



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107405405 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201680008472.9

(22) 申请日 2016.01.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107405405 A

(43) 申请公布日 2017.11.28

(30) 优先权数据
EP151528866 2015.01.28 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.07.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/051771 2016.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/120369 EN 2016.08.04

(73) 专利权人 波尔多大学
地址 法国波尔多
专利权人 国立健康与医学研究所
波尔多大学治疗中心

(72) 发明人 帕特里克·伯杰 伊莎贝尔·杜宾
皮尔-奥利弗·吉罗代

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200
代理人 吴树山

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

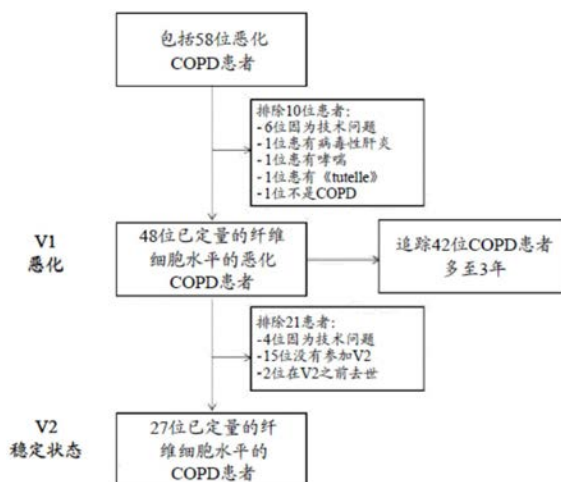
(56) 对比文件
WO 2009074807 A2, 2009.06.18
WO 2014143807 A2, 2014.09.18
WO 2013052844 A1, 2013.04.11
WO 2014132100 A1, 2014.09.04
Annaig Ozier et al..The role of fibrocytes in bronchial remodelling during acute exacerbation of COPD.《European respiratory journal》.2014,第42卷第249页。
Chun-Hua Wang et al..Increased circulating fibrocytes and their capacity of proliferation and differentiation in clinically unstable patients with chronic obstructive pulmonary disease.《European respiratory journal》.2014,第42卷第602页。

审查员 罗晓彤

权利要求书1页 说明书19页
序列表3页 附图9页

(54) 发明名称
治疗和/或预防慢性阻塞性肺病的新组合物和方法

(57) 摘要
本发明涉及一种用于治疗 and/或预防慢性阻塞性肺病 (COPD) 和慢性阻塞性肺病的急性恶化 (AECOPD) 的新型组合物或使用方法。



1. 一种组合物在制备预防和/或治疗AECOPD的药物中的应用,其特征在于,所述组合物由治疗有效量的普乐沙福组成,其中所述AECOPD的特征为支气管的和/或支气管周围的纤维化。

2. 一种药物组合物在制备治疗和/或预防AECOPD的药物中的应用,其特征在于,所述药物组合物包含如权利要求1所述的组合物和药学上可接受的媒介物。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物在制备药物中的应用,其特征在于,所述药物组合物还包含支气管扩张剂、肾上腺皮质激素和/或磷酸二酯酶抑制剂。

4. 根据权利要求2或3所述的药物组合物在制备药物中的应用,其特征在于,所述药物组合物是口服、经颊或舌下施用的,并且是呈片剂、胶囊、多微粒、凝胶、薄膜、酞剂、溶液或悬浮液的形式,其可含有调味剂或着色剂,以用于即时释放、延迟释放、改进释放、持续释放、双重释放、受控释放或脉动递送应用。

5. 根据权利要求2或3所述的药物组合物在制备药物中的应用,其特征在于,所述组合物通过吸入施用,并且是呈干粉吸入器或来自加压容器、泵、喷雾器或雾化器的气溶胶喷雾呈递的形式。

6. 一种试剂盒或药物包装在制备治疗和/或预防AECOPD的药物中的应用,其特征在于,所述试剂盒或药物包装包括一个或多个剂量的根据权利要求2或3中所述的药物组合物。

治疗和/或预防慢性阻塞性肺病的新组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于预防和/或治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 和慢性阻塞性肺病的急性恶化 (AECOPD) 的新型组合物和方法。

[0002] 发明背景

[0003] COPD是影响世界上超过2亿人的非常常见的气道疾病。它目前是第四种主要死亡原因,但是死亡率在2020年可能达到第三种死亡原因。它的特征在于通常是进行性的并且与气道和肺中对有毒颗粒或气体的增强的慢性炎症应答相关联的持续气流受限。COPD的主要危险因素是烟草吸入。所述疾病的特征在于慢性支气管炎和远侧气道重塑,并且具体地是支气管和支气管周围纤维化,从而引发持续的气流受限。

[0004] 恶化和并发症导致个体患者的整体严重性。存在COPD患者中可见的导致气流减少的多种解剖病灶。这些解剖病灶包括粘性分泌物的积累、支气管周围纤维化、小气道缩小和肺泡壁破坏,所述肺泡壁破坏是肺气肿的定义性特征。COPD的慢性病程也频繁地被急性恶化 (AECOPD) 加剧,所述急性恶化最经常地与病毒或细菌感染有关。这些AECOPD与嗜中性粒细胞炎症和有时嗜酸性粒细胞炎症的爆发相关联。AECOPD在超过3年的时间段内影响将近80%的COPD患者,并且恶化的频率主要与先前恶化的存在有关。

[0005] AECOPD引起大量的医疗护理成本,这尤其与住院治疗有关。AECOPD极大地影响生活品质并且在疾病的加剧中起作用:肺功能在具有频繁恶化的患者中下降地更快,这增加死亡的风险。具体地,据报道在由于AECOPD而允许住院的COPD患者中具有高死亡率,并且死亡率在随后4年内达到45%。严重的AECOPD被认为是死亡率的独立预后因素。然而,这些后来的发现的机制仍然是完全未知的。

[0006] 当前药理学治疗针对病症和生活品质起作用,但是不改善疾病的死亡率或自然历史,其中后者的特征在于肺功能的更快下降。

[0007] 目前为止还未研究纤维细胞在AECOPD期间和在AECOPD之后的募集,并且关于调节纤维细胞的作用和随后对疾病进展的影响知道的也很少。申请人研究了在COPD恶化期间患者的外周血纤维细胞的募集和迁移,并且了解了对于开发关于此概念的新疗法的需要。具体地,申请人指出表达CXCR4、CCR3和CCR2 (CXCL12、CCL11、CCL7、CCL13和CCL2的趋化因子受体) 的纤维细胞在AECOPD期间在患者中显著增加,并且这些特定纤维细胞与死亡率和低肺功能高度相关。通过指出CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的拮抗剂适用于经由在AECOPD期间预防患者的纤维细胞募集/迁移来治疗和/或预防COPD和AECOPD,申请人成功地鉴定了用于治疗 and/或预防COPD和AECOPD的新型药物发现途径和新药物。

发明内容

[0008] 本发明因此提供一种用于在预防和/或治疗COPD和AECOPD的方法中使用的组合物,所述组合物包含治疗有效量的趋化因子受体CXCR4、CCR2和/或CCR3、其变体和/或同种型、配体的至少一种拮抗剂或抑制剂、它们的变体和/或同种型。CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、

CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的拮抗剂可选自小有机或合成分子、自然产物、肽、蛋白质、肽模拟物、多克隆或单克隆抗体、抗体片段、核酸试剂,例如RNAi、siRNA、shRNA、反义物、核酶或DNA酶。

[0009] 本发明还涉及一种治疗和/或预防COPD和/或AECOPD的方法,并且涉及一种在患有COPD或AECOPD或者具有患COPD或AECOPD的风险的受试者中抑制由CCR2和/或CCR3和/或CXCR4介导和/或调节的纤维细胞募集和迁移的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的至少一种拮抗剂、其变体和/或同种型。

[0010] 本发明还涉及治疗有效量的趋化因子受体CXCR4、CCR2和/或CCR3和/或其变体和/或同种型、配体的至少一种拮抗剂或抑制剂的用途,或治疗有效量的CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的至少一种拮抗剂、其变体和/或同种型的用途,所述用途为制备用于在患有COPD或AECOPD或者具有患COPD或AECOPD的风险的受试者中治疗和/或预防COPD和/或AECOPD的药物。

[0011] 本发明的优选组合物和使用方法涉及趋化因子受体CXCR4和/或其变体和/或同种型、配体的至少一种拮抗剂或抑制剂,和/或CXCR4/CXCL12受体/配体对的一种拮抗剂、其变体和/或同种型的用途。

[0012] 本发明还提供COPD疾病发展和进展、AECOPD和药物发现靶标的新型标记物。

[0013] 本发明还提供筛选或鉴定拮抗剂的体外或体内方法以及测量选自由CCR2、CCR3和/或CXCR4基因组成的组中的至少一种基因在外周血纤维细胞中的水平的体外方法。

[0014] 最后,本发明涉及一种评估受试者中COPD或AECOPD的风险的方法,其包括;a)从所述受试者获得合适的样品、b)分离并鉴定所述样品中的循环纤维细胞、c)任选地评估所述样品中的纤维细胞迁移以及d)测量CCR2和/或CCR3和/或CXCR4趋化因子受体在所述样品中的表达水平。本发明还提供一种用于监测在患有COPD和AECOPD的患者中对治疗剂的应答的方法,其包括测量选自由CCR2、CCR3和/或CXCR4基因组成的组的至少一种基因在患者的外周血纤维细胞中的表达水平的步骤。

[0015] 附图简要说明

[0016] 图1示出使用包括在内并且其纤维细胞的水平被量化的患者的数量的研究设计。

[0017] 图2A-图2F是示出以下各项的图:对照受试者(“Cont”,n=38)、非恶化COPD患者(“NEx”,n=9)、恶化COPD患者(“V1”,n=48)的外周血单核细胞(PBMC)中的CD45+胶原蛋白(Co11)+细胞的百分比(A)和血液中的纤维细胞的浓度(B)*:P<0.05,**P<0.001,非参数Kruskal Wallis检验。对照受试者(“Cont”,n=25)、非恶化COPD患者(“NEx”,n=8)、恶化COPD患者(“V1”,n=29)的PBMC中的CD45+CD34+胶原蛋白+细胞的百分比(C)和血液中的纤维细胞的浓度(D)*:P<0.05,P<0.01,非参数Kruskal Wallis检验。中值表示为水平线(A-D)。每位恶化COPD患者在恶化时(V1)和2个月之后(V2)的血液中的CD45+胶原蛋白+细胞的百分比(E)和CD45+胶原蛋白+细胞的浓度(F)**P<0.01,Wilcoxon配对检验。

[0018] 图3A-图3F表示恶化COPD受试者的Kaplan-Meier存活分析,通过28位受试者的PBMC在恶化时(V1)所测量的CD45+胶原蛋白+细胞的阈值百分比分开。在具有可用的存活数据的42位受试者中,36位具有阈值以下的值(灰色曲线)并且6位具有阈值以上的值(黑色曲线)。PBMC中的CD45+胶原蛋白+细胞的百分比作为COPD受试者的死亡率的预测值(A)。B-F,

在恶化COPD患者中在V2时在FEV1 (B)、FVC (C)、FEV1/CVF (D)、TLC0 (E)、pO₂ (F) 与PBMC中的CD45+胶原蛋白+细胞的百分比的关系。

[0019] FEV1: 第1秒用力呼气量;FVC: 用力肺活量;TLC0: 一氧化碳转移因子;Pao₂: 动脉血中的O₂分压。使用非参数Spearman分析获得相关系数(r)和显著性水平(p值)。

[0020] 图4A-图4J是示出对照受试者(“Cont”)、恶化COPD患者(“V1”)的纤维细胞中表达CXCR4 (A)、CCR2 (C)、CCR3 (E)、CCR5 (G)和CCR7 (I)的细胞的百分比的图。示出对照受试者、非恶化COPD患者、恶化COPD患者的血液中的CXCR4+ (B)、CCR2+ (D)、CCR3+ (F)、CCR5+ (H)或CCR7+ (J)纤维细胞的浓度的图。*:P<0.05,***P<0.001,Mann Whitney检验

[0021] 图5A-图5D示出A)在25μg/ml普乐沙福(Plerixafor)的存在(+)或不存在(-)下对照受试者(n=6,灰色柱)和恶化COPD患者(n=6,黑色柱)响应于恶化COPD患者的血浆的纤维细胞迁移。*P<0.05,成对t检验。B)个体受试者的血浆CXCL12。符号指示个体受试者并且水平线表示中值。C)对照受试者(n=8,灰色柱)和恶化COPD患者(n=5,黑色柱)响应于CXCL12的纤维细胞迁移。**P<0.01,使用Bonferroni后期检验的双向ANOVA。D)在25pg/ml普乐沙福的存在(+)或不存在(-)下对照患者(n=6;灰色柱)和恶化COPD患者(n=7;黑色柱)响应于CXCL12的纤维细胞迁移。*:P<0.05,成对t检验。

[0022] 图6是示出在V1之前的一年没有任何不定期访问(n=4)、具有一次不定期访问(n=8)或具有两次或更多次不定期访问(n=14)的情况下在V2时恶化COPD患者的PBMC中的CD45+胶原蛋白+细胞的百分比的图。中值表示为灰色水平线。**:p<0.01,使用多个z检验的非参数Kruskal Wallis测试。

[0023] 图7示出在恶化COPD患者中在V2时在FEV1 (L) (A)、FVC (L) (B)、FEF 25-75 (%) (C)、FEF 25-75 (L/s) (D)与PBMC中的CD45+胶原蛋白+细胞的百分比之间的关系。

[0024] FEV1: 第1秒用力呼气量;FVC: 用力肺活量;FEF 25-75: 在FVC的中间(25%-75%)部分期间的平均用力呼气流量。使用非参数Spearman分析获得相关系数(r)和显著性水平(p值)。

[0025] 图8A-图8D是示出以下各项的图:(A)在10μM SB 328437的存在(+)或不存在(-)下对照受试者(n=1,灰色柱)和恶化COPD患者(n=5,黑色柱)响应于恶化COPD患者的血浆的纤维细胞迁移。(B)个体受试者的血浆CCL11。符号指示个体受试者并且水平线表示中值。(C)对照受试者(n=2,灰色柱)和恶化COPD患者(n=6,黑色柱)响应于CCL11的纤维细胞迁移。(D)在10μM SB 328437的存在(+)或不存在(-)下对照患者(n=2)和恶化COPD患者(n=5)响应于CCL11的纤维细胞迁移。

