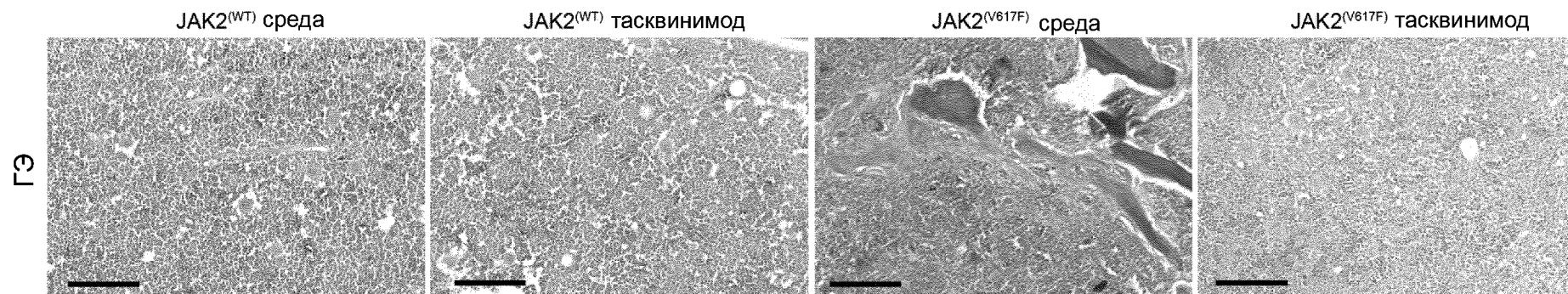


Фиг. 4F

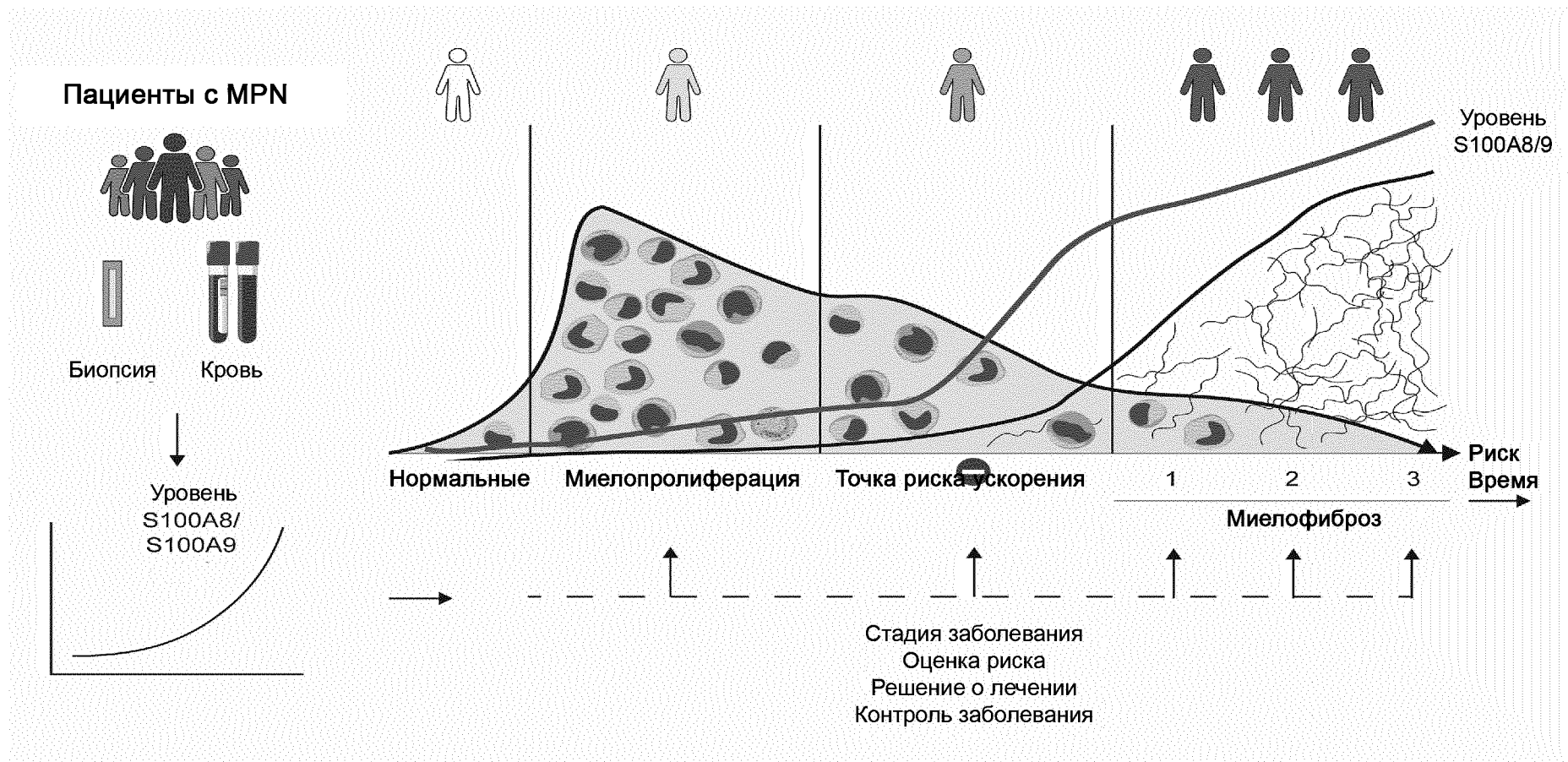


Фиг. 4G

11/12



Фиг. 4H



Фиг. 5