

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090452** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.15

(51) Int. Cl. *A61K 31/138* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.06

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФОН ГИППЕЛЯ-ЛИНДАУ

(31) P201731019

(32) 2017.08.07

(33) ES

(86) PCT/EP2018/071220

(87) WO 2019/030151 2019.02.14

(71) Заявитель:
КОНСЕХО СУПЕРИОР
ДЕ ИНВЕСТИГАСИОНЕС
СЪЕНТИФИКАС; АЛИАНСА
ЭСПАНЬОЛА ДЕ ФАМИЛИАС ДЕ
ВОН ИППЕЛЬ-ЛИНДАУ-ВХЛ (ES)

(72) Изобретатель:

Ботелла Кубеллс Луиза Мария,
Альбиньяна Диас Вирхиния, Виллар
Гомес-Де Лас Эрас Карина (ES)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к применению селективного антагониста β_2 -адренергического рецептора для лечения и профилактики опухоли у пациента с синдромом фон Гиппеля-Линдау. В частности, изобретение относится к применению производного алканоламина или его фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты для лечения и профилактики гемангиобластомы у пациентов с синдромом VHL.

A1

202090452

202090452

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561451EA/061

СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФОН ГИППЕЛЯ-ЛИНДАУ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области терапии и профилактики, точнее к лечению и профилактике болезни фон Гиппеля-Линдау.

Уровень техники изобретения

Болезнь фон Гиппеля-Линдау (VHL) является редким типом рака, частота которого составляет 1 на 36000 индивидуумов в общей популяции. VHL является аутосомно-доминантным наследственным генетическим заболеванием. Болезнь впервые была описана отдельно Гиппелем в 1911 г. и Линдау в 1926 г.

Клинические проявления включают множественные доброкачественные и злокачественные опухоли, которые появляются на протяжении всей жизни пациента: гемангиобластома сетчатки, гемангиобластома ЦНС, светлоклеточный рак почки (CCRCC), феохромоцитомы, опухоль островков Лангерганса, опухоли эндолимфатического мешка и кисты в яичках и широкой связке.

Опухолевые клетки из VHL утратили функцию белка фон Гиппеля-Линдау, что приводит к конститутивной экспрессии индуцируемого гипоксией фактора (HIF) даже в нормоксических условиях.

HIF отвечает за активацию генов, участвующих в ангиогенезе, метаболизме и апоптозе, которые способствуют адаптации и выживанию в условиях низкой концентрации кислорода (гипоксия), которые могут быть обнаружены в ишемических тканях и в большинстве солидных опухолей.

При нормоксии быстрая деградация HIF контролируется связыванием pVHL с гидроксированными остатками HIF- α . В условиях гипоксии pVHL не может гидроксировать субъединицы HIF α , которые затем избегают убиквитин-опосредованного протеолиза, позволяя HIF α накапливаться, транслоцироваться в ядро и связываться с HIF β . Этот гетеродимер способен связывать специфические последовательности ДНК («чувствительные к гипоксии элементы» или HRE) для активации транскрипции более 200 генов-мишеней. Основные гены, регулируемые pVHL, вовлечены в развитие опухоли, ангиогенез (фактор роста эндотелия сосудов [VEGF] и тромбоцитарный фактор роста [PDGF]), пролиферацию или выживание клеток (трансформирующий фактор роста [TGF α]), регуляцию поглощения и метаболизма глюкозы (переносчик глюкозы Glut-1) и эритропоэз (EPO). Другие гены-мишени, относящиеся к биологии опухолей, вовлечены в формирование внеклеточного матрикса (матриксная металлопротеиназа 1 [MMP1]), хемотаксис (стромальный клеточный фактор 1 [SDF1] и его рецептор CXCR-хемокина 4 [CXCR4], рецептор эпидермального фактора роста [EGFR], рецептор фактора роста гепатоцитов [HGFR, кодируемый MET]), регуляцию pH (карбоангидраза IX и XII [CA9 и CA12]) и клеточный цикл (циклин D1 [CCND1]).

До настоящего времени терапевтические возможности для пациентов с VHL были получены из хирургии. Системная терапия, используемая для метастатического рака, показала ограниченный ответ при VHL опухолях поджелудочной железы и почек, тогда как опухоли ЦНС вообще не отвечают.