[0026] 图9是示出在支气管肺泡灌洗(BAL)之后在每个以下小鼠组中的细胞回收(10³/ml)的图,具体地是(A)总细胞数量、(B)巨噬细胞回收、(C)嗜中性粒细胞回收以及(D)淋巴细胞回收:暴露于室内空气并注射有PBS的小鼠(□)、暴露于室内空气并接受双链RNA聚(I:C)的小鼠(■)、暴露于香烟烟雾并注射有PBS的小鼠(◼)、暴露于香烟烟雾并注射有双链RNA聚(I:C)的小鼠(◻)。

[0027] 图10(A)是来自从暴露于香烟烟雾并注射有聚(I:C)的小鼠组相对于暴露于室内空气并注射有聚(I:C)的对照组获得的支气管部分的电子显微图像。图10(B)是示出在如以上图9所述的每个小鼠组中的纤维化区域(FA)和基底层周边(PLB)的比率的图。

[0028] 图11示出显示在如以上图9所述的每个小鼠组中的血液和肺中的循环纤维细胞(CD45+胶原蛋白+细胞)的百分比的图。

[0029] 图12是示出如以上图9所述的每组小鼠的肺中的肺纤维细胞(CD45+胶原蛋白+细胞)的百分比的图。

具体实施方式

[0030] 申请人在翻译临床研究中调查了在恶化期间和在恶化2个月之后处于稳定状态的COPD患者与对照受试者和患有非恶化COPD的患者相比的外周血纤维细胞浓度。此外,表征了趋化因子受体,并且调查了来自患有COPD的患者和对照受试者的这些纤维细胞的迁移特性。

[0031] 申请人已发现与对照受试者相比,在AECOPD期间的患者的循环纤维细胞的数量显著增加,并且在AECOPD两个月之后相同患者的循环纤维细胞的数量降低。申请人证明了在恶化期间的高循环纤维细胞百分比与死亡风险增加相关联,并且在AECOPD之后纤维细胞的百分比与多个阻塞性肺病参数负相关,所述参数即FEV1(1秒用力呼气量)、FVC(用力肺活量)、FEV1/FVC(Tiffeneau-Pinelli指数)、TLC0(一氧化碳的转移肺活量)以及PaO₂(动脉血中的氧气分压)。具体地,申请人发现纤维细胞表达CXCR4、CCR2和/或CCR3,这些分别是CXCL12、CCL2、CCL7、CCL13和/或CCL11趋化因子的趋化因子受体。

[0032] 趋化因子受体CXCR4、CCR2和CCR3的拮抗剂降低朝向恶化COPD患者的血浆的纤维细胞迁移,并且因此发现根据本发明适用于治疗和/或预防COPD和AECOPD。根据本发明的优选拮抗剂是趋化因子受体CXCR4的拮抗剂,诸如但不限于普乐沙福。

[0033] 本发明因此提供用于治疗 and/或预防COPD或AECOPD的CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的拮抗剂或抑制剂的化合物、药物组合物和使用方法。根据本发明的优选化合物干扰天然配体与CXCR4受体的结合,并且抑制受体的激活和随后的下游信号传导通路。

[0034] 趋化因子受体CXCR4意指C-X-C趋化因子受体类型4(CXCR4)。它还被称为融合素或分化簇184(CD 184),它是属于I类GPCR或视紫红类GPCR家族的七种跨膜(TM)G-蛋白偶联受体(GPCR)。CXCR4结构由352个氨基酸残基组成,它包含N末端结构域、七个TM结构域、三个细胞外环(ECL)、三个细胞内环(ICL)以及C末端结构域。

[0035] CXCR4对于趋化因子配体12(CXCL12)是特异性的,所述趋化因子配体12还称为基质衍生因子-1(SDF-1)。作为稳态趋化因子,SDF-1或CXCL12是具有67个氨基酸残基的8kDa趋化因子肽,其主要位于骨髓基质细胞中。存在两个不同的同种型CXCL12- α 和CXCL12- β 。人类CXCL12- α 或SDF-1 α 的氨基酸序列具有GenBank登录号NP954637。人类CXCL12- β 或SDF-1 β 的氨基酸序列具有GenBank登录号NP000600。人类CXCL12也在美国专利号5,756,084和美国专利号5,563,048中进行描述。

[0036] 趋化因子受体CCR2是指由HUGO基因命名委员会批准的针对趋化因子(C-C基序)受体2的基因符号。此基因的HGNC ID是1603。所述基因位于染色体位置3p21处。所述基因的先前符号和名称是CMKBR2。此基因的同义词包括CC-CKR-2、CD 192、CKR2、FLJ78302、MCP-1-R。NCBI参考序列是NM001123041.2(核酸)和NP001116513.2(氨基酸)。CCR2是CCL2、CCL7和CCL13的受体。所述受体介导激动剂依赖的钙动员和腺苷酸环化酶的抑制。两个可选择性剪

接的转录物变体由人类CCR2基因表达。第一个变体(A)编码细胞质同种型。与变体B相比,它在编码区中可选择性地剪接,从而导致下游终止密码子的移码和使用。所有的变体和同种型均在本发明的范围内。

[0037] 趋化因子(C-C基序)配体2(CCL2)还被称为单核细胞趋化蛋白1(MCP1)和小可诱导细胞因子A2。CCL2是属于CC趋化因子家族的小细胞因子。CCL2向由组织损伤或感染产生的炎症位点募集单核细胞、记忆T细胞和树突细胞。

[0038] CCL7(单核细胞趋化蛋白-3,MCP-3)是CC趋化因子家族(β -趋化因子)的成员,其特征在于在成熟蛋白的氨基末端处的两个相邻的半胱氨酸残基。它是用于CCR2结合的配体。MCP-3的登录号是X72308

[0039] CCL13还称为单核细胞趋化蛋白-4(MCP-4),它是充当单核细胞、嗜酸性粒细胞和T细胞的化学引诱物并且充当嗜碱性粒细胞的活化剂的CC趋化因子。它通过CCR2受体和CCR3受体发送信号。人类MCP-4(hMCP-4)序列在1996年首次发布。(Ugucioni等,1996,Monocyte Chemotactic Protein 4(MCP-4),A Novel Structural and Functional Analogue of MCP-3and Eotaxin,J.Exp.Med.183:2379-2394)。人类MCP-4是由75个氨基酸残基组成的8.6kDa的肽。(图3)它还称为CK- β -10、SCY-A13和NCC-1(Swiss-Prot登录号Q99616),并且在新趋化因子命名法中重新命名为CCL13。(Zlotnik等,2000,Immunity,12:121-127)。CCL13的SWISSPROT登录号是Q99616;片段34-58。

[0040] 趋化因子受体CCR3是指由HUGO基因命名委员会批准的针对趋化因子(C-C基序)受体3的基因符号。此基因的HGNC ID是1604。所述基因位于染色体位置3p21.3处。所述基因的先前符号和名称是CMKBR3。此基因的同义词包括CC-CKR-3、CD193和CKR3。CCR3的Genbank参考序列是AF247361.1。所有的变体和同种型均在本发明的范围内。

[0041] CCL11还称为嗜酸性粒细胞趋化蛋白和嗜酸性粒细胞趋化因子-1(eotaxin-1),它是CCR2受体和CCR3受体的配体。它由CCL11基因编码。此基因在三个外显子上编码并且位于染色体17上。CCL11是其配体的趋化因子受体包括。此基因的HGNC ID是10610。CCL11的Genbank参考序列是AB063614.1。

[0042] 预期根据本发明的拮抗剂或抑制剂是直接或间接抑制CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的生物活性的治疗剂。此类药剂可包括小分子(有机的或无机的)、天然产物、合成化合物、抗体(例如,多克隆血清、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体)、抗体片段(诸如重组抗体片段、单链抗体(scFv)、单抗体可变结构域、单抗体结构域蛋白(dAb)、抗原结合片段)、核酸试剂(诸如反义物、核酶、DNA酶或RNA干扰RNAi、siRNA或shRNA,其通过减少趋化因子受体表达来起作用)、蛋白质、肽、肽衍生物、肽模拟物、碳水化合物或通过有效减少细胞上存在的CXCR4的量或者通过抑制配体CXCL12(尤其是CXCL12- α)的相互作用来优选地降低趋化因子受体CXCR4的活性的任何其他化合物或组合物。拮抗剂化合物还可包括拮抗剂化合物的变体、同种型、溶剂合物、水合物、药学上可接受的盐、互变异构体、立体异构体以及前药。

[0043] 根据一个优选实施方案,本发明的组合物和使用方法优选地包括趋化因子受体CXCR4的拮抗剂通过抑制一种或多种配体(例如,CXCL12- α 和/或CXCL12- β (SDF-1- α 或SDF-1- β))与CXCR4的结合来抑制与CXCR4相关联的一种或多种生物功能或生物活性和/或抑制通过CXCR4介导的信号转导。因此,CXCR4介导的过程和细胞应答(例如,纤维细胞的增殖、迁

移、趋化应答和分化) 可通过CXCR4拮抗剂抑制。

[0044] 因为CXCR4初始作为参与人体免疫缺陷病毒细胞侵入的辅助受体之一被发现, 所以CXCR4拮抗剂在过去被深入地研究。大量化合物因此被化学地良好表征, 并且被鉴定为显著地抑制CXCR4和轴CXCR4/CXCL12。已开发的第一种CXCR4拮抗剂是肽衍生物。随后的CXCR4拮抗剂是能够结合CXCR4的主要阴离子细胞外结构域阳离子的分子。目前为止, 超过20种不同的化学品种类被描述为CXCR4拮抗剂。已经发布了描述基于其化学骨架而具有CXCR4拮抗活性的分子的大量文章(Debnath B等, *Theranostics*. 2013; 3(1): 47-75)。

[0045] 小分子是可用于根据本发明的组合物CXCR4拮抗剂中的第一类化合物。这些化合物是本领域中熟知的, 并且详细描述为CXCR4拮抗剂, 尤其是在Wilson LJ等, *Drug Development Research*. 2011; 72: 598-602)。它们包括环拉胺模拟物、双大环化合物类诸如具体地双-四氮杂大环化合物(二环酰胺类(bicyclams))及其衍生物、基于喹诺酮的CXCR4拮抗剂、基于四氢喹啉的CXCR4拮抗剂、基于胍的CXCR4拮抗剂、N-取代的基于吡啶的CXCR4拮抗剂和/或基于嘧啶的CXCR4拮抗剂、1,4-亚苯基双(亚甲基)衍生物以及含N杂环。

[0046] 二环酰胺类尤其在国际公布号W000/56729中进行描述。在二环酰胺类分子中, 可以引用对苯二甲胺系化合物(para-xylyl-enediamine based compounds), 像也命名为AMD3100的普乐沙福, 并且普乐沙福被Genzyme公司以商品名Mozobil商业化并且尤其在US 5,583,131中进行描述; 并且由Uy等, *Expert Opin Biol Ther*. 2008年11月; 8(11): 1797-804. doi:10.1517/14712598.8.11.1797进行描述。普乐沙福的衍生物或结构上修饰的化合物也可用作本发明的组合物中的拮抗剂。此类衍生物可以是芳香族连接的聚胺大环化合物, 诸如普乐沙福的四氟衍生物, 所述大环化合物尤其在国际公布号W093/12096和美国专利5,583,131中进行描述。

[0047] 普乐沙福的类似物诸如AMD3465具有单个氮杂大环和随后的非大环, 它是保护化合物的两个杂环单元之间的对二甲苯基乙二胺接头的口服有效的CXCR4拮抗剂, 所述类似物由Bodart等(*Biochem Pharmacol*. 2009年10月15日; 78(8): 993-1000)进行描述。另一种双氮杂大环化合物也命名为AMD3329, 它由Bridger等(*J. Med. Chem.* 1999年9月23日; 42(19): 3971-81)鉴定, 并且由AnorMed公司进行销售。

[0048] 普乐沙福的可用于本发明的组合物和方法中的其他衍生物由二环酰胺类普乐沙福和肽类CXCR4拮抗剂(TN14003)开始设计。这些衍生物可选自N,N'-二-2-吡啶基-1,4-苯二甲胺; 4F-苯甲酰基-TN14003, 还命名为BKT-140(Peled等, *Clin. Cancer Res*. 2014年1月15日; 20(2): 469-79); N,N'-(1,4-亚苯基双(亚甲基))二嘧啶-2-胺, 还命名为MSX-122(Liang等, *PLoS One*. 2012; 7(4): e34038), 其处于针对复发性转移或局部晚期实体瘤的临床阶段, 其中Metastatix公司为赞助者; 以及N¹, N⁴-二-2-吡啶基-1,4-苯二甲胺, 还命名为WZ811(Zhan W等, *J Med Chem*. 2007年11月15日; 50(23): 5655-64)并且由Tocris Bioscience公司和Selleckchem公司(<http://www.selleckchem.com/products/wz-811.html>)进行销售。

[0049] 另外的二环酰胺类模拟物包括例如JM1657, 其由De Clercq E等(*Mini Rev Med Chem*. 2005年9月; 5(9): 805-24)进行描述并且尤其在美国公布号20060264451中进行描述。

[0050] 作为基于喹啉的CXCR4拮抗剂的实例, 可引用氯喹和羟氯喹药物诸如NSC56612, 其尤其由Kim JML等, *PLoS One*. 2012; 7(2): e31004)进行描述。

[0051] 在基于四氢喹啉的CXCR4拮抗剂中,可引用AMD070,它是强效的口服有效的CXCR4拮抗剂。这些化合物的独特结构特征是存在芯结构,即替换二环酰胺类的大环核的取代的(R)、(S)或(RS) (N`-(1H-苯并咪唑-2-基甲基)-N`-5,6,7,8-四氢喹啉-8-基-1,4-烷基胺)。它由AnorMed公司以名称AMD11070进行销售,并且处于通过NIAID进行的针对T-嗜性HIV感染的预防的临床研究中(Crawford JB等Org.Process Res.Dev.,2008,12(5),pp 823-830)。

[0052] 基于胍的CXCR4拮抗剂已尤其由Wilkinson RA等(Antimicrob Agents Chemother.2011;55:255-63)描述为含有多个胍基或双胍基的小分子。可引用例如NB325,例如聚乙烯-六亚甲基双胍,其由Thakkar N等(Antimicrob Agents Chemother.2009;53:631-8;)和由Krebs FC等(Biomed Pharmacother.2005;59:438-45)进行描述。其衍生物还描述为包括聚乙烯-六亚甲基双胍NB325以及在精氨酸侧链上具有五个胍基的肽T140的一些特征。其他活性衍生物包括例如苯胍。

[0053] 基于吡啶的CXCR4拮抗剂也由Ueda S等(Bioorg Med Chem Lett.2008;18:4124-9)进行描述,并且包括例如5-氨基吡啶-2-羧酸。

[0054] 基于嘧啶的拮抗剂尤其在专利公布号W02010/147094和US2009/0143302中进行描述。

[0055] TG-0054由Hsu等(Cell Transplant.2014年5月12日)描述为可注射的小分子和强效的选择性CXCR4拮抗剂。它还来自TaiGenBio pharmaceuticals控股有限公司的商品名布利沙福(Burixafor)命名,并且针对多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金病以及(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01018979)进行测试。

[0056] 其他化合物包括口服有效的低分子量的非肽化合物KRH-3955,其尤其由Nakasone T等(Med Microbiol Immunol.2013年4月;202(2):175-82)进行描述;生长素释放肽受体阻滞剂(D-[Lys3]GHRP-6),其由Patel K等(Int J Biol Sci.2012;8:108-17)进行描述;二酮哌嗪模拟物、噻唑异硫脲衍生物、苯并二氮卓以及二甲基吡啶胺-锌(II)络合物。

[0057] 根据本发明的组合物和使用方法还可包括基于肽的CXCR4拮抗剂。这些肽中的一些肽尤其由Costantini S等(J Pept Sci.2014年4月;20(4):270-8)进行描述。

[0058] 作为实例,可引用基于环状五肽的CXCR4拮抗剂,诸如T22([Tyr5,12,Lys7]-蜚肽(polyphemusin)II)、T140和T134,它们是高度强效的CXCR4拮抗剂,由Tamamura H等(BBRC,1998年12月30日;253(3):877-82;Bioorg Med Chem Lett.2001年2月12日;11(3):359-62;FEBS Lett.2004年7月2日;569(1-3):99-104)进行描述。具体地,描述了对于肽T140的活性是不可缺少的四种氨基酸残基:Arg2、L-3-(2-萘基)丙氨酸3(Na13)、Tyr5和Arg14。已经发现这些关键残基定位在二硫桥上并且在T140三维结构中邻近定位。Tamamura H等(FEBS Lett.第550卷,第1-3期,2003年8月28日,第79-83页)也将T140类似物(诸如TC14012、TE14005和TN14003)描述为CXCR4拮抗剂。

[0059] 可用于本发明的组合物和方法中的另一种环状五肽CXCR4拮抗剂是FC131。此环状五肽具有以下式:环[2-Na1-Gly-D-Tyr-Arg-Arg](SEQ ID NO:10),其中Na1是2-萘丙氨酸,Arg是精氨酸,Tyr是酪氨酸,并且Gly是甘氨酸。它尤其由Yoshikawa Y等(Bioorg Med Chem Lett.2012年3月15日;22(6):2146-50)进行描述,并且是强效的且口服有效的肽模拟物CXCR4抑制剂,并且由Tocris Bioscience公司进行销售。FC122还被描述为FC131的类似物,

其中精氨酸残基被差向异构体N-甲基-D-精氨酸替换。F131和FC122的另外的(E)-烯烃和(Z)-氟代烯烃类似物被描述为CXCR4拮抗剂(Narumi T等,Org Biomol Chem.2010;8:616-21)。

[0060] 具有环状四肽骨架的另外的CXCR4拮抗剂由Tamamura H等(J Med Chem.2005;48:3280-9)进行描述。

[0061] 可用作CXCR4拮抗剂的其他修饰的肽包括例如CTCE-9908(17氨基酸肽),它是具有修饰的P到G的8氨基酸N-末端序列的二聚体,通过赖氨酸桥接,由Wong等(BMC Urology,2014年1月,14:12)进行描述并且由Chemokine Therapeutics公司进行销售;POL6326,被De Nigris F等(Recent Pat Anticancer Drug Discov.2012年9月;7(3):251-64)描述为通过蛋白表位模拟物设计的重组蛋白质并且由Polyphor有限公司进行销售;LY2510924,其由Peng SB等(Mol Cancer Ther.2015年2月;14(2):480-90)进行描述;GST-NT21MP,由Gaisky MD等(Clin Cancer Res.2014年7月1日;20(13):3581-8)进行描述。

[0062] 根据本发明,CXCR4抑制剂还可以是针对CXCR4受体的基于抗体的部分,所述基于抗体的部分能够充当CXCL12拮抗剂。人类单克隆抗体尤其由Carnec X等,J Virol.2005年2月;79(3):1930-1933,以及在美国公布号2014/0322208中进行广泛地描述。完全人类单克隆抗体之一BMS-936564(在国际公布号WO 2008/060367中命名为F7)并且先前还命名为MDX-1338。大量其他单克隆抗体针对CXCR4的N末端部分、细胞外环ECL1、ECL2或ECL3。例如,抗CXCR4单克隆抗体A145被描述为针对N末端,而单克隆抗体A120针对由细胞外环ECL1和ECL2组成的构象表位,并且单克隆抗体A80 mAb针对CXCR4的ECL3(Adachi T等,Retrovirology.2011年10月22日;8:84)。其他人类抗CXCR4抗体例如由ThermoFisher Scientific公司、R&D Systems公司等...进行广泛销售,并且包括抗CXCR4单克隆抗体12G5、单克隆抗体708、单克隆抗体716以及单克隆抗体717(由R&D Systems公司以目录号MAB170、MAB171、MAB172和MAB173进行销售)、单克隆抗体2B11、44717.111、44716.111、44708.111(R&D Systems公司,Minneapolis,Minn,还参见Stalmeijer等,J Virol.2004年3月;78(6):2722-2728)。

[0063] 在本发明的范围内还包括对CXCR4配体的拮抗剂,例如CXCL12- α 和/或CXCL12- β (SDF-1- α 或SDF-1- β)拮抗剂,其可包括小有机或合成分子、天然产物、肽、蛋白质、肽模拟物、抗体、抗原结合片段、核酸试剂等等。具有结合CXCR4的能力并且具有拮抗活性的SDF-1截短物、变体、突变体蛋白或“突变蛋白(mutein)”也可用于实践本发明的方法。

[0064] 具有SDF-1活性的核酸抑制剂也已经被描述并且可用于本发明的组合物中。这些基于核酸的抑制剂可在受体结合水平或基因表达和翻译水平下起作用。具有CXCR4活性的核酸抑制剂包括但不限于核酸酶(诸如核酶)、核酸适体、反义核酸以及RNAi诸如siRNA。核酸CXCR4抑制剂在以下参考文献中进行描述:美国专利号6,429,308B1;美国公布号2005/0124569A1;美国专利号6,916,653B2;以及美国公布号2005/0202077。此类核酸抑制剂可包括反义寡核苷酸,其与编码CXCR4蛋白的染色体DNA和/或RNA的碱基序列的一些部分互补。本发明的反义寡核苷酸可以是DNA或RNA。

[0065] 具体地,当编码CXCR4蛋白的mRNA的基因转录起始点是+1时,反义寡核苷酸可与含有起始密码子区+61至+91的碱基序列互补,并且同时与所述序列特异性地稳定杂交并阻断其翻译成蛋白质,以便具有抑制CXCR4蛋白的生物合成的功能。可替代地,它可以是可未被

修饰或被化学地修饰的siNA,由此使用化学地修饰的siNA通过增强的对体内核酸酶降解的抵抗和/或通过提高的细胞摄取来改进天然siNA分子的各种特性,如在美国公布号2005/0202077中所阐述的。在范围内还包括编码CXCR4蛋白的mRNA,所述mRNA可通过锤头核酶裂解以便有效阻断这些蛋白质的产生,如在美国专利号6,916,653B2中所描述的。另外在范围内的是siNA,所述siNA可有效用于组合物中以包含与在美国公布号2005/0202077的SEQ ID NO:101-823中所提供的靶序列对应的siRNA序列。

[0066] 根据另一个实施方案,本发明的组合物和使用方法、趋化因子受体CCR2的拮抗剂在展示受体或拮抗剂的纤维细胞中预防与CCR2、其同种型或变体(包括CCR2A或CCR2B)相关联的生物功能或生物活性,所述拮抗剂结合MCP-1/CCL2或CCR2或者预防CCR2与其同源配体的结合并且从而抑制CCR2生物功能。具体地,CCR2的拮抗剂可抑制一种或多种配体(例如,MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-5、CCL2、CCL8、CCL16等等)与CCR2的结合和/或抑制通过CCR2介导的信号转导(例如,通过CCR2相关性G蛋白、细胞内钙流量进行的GDP/GTP交换),从而抑制CCR2介导的过程以及细胞应答和功能。

[0067] 可拮抗CCR2的一种或多种功能的分子是本领域中熟知的。具体地,多种强效的、口服生物可利用的小分子CCR2受体拮抗剂已经进入针对不同适应症的药物开发阶段。

[0068] 作为实例,可引用由AstraZeneca公司所销售的命名为AZD2423并且尤其由Kalliomaki等(Pain 2013年5月;154(5):761-7)所描述的小分子;由UCB Research公司以名称UCB 102405所开发的并且尤其由Higgins PJ等(Progress in inflammation research,第2卷,2007年,第115-123页)所描述的小分子;由Johnson&Johnson Pharmaceutical Research&Development有限责任公司以名称JNJ-17166864所开发的拮抗剂(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00604123并且也在由Jeremy I.Levin,Stefan Laufer编辑的出版物Anti-Inflammatory Drug Discovery,第378页中进行描述);RS 504393盐酸盐(Mirzadegan等,2000年8月18日,The Journal of Biological Chemistry,275,25562-25571)、RS 102895盐酸盐(Seok等,Nephrol.Dial.Transplant2013年7月;28(7):1700-10);由Teijin公司所开发的并且尤其在国际公布号W0 97/44329中所描述的基于哌嗪衍生物的CCR2拮抗剂。

[0069] Incyte公司还开发了名称为INCB-8696的大量小分子CCR2拮抗剂(Matera等,Expert Opin.Emerging Drugs(2012)17(1):61-82);吡啶基环己基-3-吡咯烷基衍生物INCB-3284(Xue CB等,ACS Med.Chem.Lett.,2011,2(6),第450-454页);苯并间二氧基羟基环己基衍生物INCB3344(Brodmerkel CM等,J.Immunol.2005年10月15日;175(8):5370-8.)、名称为PF-4136309或INCB8761的CCR2拮抗剂的多种(S)-3-氨基吡咯烷系列(Xue CB等,ACS Med Chem Lett.2011年10月5日;2(12):913-8);INCB3284二甲磺酸酯(Mcmillin等,J Neuroinflammation.2014年7月10日;11:121)。

[0070] 还可以引用由ChemoCentryx公司所开发的小分子CCX140-B(De Zeeuw D等,Lancet Diabetes Endocrinol.2015年9月;3(9):687-96);由Haihang Industry有限公司开发的D-赤式-戊糖醇衍生物MK-0812(Wisniewski T等”J Immunol Methods.2010年1月31日;352(1-2):101-10)。

[0071] Pfizer公司开发了名称为PF-04634817的CCR2受体拮抗剂(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01994291)以及基于己酸酰胺衍生物的CCR2抑制剂,所述CCR2抑制剂尤其

在国际公布号W0 98/38167中进行描述。

[0072] Bristol-Myers Squibb公司开发了基于内酰胺的化合物BMS-741672 (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT00699790) 和名称为BMS-813160或(S)-1-[(1S,2R,4R)-4-异丙基(甲基)氨基)-2-丙基环己基]-3-(6-(三氟甲基)喹啉-4-基氨基)吡咯烷-2-酮的另一种拮抗剂(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01752985);BMS CCR2 22 (Kredel等,J Biomol.Screen.2011年8月;16(7):683-93),

[0073] 多种四氢吡喃基环戊基四氢吡啶并吡啶化合物已被描述为CCR2拮抗剂并且由Merck公司开发,并且具体地是(1R,3S)-3-异丙基-3-[[3-(三氟甲基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基]羰基]环戊基[(3S,4S)-3-甲氧基四氢-2H-吡喃-4-基]胺,其尤其在国际公布号W02005044264中进行描述。Merck还开发了基于3-芳基哌啶的CCR2拮抗剂,如在国际公布号W0 98/31364中所描述的。

[0074] 多种其他小分子已经被描述并且包括3[(3S,4R)-1-((1R,3S)-3-异丙基-2-氧基-3-[[6-(三氟甲基)-2H-1,3-苯并噁嗪-3(4H)-基]甲基]环戊基)-3-甲基哌啶-4-基]苯甲酸;(3S,4S)-N-((1R,3S)-3-异丙基-3-[[7-(三氟甲基)-3,4-二氢异喹啉-2(1B)-基]羰基]环戊基)-3-甲基四氢-2H-吡喃-4-胺鎓(aminium);3-[(3S,4R或3R,4S)-1-((1R,3S)-3-异丙基-3-[[6-(三氟甲基)-2H-1,3-苯并噁嗪-3(4H)-基]羰基]环戊基)-3-甲基哌啶-4-基]苯甲酸,并且由Brodmerkel等(J.Immunol,2005,175:5370-7378)和在国际公布号W02012138880中进行描述。

[0075] 大量其他衍生物被描述为CCR2拮抗剂。作为实例,可引用哌啶基衍生物(W02012075115)、地西洋衍生物(W02011048032)、环己烷衍生物(W02010121046)、甲酰胺衍生物(W02010070032)、环戊基/环己基衍生物(W02013152269)、双环杂环(W02011042399)、吡啶衍生物(W02012125662)、巯基衍生物(W02005118578)、二哌啶衍生物(W02006036527)、杂芳基磺酰胺(US20100056509)、稠合的杂芳基吡啶基和苯基苯磺酰胺(W02009009740)。