VHL Spanish Alliance провел клиническое исследование с 7 пациентами с VHL в течение 12 месяцев, с декабря 2014 года по апрель 2016 года. Пациенты получали лечение гемангиобластом сетчатки 120 мг пропранолола в сутки (субоптимальная доза, для многих пациентов менее 2 мг/кг массы тела в сутки). В результате во время клинического испытания опухоли не росли ни в одном случае, а в некоторых случаях повышалась острота зрения. Еще более интересно, что в 2 случаях с экссудатами от гемангиобластом они полностью исчезли между 3 и 6 месяцами лечения. Низкое кровяное давление было зарегистрировано как побочный эффект (Albiñana et al., 2017). Таким образом, отсутствие видов терапии рецидивирующего заболевания означает, что существует настоятельная потребность в эффективных лекарственных средствах с уменьшенными побочными эффектами для пациентов с VHL, особенно тех, которые останавливают прогрессирование опухолей и задерживают хирургическое лечение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ICI 118,551 снижает жизнеспособность клеток гемангиобластомы у пациентов с VHL (фиг.1 и 2) и ингибирует образование гемангиосферы у пациентов с VHL (фиг.3). Кроме того, авторы изобретения показали, что ICI 118,551 ингибирует миграцию клеток и ангиогенез эндотелиальных клеток (фиг.3 и 4) и что ингибирует активность HIF, индуцированную гипоксией.

Таким образом, изобретение относится к селективному антагонисту β_2 -адренергического рецептора для применения в лечении и/или профилактике болезни фон Гиппеля-Линдау.

Подробное описание фигур

Фигура 1. ICI 118,551 и пропранолол снижают жизнеспособность клеток гемангиобластомы у пациентов с VHL. Пропранолол, (P) является неселективным бета-блокатором, связывающим бета 1 и 2 адренергические рецепторы. ICI 118,551 (I), является селективным бета-блокатором, связывающим только рецептор бета 2. Оба бета-блокатора действуют путем снижения жизнеспособности первичных клеточных культур гемангиобластомы до 40%-50% при 100 мкМ в течение 72 часов. На фиг. 1 показано снижение жизнеспособности первичной культуры клеток HB11cib. Результаты являются репрезентативными для 8 первичных культур клеток гемангиобластомы, обработанных таким же образом. Каждое измерение основано на трех повторях и количественно определяется с помощью люминесцентного набора, детектирующего АТФ (Cell titer Glo, from Promega).

Фигура 2. ICI 118,551 действует как пропранолол, снижающий жизнеспособность клеток гемангиобластомы из VHL. А. Первичная культура клеток гемангиобластомы (образец пациента HB18), без (контроль) и через 4 дня лечения с ICI 118,551 при 50 и 100

мкМ. После обработки ICI 118,551 100 мкМ мы можем видеть пустые места на планшете по сравнению с контролем, который сливается через 4 дня культивирования, начиная с того же количества клеток. В. Сравнение 4-дневной обработки пропранололом (P) и ICI 118,551 (I) в той же концентрации 100 мкМ первичной культуры клеток гемангиобластомы (образец пациента HB4).

Фигура 3. Обработка ICI 118,551 вызывает апоптоз клеток путем стимуляции проапоптотических генов Вах и каспазы 9. А. Относительные уровни экспрессии мРНК ВАХ и CASP9 (гены, участвующие в апоптозе), обнаруженные с помощью RT-qPCR в культуре клеток гемангиобластомы HB26, через 72 часа 100 мкМ ICI 118,551 (I100). В. Относительные уровни экспрессии мРНК Вах и Casp9 (гены, участвующие в апоптозе), обнаруженные с помощью RT-qPCR в культуре клеток гемангиобластомы HB11, через 72 ч 100 мкМ ICI 118,551. Оба гена, Вах и Casp 9 увеличиваются после обработки ICI 118,551, поэтому ICI 118,551 индуцирует апоптоз в этих клетках.

Фигура 4. Пропранолол и ICI 118,551 являются противоопухолевыми средствами, ингибирующими образование гемангиосферы из клеток пациентов с VHL. А. Круглые сфероподобные структуры с четко выраженной границей появляются в виде агрегатов из опухолей клеток VHL. Две разные гемангиобластомы использовали для этих экспериментов HB2 и HB3. Однако, когда клетки культивировали в течение 7 дней в присутствии 100 мкМ пропранолола (P) или ICI 118,551 (I), сферы выглядят дезагрегированными, и наблюдаемые группы являются нерегулярными с небольшим количеством клеток. Фотографии были сделаны в последний день обработки В. То же, что на панели А, но с двумя другими гемангиобластомами от пациентов с VHL. С. То же, что на панелях А и В, но с HB23 от пациента с VHL.