[0076] 多种CCR2拮抗剂肽也已经被开发并且尤其在国际公布号W02013000922中进行描述。作为实例,可引用称为“ECL1(C) inverso”的七肽LGTFLLKC、具有氨基酸序列CKLFTGL的“ECL1(C)”、具有氨基酸序列LFTKC(SEQ ID NO:2)的“ECL2(N)”、具有氨基酸序列CKTFL(SEQ ID NO:3)的“ECL2(N) inverso”、具有氨基酸序列HTLMRNL(SEQ ID NO:4)的“ECL3(C)”、具有氨基酸序列LNRMLTH(SEQ ID NO:5)的“ECL3(C) inverso”、具有氨基酸序列LNTFQEF(SEQ ID NO:6)的“ECL3(N)”、具有氨基酸序列FEQFTNL(SEQ ID NO:7)的“ECL3 inverso”和/或具有序列Thr-Phe-Leu-Lys(SEQ ID NO:8)的肽。

[0077] 可替代地,CCR2拮抗剂可以是抗CCR2抗体和抗体片段。许多抗CCR2抗体是本领域中已知的并且是可商购获得的。Biolegend公司开发了多种抗人类CD 192(CCR2)抗体(参见<http://www.biolegend.com/cd192-ccr2-antibodies-6166/>)。具体地,还可引用单克隆抗CCR2抗体1D9(ATCC HB-12549)、8G2(ATCC HB-12550)、在国际公布号W0 01/57226中所描述的LS132、人类CCR2阻断抗体诸如MLN1202(Millennium Pharmaceuticals公司,Cambridge, MA)或使人类CCL2无效的人类抗体例如carlumab(CNT0 888;Centocor公司)(其由Loberg等,Cancer.Res.67(19):9417(2007)进行描述)。

[0078] 在本发明的范围内还包括对CCR2配体(例如MCP-1(CCL2)、CCL7和/或CCL13)的拮抗剂。

[0079] 此类拮抗剂可以是已熟知并在文献中进行良好描述的抗MCP-1抗体。作为抗MCP-1抗体,可引用能够结合已公开的多种趋化因子(包括MCP-1)的抗体(WO03048083)和也结合嗜酸性粒细胞趋化因子的MCP-1结合抗体(US20040047860)。选择性结合人类MCP-1/CCL2或人类MCP-1/CCL2的小鼠同系物并使其无效的抗体,像在US 20090297502中所描述的名称为C775的抗人类MCP-1/CCL2抗体以及名称为CNT0888的人类抗MCP-1/CCL2抗体(WO2006125202)。

[0080] 本发明的组合物还可包含具有结合CCR2的能力并且具有拮抗活性的MCP-1/CCL2截短物、变体、突变体蛋白或“突变蛋白”。形成趋化因子(诸如CCL2)的同型二聚体的变体具有在二聚化界面中改变氢键的模式的一个氨基酸取代,以便得到结合至受体并且具有体外激动特性,但是可拮抗天然趋化因子并且具有体内抗炎活性的专有单体,如在国际公布WO05037305A1中所教导的,所述变体属于适用于实践本发明的变体。MCP-1的肽拮抗剂是截短的MCP-1(9-76)(Jiang-Hong Gong等,J.Exp.Med.1997,186:131)。

[0081] 配体CCL7和CCL13的拮抗剂包括小有机或合成分子、天然产物、肽、蛋白质、肽模拟物、抗体、抗原结合片段、核酸试剂等等。CCL7和/或CCL13的肽拮抗剂通常可以是CCL7和/或CCL13的与全长CCL7和/或与全长CCL13竞争结合至CCR2并且因此拮抗CCL7和/或CCL13的片段。使用已知的技术并且基于CCL7的序列的知识,双链RNA(dsRNA)或单链反义RNA分子可被设计来通过其RNA的基于序列同源性的靶向来拮抗靶标。此类dsRNA或ssRNA通常将是茎环(“发夹(hairpin)”)构型的小干扰RNA(siRNA)或者是微小RNA(miRNA)。此类dsRNA或ssRNA的序列将包含与mRNA的编码靶标的部分的序列对应的部分。此部分通常将是与靶mRNA内的靶部分100%互补的,但是也可使用更低水平的互补(例如,90%或更多或95%或更多)。

[0082] 作为CCL7的拮抗剂,可引用具有CCL7拮抗剂(阻断)特性的抗CCL7抗体。优选的拮抗剂是特异性地识别CCL7内的表位并阻断CCL7的活性(具体地是CCR2与CCL7之间的相互作用)的单克隆抗体。具体地,对CCL7的单克隆抗体可包括由Pierce antibodies公司以名称CCL7抗体h.mcp.3所销售的CCL7单克隆抗体;由Sino Biological公司所销售的重组人类CCL7/MCP3蛋白(目录号11926-H08E);以及由Labome公司以名称MAI-21385所销售的CCL7抗体。

[0083] 作为配体CCL13的拮抗剂,可引用抗CCL13抗体,诸如来自Novus公司、Origene公司、Labome公司、Sigma Aldrich公司等...的抗体。针对CCL13的单克隆抗体包括H00006357-M03(Abnova公司)、MCP-4/CCL13抗体8C12(Pierce Antibodies公司)、MCP-4/CCL13抗体3G4(Pierce Antibodies公司)、人类CCL13/MCP-4抗体(R&D systems公司)等...

[0084] 根据另一个实施方案,本发明的组合物和使用方法包括趋化因子受体CCR3的拮抗剂预防与CCR3相关联的一种或多种生物功能或生物活性。CCR3功能的此拮抗剂可抑制一种或多种配体(例如,CCL11、CCL26、CCL7、CCL13、CCL15、CCL24、CCL5、CCL28、CCL18)与CCR3的结合和/或抑制通过CCR3介导的信号转导。因此,CCR3介导的过程以及细胞应答和功能可通过CCR3的拮抗剂抑制。如本文所用,“CCR3”是指天然存在的趋化因子受体3(例如,哺乳动物CCR3(例如,人类{智人}CCR3)并且涵盖天然存在的变体,诸如等位变体和剪接变体。

[0085] 大量分子已在本领域中描述为CCR3受体的一种或多种功能的拮抗剂。根据本发明的组合物和使用方法可包括基于小分子的CXCR3拮抗剂。作为实例,可引用小分子CCR3拮抗剂诸如口服候选GW776994,它由GSK公司开发(Neighbour H等,Clin Exp Allergy.2014年4

月;44(4):508-16); 苄基哌啶取代的芳基脲衍生物DPC-168 (Pruitt JR等, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 07/2007); 化合物(S)-甲基-2-萘酰基氨基-3-(4-硝基苯基)丙酸酯, 它由Calbiochem公司以名称SB328437进行销售并且尤其由Mori A等, (*Int Immunol.* 2007年8月; 19(8):913-21) 进行描述; 以及N-苯甲酰-4-硝基苯胺乙酯SB297006, 它也由Mori A.等, (*Int Immunol.* 2007年8月; 19(8):913-21) 进行描述; 由AstraZeneca公司开发的小分子诸如AZD1744 (Neighbour H等, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2010 13(4):414-427) 和AZD 3778 (Greiff L等, *Respir Res.* 2010年2月9日; 11:17); 反式-1,2-二取代的环己烷衍生物, 它由Bristol-Myer Squib公司以名称BMS639623开发并且由Santella JB等, (*Bioorg Med Chem Lett.* 2008年1月15日; 18(2):576-85) 进行描述; 口服拮抗剂YM-344031, 它尤其由Suzuki K等, (BBRC 2006年1月27日; 339(4):1217-23) 进行描述; A-122058, 它由Neighbour H等, (*Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2010 13(4):414-427) 进行描述; (S)-N-((1R,3S,5S)-8-((6-氟萘-2-基)甲基)-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基)-N-(2-硝基苯基)吡咯烷-1,2-二甲酰胺; (R)-1-(1-((6-氟萘-2-基)甲基)吡咯烷-3-基)-3-(2-(2-羟基乙氧基)苯基)脲; 基于吗啉-乙酰胺的化合物, 诸如4-[[(2S)-4-[(3,4-二氯苯基)甲基]-2-吗啉基甲基-氨基羰基]-氨基甲基苯甲酰胺; 以及基于吗啉脲的化合物N-[[(2S)-4-[(3,4-二氟苯基)甲基]-2-吗啉基]-甲基]-3-[(甲基磺酰基)氨基]-苯乙酰胺。

[0086] 其他熟知的CCR3拮抗剂包括2-巯基苯并噻唑衍生物、芳基或苯基磺酰胺衍生物 (W02012051090)、桥接的双环胺衍生物 (W02004076448)、地西洋衍生物 (W02011048032)、取代的哌啶 (W02010115836)、吡咯烷基烷基酰胺衍生物 (W02010013078)、双环杂环 (W02011042399)、哌啶基衍生物 (W02008049874)、氨基烷基酰胺衍生物 (W02007034251)、咪唑衍生物 (W02007025751)、氮杂环丁烷衍生物 (W003077907)、吡喃衍生物 (W02010069979)、取代的嘧啶衍生物 (W02004004731) 或吗啉基衍生物 (W003099798)。

[0087] 基于抗体的CCR3拮抗剂也已经被开发并且包括例如可从Biolegend公司获得的PE抗人类CD 193 (CCR3) 抗体、可从Abcam公司获得的抗CCR3抗体 (ab32512、ab36827、ab36829、ab36827、abl667、abl6231、abl57139)、来自OriGene公司的Y31、来自eBioscience公司的eBio5E8-G9-B4、来自R&D systems公司的人类CCR3 MAb (克隆61828)。还参见例如, 美国专利号6,806,061和6,207,155, 以及在关于特异性结合并抑制CCR3受体的示例性抗体的美国公布申请号20050191702、20050069955和20020147312中和美国专利号6,946,546和6,635,251, 以及关于示例性抗体的美国公布申请20040191255和20040014132。

[0088] 用于抑制CCR3受体的另外的化合物包括针对CCR3的RNA、DNA或RNA/DNA适体。具体地, 适体已在美国专利号5,270,163、5,840,867、6,180,348和6,699,843中进行描述。用于抑制CCR3受体的其他化合物包括针对CCR3、嗜酸性细胞活化趋化因子-1、嗜酸性粒细胞趋化因子-2或嗜酸性粒细胞趋化因子-3的反义寡核苷酸或siRNA, 包括针对CCR3受体的反义寡核苷酸, 诸如在美国专利号6,822,087中所描述的那些。

[0089] 基于肽的CCR3拮抗剂可衍生自噬菌体库, 例如像如由Houimel M等 (*Eur. J. Immunol.* 2001年12月; 31(12):3535-45) 所描述的肽CPWYFWPC (SEQ ID NO:9) 或如在国际公布号W01999043711中所描述的CCR3的肽类似物。

[0090] 在本发明的范围内还包括对CCR3配体的拮抗剂, 例如像CCL11拮抗剂, 其可包括小

有机或合成分子、天然产物、肽、蛋白质、肽模拟物、抗体、抗原结合片段、核酸试剂等等。具有结合CCR3的能力并且具有拮抗活性的CCL11截短物、变体、突变体蛋白或“突变蛋白”也可用于实践本发明的方法。特别优选的CCR3拮抗剂是萘基羰基衍生物SB 328437。

[0091] 适用于根据本发明使用的CCR2、CCR3和/或CXCR4拮抗剂可单独施用,但是通常在人类疗法中与结合预期施用途径和标准药理学实践而选择的合适的药理学上可接受的媒介物、赋形剂、稀释剂或载体混合施用。此类药理学上可接受的媒介物或赋形剂可存在的量是在0.1重量%与小于100重量%之间。优化的药物-赋形剂比率是本领域普通技术人员可达到的,例如组合物中所需的药物/赋形剂的重量比在合适的介质中可小于或等于药物/赋形剂的溶解度比率。

[0092] 根据本发明的组合物因此优选地是用于在治疗和/或预防COPD和AECOPD的方法中使用的药物组合物,并且因此包含治疗有效量的CCR2/CCL2、CCR2/CCL7、CCR2/CCL13、CXCR4/CXCL12和/或CCR3/CCL11受体/配体对的至少一种拮抗剂或抑制剂和药理学上可接受的载体。此类药物组合物有效于减少与COPD相关联并通过CCR2和/或CCR3和/或CXCR4介导的纤维细胞募集和迁移。

[0093] 治疗有效量是足以实现组织中的有效全身性浓度或局部浓度和所需作用(即,抑制或阻断/拮抗以上受体/配体对中的一种或多种)的预定量。当然,化合物根据本发明进行施用以获得治疗性和/或预防性作用的具体剂量将由医师基于患者的状况、体重、年龄和性别、所施用化合物、施用的途径等...做出决定。

[0094] 本发明的药物组合物可口服、经颊或舌下施用,并且可以是呈片剂、胶囊(包括软凝胶胶囊)、多微粒、凝胶、薄膜、酞剂、溶液或悬浮液的形式,其可含有调味剂或着色剂以用于即时释放、延迟释放、改进释放、持续释放、双重释放、受控释放或脉动递送应用。此类化合物还可通过快速分散或快速溶解剂型施用或以高能量分散体的形式施用或作为涂覆颗粒施用。合适的药物制剂可按需要呈涂覆或非涂覆的形式。

[0095] 此类固体药物组合物(例如,片剂)可含有赋形剂诸如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙、甘氨酸和淀粉;崩解剂诸如淀粉羟乙酸钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复合硅酸盐;以及成粒粘合剂诸如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯(HPMCAS)、蔗糖、明胶以及阿拉伯胶。另外,可包含润滑剂诸如硬脂酸镁、硬脂酸、山嵛酸甘油酯和滑石。类似类型的固体组合物也可用作明胶胶囊或HPMC胶囊中的填充剂。在这方面赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、乳糖或高分子量聚乙二醇。对于水性悬浮液和/或酞剂,CCR2、CCR3和/或CXCR4拮抗剂可与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料,与乳化剂和/或助悬剂,以及与稀释剂(诸如水、乙醇、丙二醇和甘油)及其组合相结合。

[0096] 改进释放剂型和脉动释放剂型可含有赋形剂,诸如针对即时释放剂型详细描述的那些赋形剂连同充当释放速率调节剂的另外赋形剂,这些赋形剂涂覆在装置的主体上和/或包含在所述主体内。释放速率调节剂包括但不排他地限于HPMC、HPMCAS、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、乙酸钠、聚环氧乙烷、黄原胶、卡波姆(Carbomer)、氨基甲基丙烯酸酯共聚物、氢化蓖麻油、巴西棕榈蜡、石蜡、醋酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸共聚物及其混合物。改进释放剂型和脉动释放剂型可含有释放速率调节赋形剂中的一种或其组合。释放速率调节赋形剂可存在于剂型内(即,在基体

内)和/或存在于剂型上(即,在表面或涂层上)两者。

[0097] 快速分散或溶解剂量制剂(FDDF)可含有以下成分:阿斯巴甜、乙酰磺胺酸钾、柠檬酸、交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、双抗坏血酸、丙烯酸乙酯、乙基纤维素、明胶、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、甲基丙烯酸甲酯、薄荷调味剂、聚乙二醇、煅制二氧化硅、二氧化硅、淀粉乙醇酸钠、硬脂酰富马酸钠、山梨糖醇、木糖醇。如文本所用的描述FDDF的术语分散或溶解取决于所使用的药物物质的溶解度,即在药物物质不可溶解的情况下,可制备快速分散剂型,并且在药物物质可溶解的情况下,可制备快速溶解剂型。

[0098] 根据本发明的组合物和使用方法可肠胃外施用,例如海绵体内、静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内或皮下施用,或者它们可通过输注或无针技术施用。对于此类肠胃外施用,它们最佳地以无菌水溶液的形式使用,所述无菌水溶液可含有其他物质,例如足够的盐或葡萄糖以使溶液与血液等渗。如果需要的话,水溶液应被合适地缓冲(优选地,缓冲至约3至9的pH)。在无菌条件下制备合适的肠胃外制剂易于通过对本领域的技术人员所熟知的标准制药技术实现。

[0099] 对于给患者的口服和肠胃外施用,可以是CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂的每日剂量水平,如由医师确定的,并且将随年龄、体重和具体患者的应答而变化。剂量可以是单剂量、分开的每日剂量或多个每日剂量。可替代地,例如像通过受控(例如,缓慢)释放剂型进行的连续给药可在每日基础上施用或多于一天一次地施用。

[0100] 根据本发明的组合物可鼻内或通过吸入施用,并且以干粉吸入器或来自加压容器、泵、喷雾器或雾化器的气溶胶喷雾呈递的形式借助于合适的推进剂(例如,二氟二氯甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷烃(诸如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A(TM))或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227EA(TM))、二氧化碳或其他合适的气体)便利地递送。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可通过提供阀以递送计量的量来确定。加压容器、泵、喷雾器或雾化器可含有活性化合物的溶液或悬浮液,例如使用乙醇和推进剂的混合物作为溶剂,所述溶剂可另外地含有润滑剂,例如脱水山梨糖醇三油酸酯。用于在吸入器或吹入器中使用的胶囊和药筒(明胶胶囊)可配制成含有本发明的化合物和合适的粉末基底(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0101] 气溶胶或干粉制剂优选地布置成使得每个计量的剂量或“吸入量”含有用于向待治疗的患者递送的治疗有效量的CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂。使用气溶胶的总每日剂量的范围将是约1至50mg,所述总每日剂量可以单次剂量施用,或更通常以一整天的分开剂量施用。适用于根据本发明使用的CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂还可配制成用于通过雾化器递送。用于雾化器装置的制剂可包含作为增溶剂、乳化剂或助悬剂的以下成分:水、乙醇、甘油、丙二醇、低分子量聚乙二醇、氯化钠、碳氟化合物、聚乙二醇醚、脱水山梨糖醇三油酸酯以及油酸。

[0102] 适用于根据本发明使用的CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂还可与环糊精组合使用。已知环糊精与药物分子形成包合络合物和非包合络合物。药物-环糊精络合物的形成可改进药物分子的溶解度、溶解速率和生物可利用度和/或稳定特性。药物-环糊精络合物通常适用于大多数剂型和施用途径。作为与药物直接络合的替代方案,环糊精可用作辅助添加剂,例如用作载体、稀释剂或增溶剂。 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精是一些最常用的环糊精,并且合适的实例在PCT公布号WO 91/11172、WO 94/02518和WO 98/55148中进行描述。根

据本发明,口服施用是优选的途径。

[0103] 在接受者患有吞咽病症或在口服施用之后遭遇药物吸收困难的情况下,药物可肠胃外、舌下或经颊施用。在药剂是口服无活性的情况下,那么可使用肠胃外施用。

[0104] 其他可能的制剂(诸如纳米颗粒、脂质体和基于免疫的系统)也可用于施用适当剂量的根据本发明的组合物拮抗剂。

[0105] CXCR4、CCR2和/或CCR3受体的拮抗剂可单个地或以其组合地施用。此外,CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂可在时间意义上单个地或以其组合地施用,即它们可同时、在彼此之前和/或彼此之后施用。根据本文所提供的公开内容,CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂适用于减少和/或抑制纤维细胞迁移和分化,并且因此适用于治疗和/或预防COPD以及AECOPD。

[0106] 本发明还提供包括适当剂量的用于在预防和/或治疗COPD和AECOPD的方法中使用的如上所述的CXCR4拮抗剂或组合物的试剂盒或药物包装。除了例如片剂、胶囊或冻干粉未形式的组合物之外,试剂盒或药物包装可包括用于使用和施用预防和/或治疗COPD和AECOPD的组合物的说明书。此类试剂盒或包装可以瓶或另一种适当的形式(例如,泡罩包装)提供。任选地,试剂盒或药物包装还可包括用于施用药物的其他药物活性剂和/或材料,诸如稀释剂、针头、注射器、施用器等等。

[0107] 具体地,根据本发明的药物组合物和试剂盒可口服或通过吸入与其他药物活性剂结合施用,所述药物活性剂例如像支气管扩张剂(LABA、LAMA)、肾上腺皮质激素和/或磷酸二酯酶抑制剂。

[0108] 本发明还提供一种在患有COPD或AECOPD或具有患COPD或AECOPD的风险的受试者中抑制通过CXCR4、CCR2和/或CCR3介导和/或调节的纤维细胞增殖、迁移和分化的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的如上所述的药物组合物。

[0109] 根据第二实施方案,本发明涉及筛选或鉴定可用于本文所述的治疗和/或预防的方法中的药剂的体外或体内方法。根据第二实施方案的筛选方法可包括确定药剂是否抑制CXCR4、CCR2和/或CCR3配体的结合和/或功能,接着确认其是否有效于治疗和/或预防COPD和/或AECOPD。可替代地,筛选方法可简单地涉及针对其治疗和/或预防COPD和/或AECOPD的功效测试已知是CXCR4、CCR2和/或CCR3抑制性治疗剂的药剂。针对其改变CXCR4、CCR2和/或CCR3活性的功效测试药剂可使用本领域中熟知的体外和/或体内方法(Charo等,(1994)PNAS 91,2752-2756)实施。此类活性化合物的治疗功效可在细胞培养物中或在细胞模型中通过标准治疗程序确定,例如用于确定ED50(化合物的产生最大作用的50%的浓度)。此测试可在针对COPD和/或AECOPD的适当的动物模型系统中实施。

[0110] 根据此实施方案,CXCR4、CCR2和/或CCR3功能的另外的拮抗剂可例如通过筛选分子集合库来鉴定。CXCR4、CCR2和/或CCR3功能的拮抗剂的另一个来源可以是组合库,所述组合库可包括许多结构上不同的分子物种。组合库可用于鉴定前导化合物或优化先前鉴定的前导物。此类文库可通过熟知的组合化学方法制造并且通过合适的方法筛选。

[0111] 其他选择性CXCR4、CCR2和/或CCR3拮抗剂可使用本领域的技术人员已知的标准测定法来鉴定。简言之,鉴定选择性调节剂的一种筛选类型使用细胞系,包括原代细胞或CXCR4、CCR2和/或CCR3转染细胞。可替代地,可利用动物模型。

[0112] 根据本发明的此实施方案的方法因此特别适用于筛选/鉴定能够降低在COPD中或在AECOPD期间的纤维细胞迁移和分化的药剂。所述方法可包括对过表达CXCR4、CCR2和/或

CCR3的测试动物进行施用并且分析与施用测试药剂之前的水平相比，CXCR4、CCR2和/或CCR3的量是否降低，其中如果CXCR4、CCR2和/或CCR3的量降低，则测试药剂被鉴定为能够降低COPD和/或AECOPD中的纤维细胞迁移和分化的药剂。

[0113] 根据另一个实施方案，本发明涉及一种评估受试者中的COPD或AECOPD的风险的方法，其包括；a) 从所述受试者获得合适的样品、b) 分离并鉴定所述样品中的循环纤维细胞、c) 任选地评估所述样品中的纤维细胞迁移以及d) 测量CXCR4、CCR2和/或CCR3趋化因子受体或优选地CXCL12趋化因子，具体地CXCL12- α 在所述样品中的表达水平。此类方法还可包括向诊断具有患COPD、AECOPD的风险或诊断患有COPD或AECOPD的受试者施用有效量的如上所述的药物组合物。

[0114] 根据另一个实施方案，本发明提供一种测量选自CXCR4、CCR2和/或CCR3组成的组的至少一种基因在外周血纤维细胞中的水平的体内方法。本发明还提供一种用于监测在患有COPD的患者中对治疗剂的应答的方法，其包括测量选自CXCR4、CCR2和/或CCR3组成的组的至少一种基因在患者的外周血纤维细胞中的表达水平的步骤。

[0115] 在整个此申请中，引用各种参考文献并且这些出版物的公开内容以引用的方式全部在此并入到此申请中，以便更全面地描述本发明所属领域的状态。

[0116] 实施例

[0117] 实施例1-招收受试者

[0118] 如果年龄大于40岁的受试者根据GOLD准则 (Gold 1998. 慢性阻塞性肺病全球倡议，慢性阻塞性肺病的诊断、管理和预防的全球策略 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention for Chronic Obstructive Pulmonary Disease), NIH出版物-2011年更新) 具有COPD恶化的临床诊断，则他们是有招收资格的。具有恶化的COPD患者在重症监护室住院期间被招募或者作为波尔多 (Bordeaux) CHU的临床调查中心的门诊患者被招募。招募没有任何肺病史并且具有正常肺功能测试的48位健康志愿者。根据吸烟史 (从不吸烟者、曾经吸烟者或当前吸烟者) 将受试者分在2个子组中，并且根据年龄和性别与患者配对。

[0119] COPD患者和健康受试者的主要排除原则是哮喘、肺纤维化、特发性肺动脉高血压和慢性病毒感染 (肝炎、HIV)。恶化COPD患者和对照受试者参与“Firebrob”研究。另外，在最少一年时间段期间没有恶化的COPD患者也作为波尔多CHU的临床调查中心的门诊患者被招募 (“Cobra”研究)。他们在下文下被设计为“非恶化COPD患者”。所有受试者均提供书面知情同意书。研究方案由当地研究道德委员会和法国国家药品和保健品安全局 (French National Agency for Medicines and Health Products Safety) 批准。

[0120] 实施例2-“Firebrob”研究的设计

[0121] 所述研究在3年期间在中心组临床试验中进行。研究的概述提供在图1中。所述研究以N^oNCT01196832在ClinicalTrials.gov上注册 (即，“Firebrob”研究)。

[0122] 对于恶化COPD患者有两次访问：在恶化期间 (入选，V1) 的访问、恶化之后两个月 \pm 7天 (稳定状态，V2) 的访问。入选访问 (V1) 由知情同意书的信息和签名、获取用于纤维细胞分析的血液样品 (50ml) 组成。第二次访问 (V2) 由临床和功能性评价 (体积描记法、TLC0、动脉gaz) 以及获取用于纤维细胞分析的血液样品组成。对于对照受试者和“非恶化COPD患者”有一次访问，在所述访问期间，签署知情同意书，进行临床和功能性评价 (体积描记法、

TLCO、动脉气体 (arterial gaz))，并且获取用于纤维细胞分析的血液样品。

[0123] 实施例3-“Cobra”研究的设计

[0124] 对于“非恶化COPD患者”有一次访问，在所述访问期间，签署知情同意书，进行临床和功能性评价 (体积描记法、TLCO、动脉气体)，并且获取用于纤维细胞分析的血液样品。

[0125] 所述研究以N^oCPP 0811738注册 (即，“Cobra”研究)

[0126] 实施例4-循环的纤维细胞

[0127] 进行非粘附性非T (NANT) 细胞的纯化。简言之，通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心将外周血单核细胞 (PBMC) 从全血中分离。在首先在150g下分离15分钟之后，收获顶部血浆层并且将其保持在-80℃下以用于进一步分析。收获在介面处的单核细胞，使用1X PBS洗涤一次。通过在30s期间添加20ml的低渗0.2%NaCl溶液，接着添加20ml的1.6%NaCl以得到等渗溶液来进行红细胞裂解。再次使用1X PBS洗涤单核细胞，将其重悬在补充有20%胎牛血清 (FBS)、青霉素/链霉素以及MEM非必需氨基酸的Dulbecco's modified Eagle培养基 (DMEM)、4.5g/l葡萄糖、L-谷氨酰胺中，并且在37℃下孵育1h。获取非粘附性单核细胞级分并且在冷的1X PBS 0.5%BSA、2mM EDTA中洗涤。使用抗CD3单克隆抗体 (Miltenyi Biotech) 进一步消耗T细胞。将至少 0.2×10^6 个非粘附性非T (NANT) 细胞分布在每个FACS管中并且使用Cytotfix/Cytoperm (eBioscience) 固定过夜。

[0128] 实施例5-循环的纤维细胞的鉴定和表征

[0129] 通过流式细胞术鉴定对于表面标记物CD45和细胞内标记物胶原蛋白I呈双阳性的纤维细胞。将固定的血液NANT细胞在透化缓冲液 (eBioscience) 中洗涤，并且与小鼠抗人类胶原蛋白I抗体 (Millipore目录号MAB3391, RRID:AB_94839) 或与匹配的IgG1同种型对照物 (Santa Cruz Biotechnology目录号sc-3877, RRID:AB_737222) 孵育，接着与异硫氰酸荧光素 (FITC) 缀合的抗小鼠抗体 (Beckman Coulter目录号IM0819) 孵育。接下来，将细胞团与别藻蓝蛋白 (APC) 缀合的抗CD45抗体 (BD Biosciences目录号555485, RRID:AB_398600) 或与匹配的APC缀合的IgG1同种型对照物 (BD Biosciences目录号555751, RRID:AB_398613) 孵育。使用BD FACSCanto II流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 分析细胞悬浮液。使用FACSDiva软件进行离线分析。使用匹配的APC缀合的IgG1同种型对照物设定CD45的负阈值，并且对所有随后的样品的CD45阳性区域进行选通。针对胶原蛋白-1的表达分析对CD45选通的细胞，其中负对照阈值使用FITC染色的细胞来设定。对胶原蛋白-1进行的特异性染色被确定为超过此阈值的阳性事件的增加。将纤维细胞数量表示为总PBMC数的百分比。