Фигура 5. ICI 118,551 и пропранолол ингибируют миграцию клеток эндотелиальных клеток. А. Функциональные тесты *in vitro* на ангиогенез включают «заживление ран» или царапину на пластине, чтобы проследить способность эндотелиальных клеток к миграции через короткое время. Когда конфлюентный монослой разрушается кончиком микропипетки для создания разрыва, эндотелиальные клетки обычно мигрируют, чтобы покрыть разрыв «заживление раны» в течение короткого времени, в зависимости от размера «раны», но обычно менее 8 часов. Этот тест измеряет миграцию, делая снимки в разное время с момента создания раны. Показывается только финальная картинка через 6 часов. Расстояние миграции определяют количественно, и на следующем графике показана эволюция. ICI 118,551 и пропранолол задерживают миграцию клеток, следовательно, они являются антиангиогенными. В. Расстояние миграции необработанными и обработанными пропранололом/ICI 118,551 клеток через 6 часов нанесения царапины на конфлюентном слое HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека).

Фигура 6. ICI 118,551 и пропранолол ингибируют клеточный ангиогенез эндотелиальных клеток. Тубулогенез является еще одним тестом *in vitro* для ангиогенеза. Эндотелиальные клетки, культивируемые на матриксе, обладают свойством построения

клеточных трубчатых структур, которые имитируют структуру «сосудов». **А.** Пропранолол и ICI 118,551 при 100 мкМ значительно ингибируют тубулогенез. **В.** Количество закрытых клеток (плотность сети) определяют количественно и усредняют по 5 различным полям в каждом случае. Гистограммы представляют среднее значение $\pm$ SD.

Фигура 7. Пропранолол и ICI 118,551 ингибируют HIF-опосредованную стимуляцию. Гистограммы показывают относительную активность люциферазы в зависимости от HIF-1 (гипоксия) в стабильных трансфектантах клеток HeLa для репортерного HRE9x-luc, который включает 9 tandemных повторений элемента чувствительной к гипоксии последовательности, связанного с HIF-1, слитого с репортерным белком люциферазы. St обозначает контрольные клетки (нормоксия и гипоксия). Деферроксамин (DFO) при 100 мкМ вызывает химическую гипоксию в обработанных клетках. Обработка пропранололом или ICI 118,551 при 50 или 100 мкМ (P50, P100, I50, I100, соответственно, в течение 24 часов) ингибирует стимуляцию гипоксии, вызванную DFO. Примечательно, что эффект ICI 118,551 явно превосходит пропранолол в равной дозе. Как DFO, так и лекарственная терапия вводились одновременно.

Фигура 8. Пропранолол и ICI 118.551 значительно снижают HIF-зависимую транскрипцию в клетках HeLa, но не атенолол. Анализы люциферазы проводили в HRE-luc-стабильно трансфицированных клетках HeLa в условиях гипоксии и обработки пропранололом, атенололом и ICI118.551. Пропранолол и ICI (100 мкМ) предотвращали стимуляцию гипоксии в клетках HeLa, о чем свидетельствует снижение активности люциферазы, путем ингибирования активации элементов гипоксии (HRE) с помощью HIF. Результаты атенолола были менее значимыми, чем другие (пропранолол и ICI).

Фигура 9. ICI-118551 показывает противоопухолевую специфическую активность в VHL-/- клетках. Жизнеспособность (содержание АТФ) нескольких клеток (первично культивируемых и линий), подвергшихся воздействию различных концентраций мМ ICI-118551 или пропранолола, в течение 72 часов. Контрольные лунки не содержали ICI-118551 или пропранолола. ICI-118551 (специфический антагонист бета-адренергических рецепторов типа 2) и пропранолол (неспецифический антагонист бета-адренергических рецепторов типа 1 и 2) снижают в зависимости от дозы и с более высокой специфичностью жизнеспособность VHL-/- клеток. Содержание АТФ измеряли с использованием анализа CellTiter-Glo® от Promega. А: Клеточная линия HUVEC, В: Клеточная линия HMEC, С: Первичная культура гемангиобластомы 18, D: Первичная культура гемангиобластомы 14, E: ccRCC Vhl -/- 786-О клеточная линия. Показанные данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=3).