[0130] 实施例6-纤维细胞迁移

[0131] 使用改进的Boyden室测定法评估纤维细胞迁移。在室温下使用聚赖氨酸-乙二醇 (PEG-PLL, Susos) 涂覆transwell插入物 (孔径8μm) 和孔1h，以防止细胞粘附。使用PBS冲洗插入物和孔。将重悬在0.2ml重悬在补充有ITS、青霉素/链霉素和MEM非必需氨基酸的0.2ml DMEM、4.5g/l葡萄糖、L-谷氨酰胺、补充性DMEM、4.5g/l葡萄糖、L-谷氨酰胺中的 0.3×10^6 个非粘附性非T (NANT) 细胞添加到每个孔的上部隔室。在指出时，将NANT细胞通过25μg/ml普乐沙福 (Sigma-Aldrich公司) 或10μM SB 328437 (R&D Systems公司) 在37℃下预处理1h，然后添加到上部隔室。将重组人类CXCL12 (25ng/ml至200ng/ml; R&D Systems公司)、重组人类CXCL11 (25ng/ml至200ng/ml; R&D Systems公司) 或来自COPD V1患者或对照受试者的血液提取的血浆 (50%稀释) 添加到每个孔的底部隔室。在约12h之后，将底部隔室的内容物去

除,以使用双标记的CD45-胶原蛋白I通过流式细胞仪评估纤维细胞迁移。为了获得迁移细胞的绝对值,在连续的预定时间段(1分钟)期间获得每个条件的流式细胞术计数。迁移的纤维细胞的分数由在底部隔室中所计数的CD45+胶原蛋白I+细胞的数量除以加入在底部隔室中的CD45+胶原蛋白I+细胞的数量之间的比率来定义。将这些值归一化为在基础条件(仅培养基)中获得的迁移纤维细胞的分数。

[0132] 实施例7-血浆CXCL12和CCL11的测量

[0133] 根据制造商的说明书(R&D Systems公司),通过ELISA测量血浆CXCL12和CCL11。

[0134] 实施例8-临床试验的结果

[0135] 招收和基线特征

[0136] 招收58位恶化COPD患者和48位对照受试者(图1)。然后定量48位恶化COPD患者(V1)、9位非恶化COPD患者和38位对照受试者中的纤维细胞水平。然后定量稳定状态(V2)下的27位COPD患者中的纤维细胞水平。

[0137] 循环的血液纤维细胞

[0138] 与“非恶化COPD患者”(“Nex”,PBMC的中值=2.4(95%CI,0.3至6.8),n=9,p<0.05)和对照受试者(PBMC的中值=3.0(95%CI,3.1至5.3),n=38,p<0.001)相比,患有COPD的患者在恶化(“V1”,PBMC的中值=9.6(95%置信区间[CI],9.5至15.7),n=48)期间的血液纤维细胞(CD45+胶原蛋白+细胞)的百分比更高(图2A)。当结果表示为绝对值计数/毫升血液时,纤维细胞水平获得类似的结果(图2B)。恶化COPD患者中循环CD34-阳性纤维细胞的百分比(图2C)和绝对值(图2D)两者与对照受试者的那些百分比和绝对值相比均有所增加。然而,当基于他们对恶化COPD的治疗(抗生素、口服肾上腺皮质激素)、通气模式(自发通气、无创通气或插管)、住院治疗与否将恶化COPD患者分成几个子组时,没有观察到不同子组之间纤维细胞的显著差异(数据未示出)。

[0139] 在恶化两个月之后(“V2”),与在V1评估的那些纤维细胞百分比和绝对值(p<0.01)相比,纤维细胞的百分比(图2E)和绝对值(图2F)两者均显著减小。另外,在V1之前一年对COPD进行2次或更多次不定期访问和没有任何不定期访问的患者子组中,在V2时纤维细胞百分比存在显著增加。

[0140] 纤维细胞、存活与功能性参数和临床参数二者之间的关系

[0141] 在V1之后1.4年和多至3年的中值时间段内收集COPD患者的存活数据。基于在V1时评估的纤维细胞百分比,在患者的2个子组中进行Kaplan-Meier存活分析。与具有少于28%的纤维细胞的患者相比,具有多于28%的纤维细胞的患者具有显著减少的期望寿命(图3A)。在性别比率、年龄、FEV1、FVC、PaO₂方面,2个子组之间没有数据差异(数据未示出)。具有多于28%的纤维细胞的患者子组由均需要住院治疗的具有极性恶化的6位患者组成,而具有少于28%的纤维细胞的患者子组由具有极性恶化的36位患者组成(20位需要住院治疗并且16位不需要住院治疗)。

[0142] 还确定在第二次访问时(即,在恶化两个月之后在稳定状态下进行的V2)评估的纤维细胞百分比与各种功能性参数之间的相关系数。纤维细胞百分比与FEV1(预测%,图3B)、FVC(预测%,图3C)、FEV1/FVC比率(% ,图3D)、TLC0(预测%,图3E)以及PaO₂(mmHg,图3F)负相关并且显著相关。在第二次访问时的循环纤维细胞百分比与FEV1(L)、FVC(L)或FEF25-75(L/s和预测%)之间获得类似的负相关性。相比之下,恶化患者的循环纤维细胞百分比与年

龄之间没有显著的相关性(数据未示出)。

[0143] 趋化因子受体的纤维细胞表达

[0144] 通过流式细胞术进一步分析趋化因子受体在纤维细胞中的表达。CXCR4、CCR2和CCR3被高比例的纤维细胞表达(图4A、图4C、图4E),而CCR5和CCR7仅可见于小比例的CD45+胶原蛋白I+细胞上(图4G和图4H)。COPD患者中的CXCR4+和CCR3+纤维细胞水平比对照受试者更高(图4B、图4D和图4F)。

[0145] CXCL12/CXCR4轴和CCL11/CCR3轴在纤维细胞迁移中的作用

[0146] 因为更多的CXCR4+和CCR3+纤维细胞可见于恶化COPD患者的血液中,所以在体外测定中研究CXCR4和CCR3两者在血浆诱导的纤维细胞迁移中的作用。CXCR4拮抗剂普乐沙福(De Clercq, E. 2003. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2(7):581-7)诱导了从恶化COPD患者获得的血浆诱导的纤维细胞募集的显著减少,但是没有诱导从正常受试者获得的纤维细胞迁移的显著减少(图5A)。相比之下,来自恶化COPD患者或来自对照受试者的血浆诱导的纤维细胞迁移不受CCR3拮抗剂SB 328437(White, J.R., 等2000. *J Biol Chem* 275(47):36626-31)的影响。还比较CXCR4和CCR3的一些配体的血浆浓度。CXCL12 α (CXCR4的配体)以及CCL11和CCL13(CCR3的配体)的血浆浓度在各组之间没有显著不同(图5B)。因此,检查纤维细胞对增加浓度的CXCL12 α 和CCL11的迁移应答。CXCL12 α (图5C)而非CCL11以剂量依赖方式诱导显著的纤维细胞迁移。有趣的是,与来自对照受试者的纤维细胞(图5C)相比,100ng/ml的CXCL12 α 诱发来自恶化COPD患者的显著更高的纤维细胞迁移,从而表明与来自对照物的纤维细胞相比,来自恶化COPD患者的纤维细胞具有增强的对CXCL12的化学敏感性。此应答通过使用普乐沙福的治疗完全消除,从而表明此响应完全由CXCR4介导(图5D)。

[0147] 实施例9-根据本发明的组合物和使用方法对COPD小鼠模型的影响

[0148] 将暴露于香烟烟雾(CS)的小鼠模型与病毒恶化组合。所述病毒恶化通过注射诱导与由病毒感染诱导的那些应答类似的应答的双链RNA(即聚(I:C))来引发。

[0149] 在5周期间将小鼠暴露于香烟烟雾(CS)或室内空气(RA)。在方案的最后2周,每周注射两次聚(I:C)或媒介物(PBS)。如图9所示,CS和聚(I:C)暴露导致支气管肺泡灌洗(BAL)总细胞和巨噬细胞回收的适度增加。然而,观察到嗜中性粒细胞和淋巴细胞回收明显增加(图9)。

[0150] 同样,对来自从暴露于CS和聚(I:C)的小鼠相对于暴露于室内空气和PBS的对照小鼠获得的支气管部分的电子显微图像的分析证明CS和聚(I:C)诱导了小且不大的气道纤维化(图10A)。因此,CS和聚(I:C)的组合产生支气管气道的炎症和对COPD疾病的结构改变特征。如在COPD患者中观察到的支气管气道炎症的增加以及支气管周围纤维化的增加已清楚地示出在图10B中。

[0151] 此外,循环纤维细胞(“血液”,图11)和肺纤维细胞(“肺”,图11)百分比的增加已在暴露于香烟烟雾和聚(I:C)两者的小鼠中得到证明。有趣的是,肺纤维细胞百分比与小气道纤维化相关(图12),从而表明纤维细胞在此病理生理学过程中的作用。总之,这些数据确认了在COPD患者中获得的结果,并且增加了关于纤维细胞到肺中的募集的重要信息,在肺中纤维细胞在支气管周围纤维化中发挥关键性作用。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> UNIVERSITE DE BORDEAUX
- [0003] INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE -
- [0004] INSERM
- [0005] CENTRE HOSPITALIER DE BORDEAUX
- [0006] <120> 治疗和/或预防慢性阻塞性肺病
- [0007] 的新组合物和方法
- [0008] <130> 1503-PCT
- [0009] <160> 8
- [0010] <170> PatentIn 3.3版
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 7
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人类
- [0015] <400> 1
- [0016] Leu Gly Thr Phe Leu Lys Cys
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 5
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 人类
- [0022] <400> 2
- [0023] Leu Phe Thr Lys Cys
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 5
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 人类
- [0029] <400> 3
- [0030] Cys Lys Thr Phe Leu
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 7
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人类
- [0036] <400> 4
- [0037] His Thr Leu Met Arg Asn Leu
- [0038] 1 5

[0039] <210> 5
[0040] <211> 7
[0041] <212> PRT
[0042] <213> 人类
[0043] <400> 5
[0044] Leu Asn Arg Met Leu Thr His
[0045] 1 5
[0046] <210> 6
[0047] <211> 7
[0048] <212> PRT
[0049] <213> 人类
[0050] <400> 6
[0051] Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe
[0052] 1 5
[0053] <210> 7
[0054] <211> 7
[0055] <212> PRT
[0056] <213> 人类
[0057] <400> 7
[0058] Phe Glu Gln Phe Thr Asn Leu
[0059] 1 5
[0060] <210> 8
[0061] <211> 4
[0062] <212> PRT
[0063] <213> 人类
[0064] <400> 8
[0065] Thr Phe Leu Lys
[0066] 1
[0067] <210> 9
[0068] <211> 8
[0069] <212> PRT
[0070] <213> 人类
[0071] <400> 9
[0072] Cys Pro Trp Tyr Phe Trp Pro Cys
[0073] 1 5
[0074] <210> 10
[0075] <211> 5
[0076] <212> PRT
[0077] <213> 人类

[0078] <400> 10

[0079] Gly Asp Tyr Arg Arg

[0080] 1 5

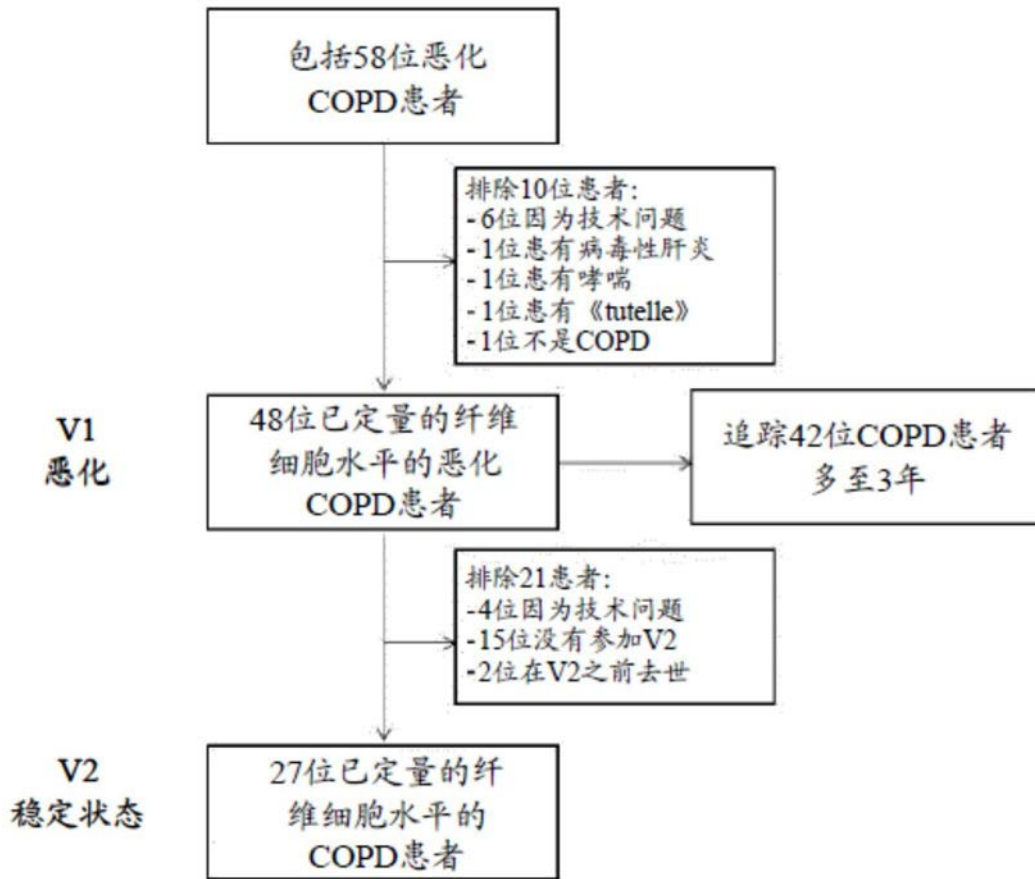


图1

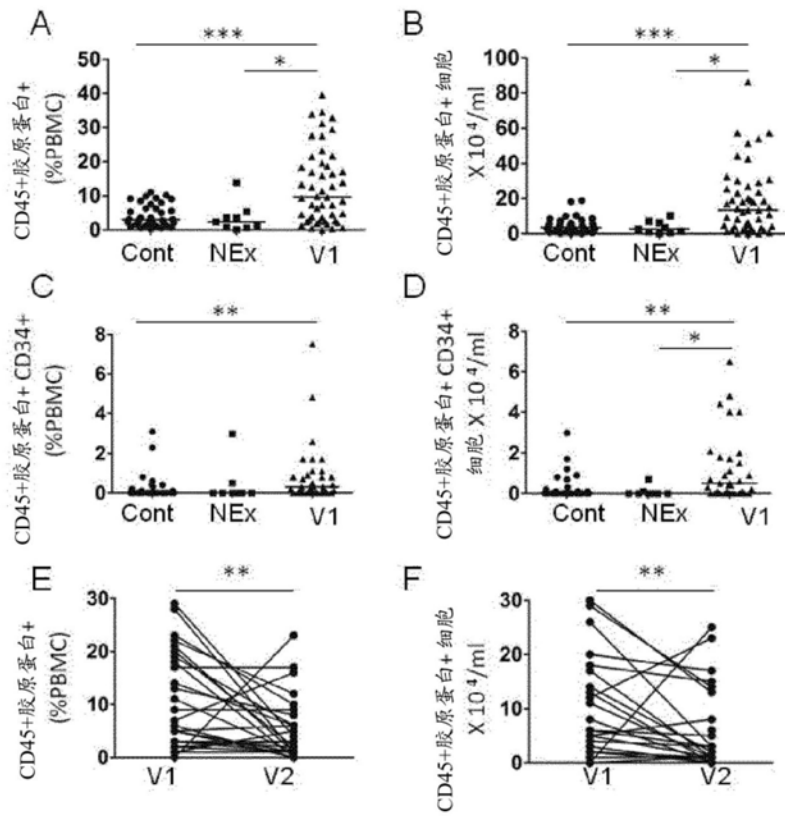


图2

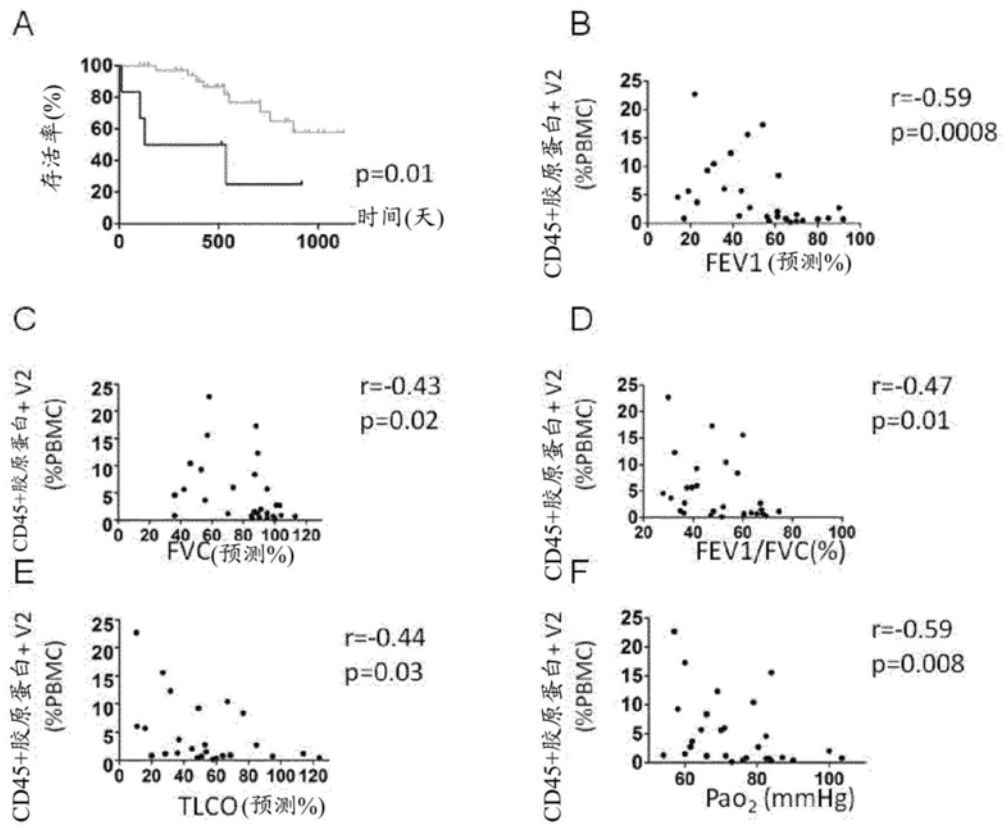


图3

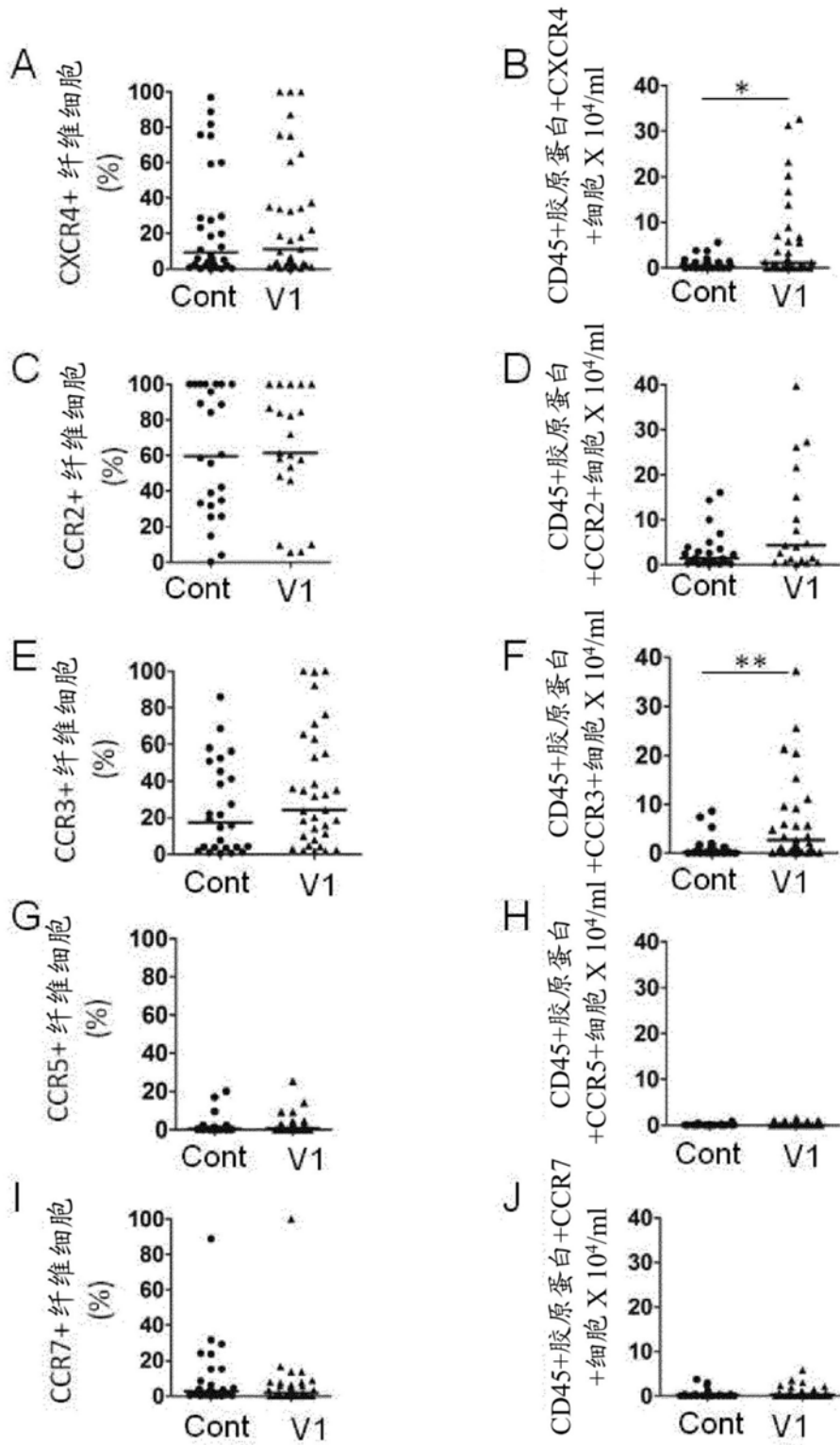


图4

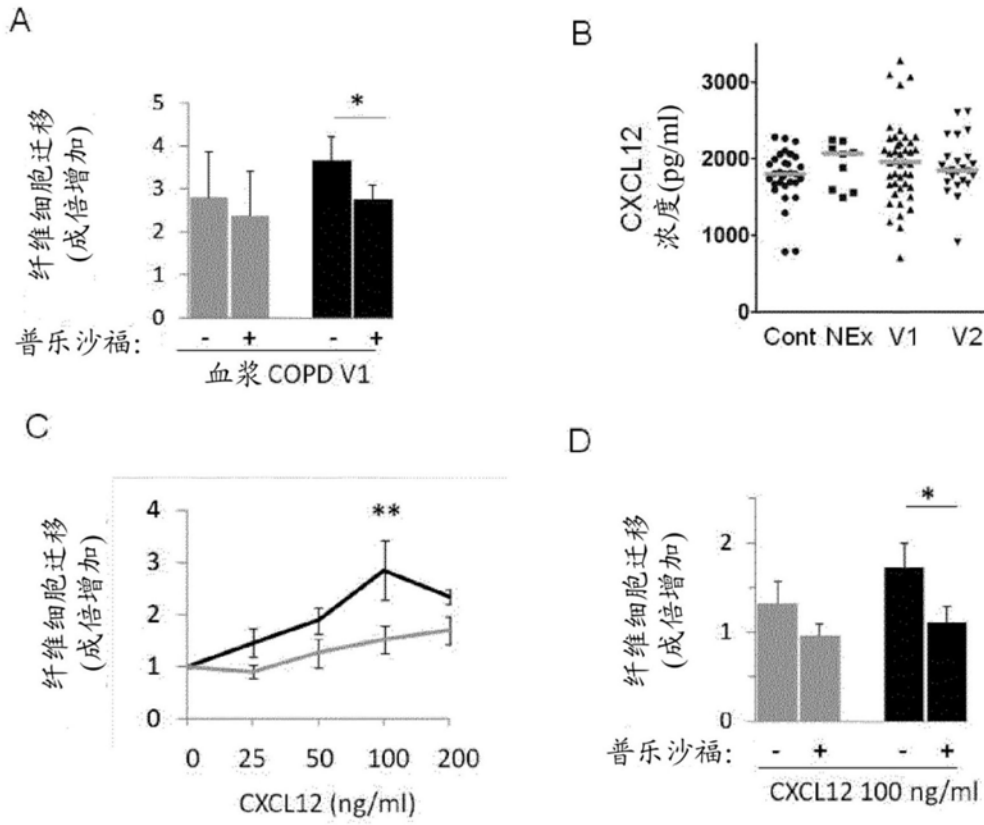


图5

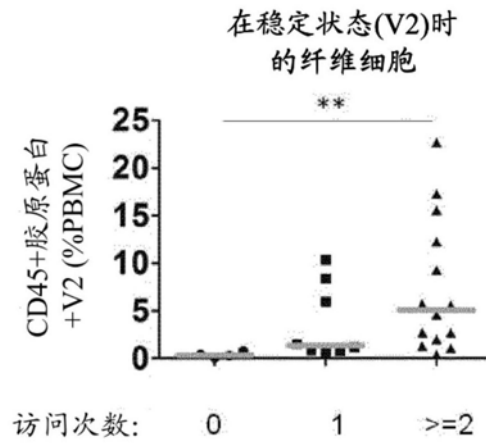


图6

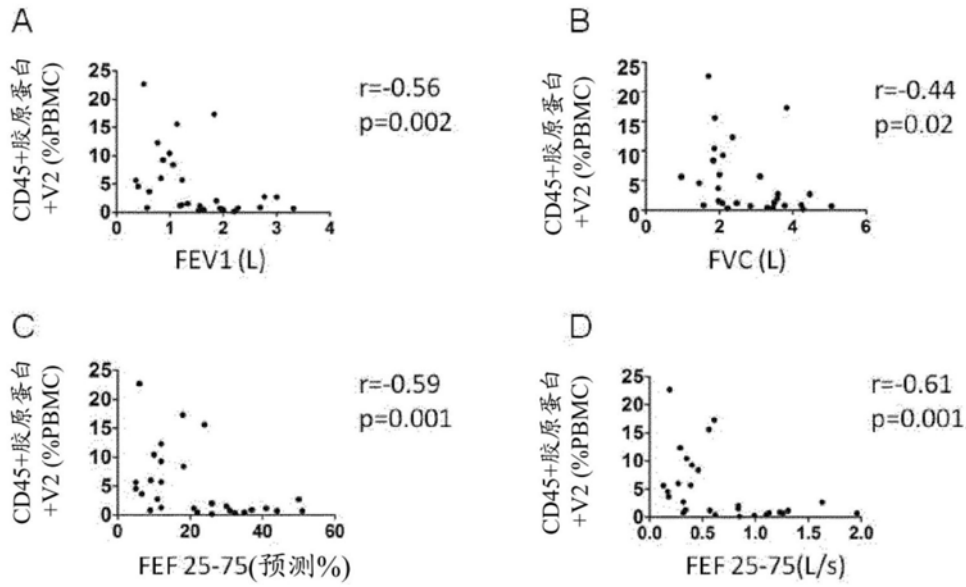


图7

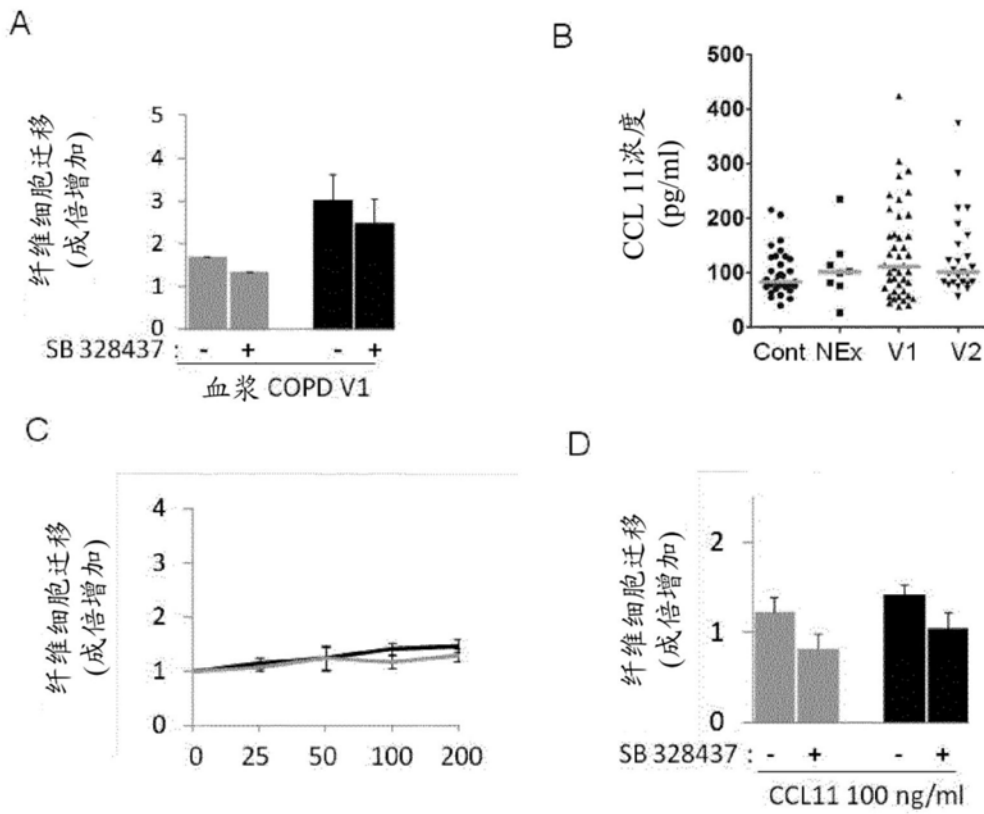


图8

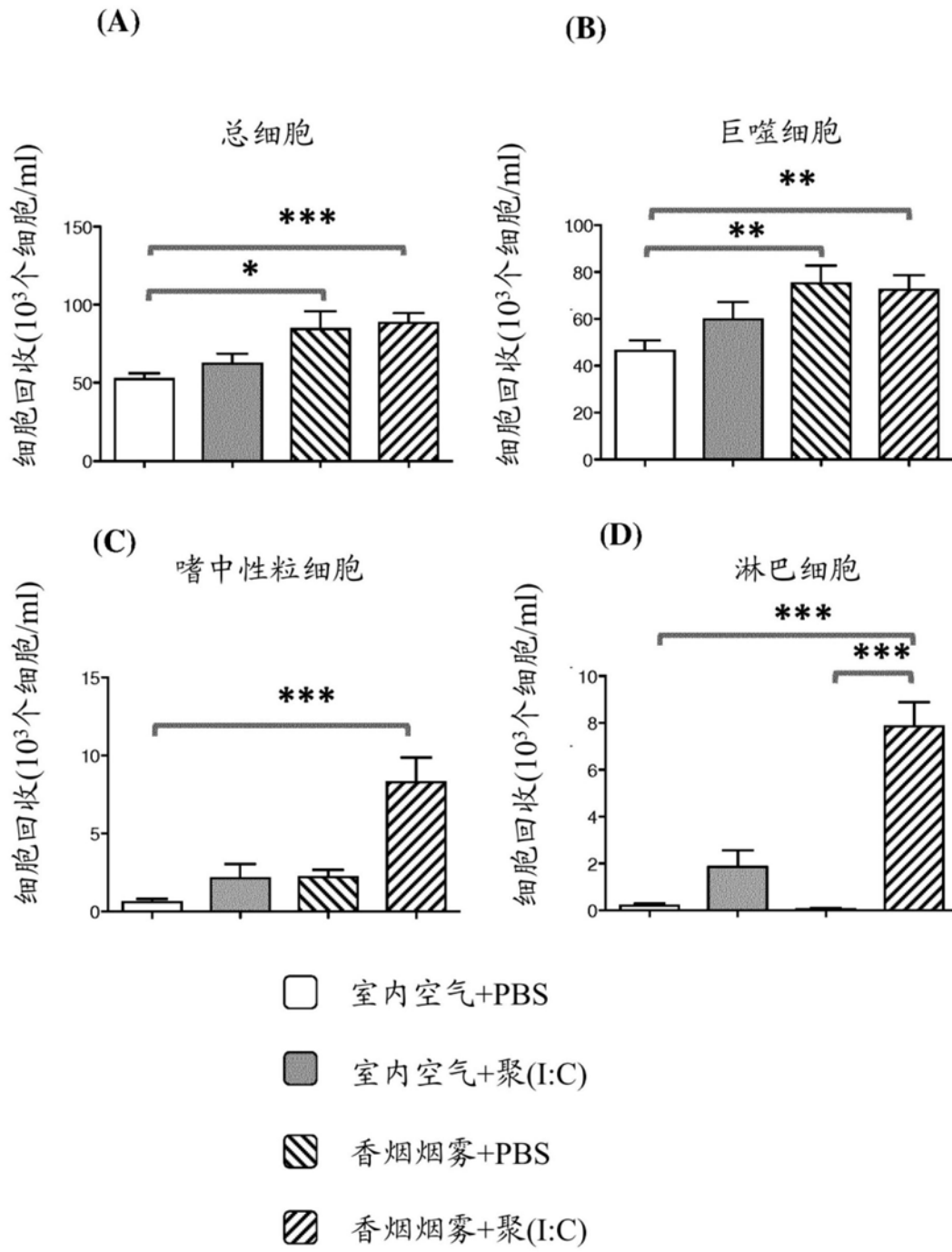


图9

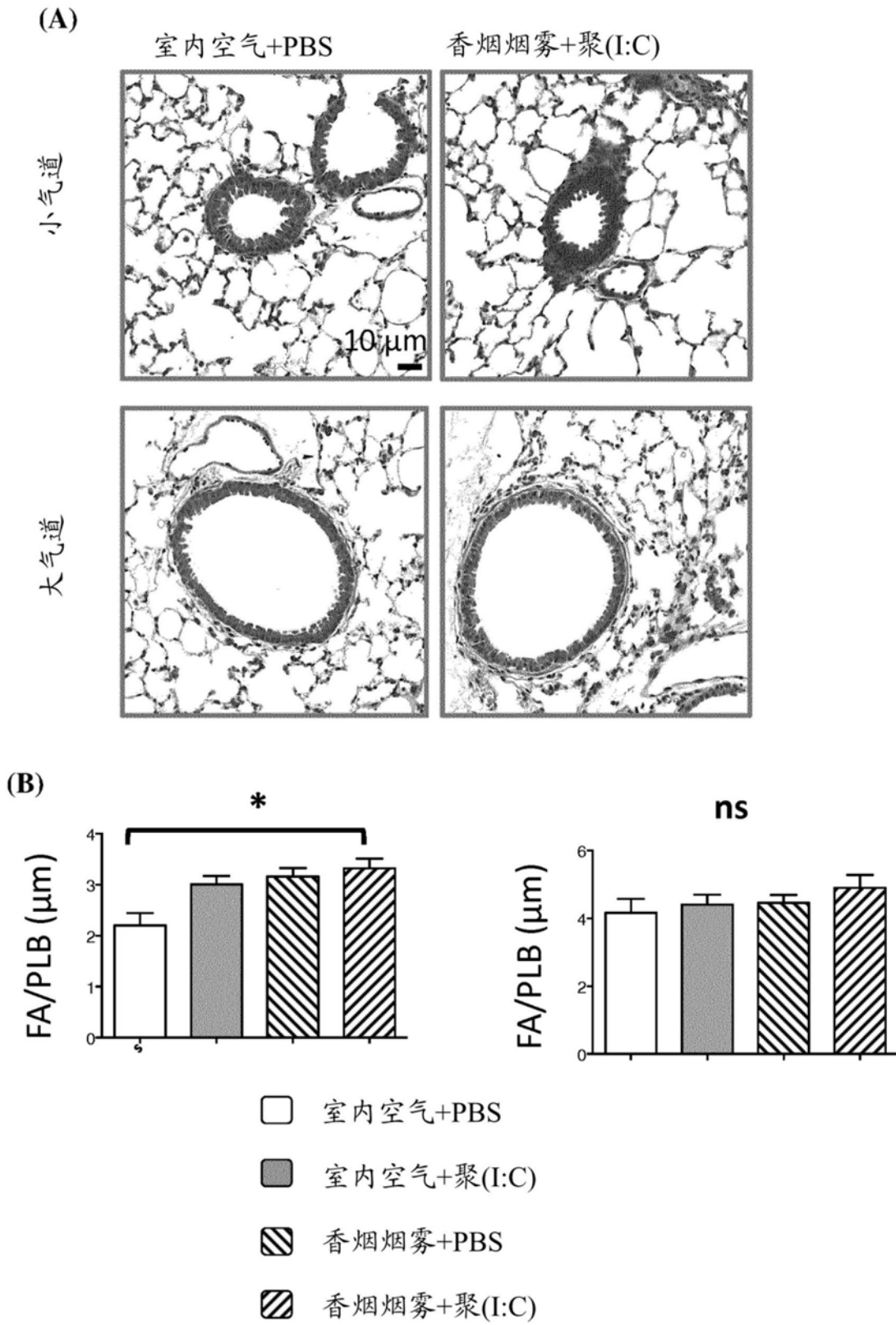


图10

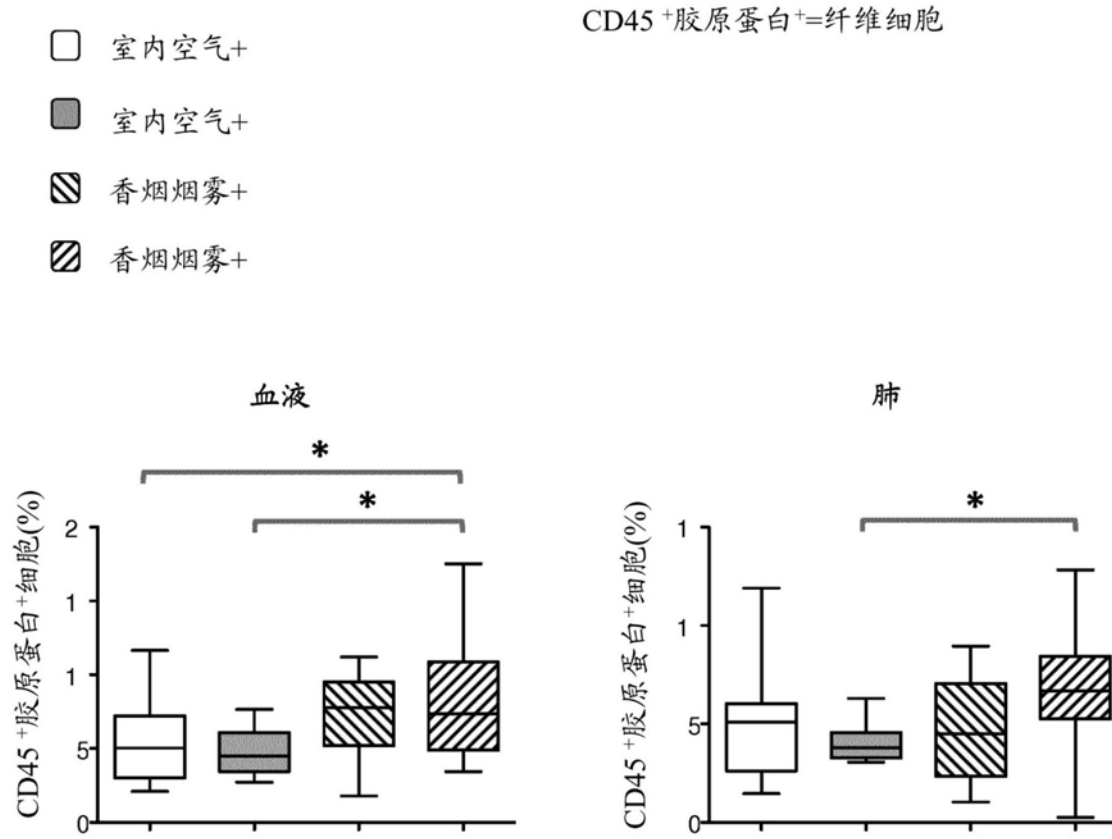


图11

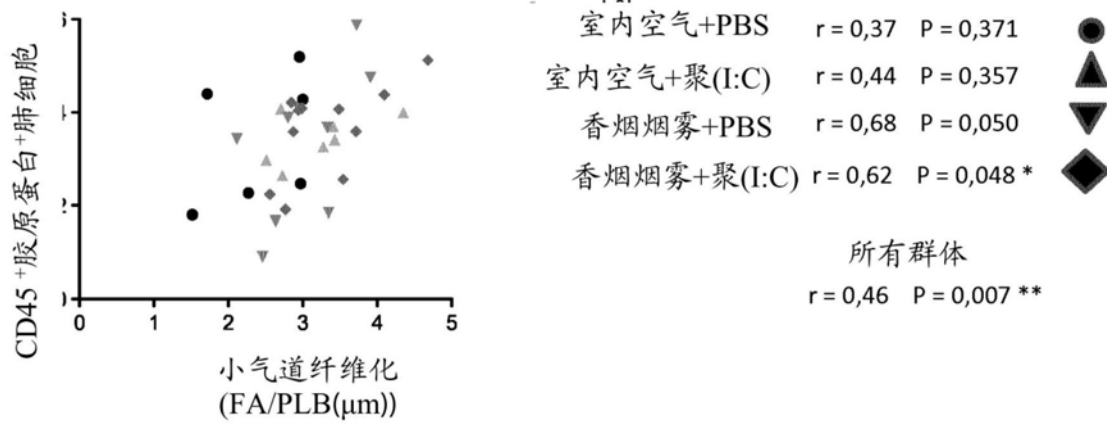


图12