Фигура 10. Ксенотрансплантаты человеческих клеток ccRCC 786-О Vhl -/- у мышей. Самцам 7-8 недельных мышей NOD scid gamma (NSG) инъектировали в заднюю область суспензию отдельных клеток из 10^6 786-О клеток. Когда размер опухоли достигал объема 100 мм³, мышей случайным образом разделяли на 3 группы по 9/10 мышей в каждой. Две группы ежедневно получали внутривенно 10 мг/кг массы тела

пропранолол или ICI-118,551, соответственно, и третьей группе вводили растворитель. Размер опухоли измеряли штангенциркулем каждые 2-3 дня, и объемы рассчитывали по формуле: $\text{наименьший}^2 \times \text{наибольший} \times 0,52$. Мышей умерщвляли, когда средний объем опухоли контрольной группы достигал конечной точки, установленной на основе этических процедур. Стрелка отмечает начало лечения.

Фигура 11. ICI 118.551 по-разному влияет на Vhl-/- клетки и нормальные эндотелиальные клетки HUVEC и HMEC. Первичную культуру гемангиобластомы из VHL, нормальных первичных эндотелиальных HUVEC и неопухолевой линии микроэндотелиальных клеток HMEC-1 культивировали в отсутствие или в присутствии различных концентраций ICI 118.551 (50-250 мкМ) для измерения жизнеспособности. В соответствии с кривыми жизнеспособности клетки гемангиобластомы (НВ) показывают только 20% жизнеспособности при 100 мкМ, в то время как неопухолевые клетки HUVEC или HMEC-1 показывают 80% и 55%, соответственно, снижение жизнеспособности при 100 мкМ в обеих культурах,

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к селективному антагонисту β_2 -адренергического рецептора для применения при лечении и/или профилактике болезни фон Гиппеля-Линдау.

Альтернативно, изобретение относится к применению селективного антагониста β_2 -адренергического рецептора при производстве лекарственного средства для лечения и/или профилактики болезни фон Гиппеля-Линдау.

Альтернативно, изобретение относится к способу лечения и/или профилактики болезни фон Гиппеля-Линдау, включающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества селективного антагониста β_2 -адренергического рецептора.

Термин « β_2 -адренергический рецептор» или « $\beta_2\text{AR}$ », используемый в настоящем описании, относится к классу А рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), который реагирует на диффундирующие гормоны и нейротрансмиттеры и находится преимущественно в гладких мышцах. Существует две основные группы адренергических рецепторов, α и β , с несколькими подтипами:

- α -рецепторы имеют подтипы α_1 (G_q -сопряженный рецептор) и α_2 (G_i -сопряженный рецептор).

- β рецепторы имеют подтипы β_1 , β_2 и β_3 . Все три связаны с G_s белками, которые, в свою очередь, связаны с аденилатциклазой. Связывание агониста с этими рецепторами вызывает повышение внутриклеточной концентрации вторичного мессенджера цАМФ.

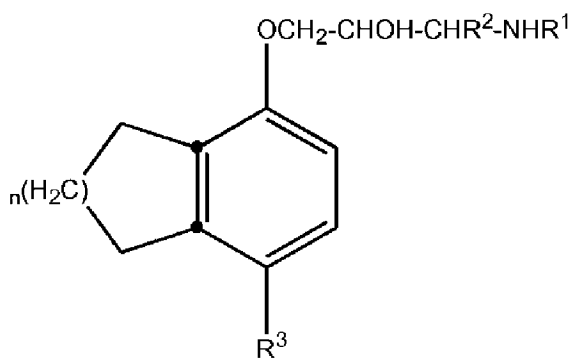
Связывание агониста с β_2 -адренергическим рецептором приводит к расслаблению гладких мышц.

Термин «антагонист β_2 -адренергического рецептора», используемый в настоящем описании, относится к соединению, которое связывает β_2 -адренергический рецептор и не обладает какой-либо существенной способностью активировать сам рецептор. Термин

«антагонист β_2 -адренергического рецептора» включает как нейтральные антагонисты, так и обратные агонисты. «Нейтральный антагонист» представляет собой соединение, которое блокирует действие агониста, но не влияет на внутреннюю или спонтанную рецепторную активность. «Обратный агонист» способен блокировать действие агониста на рецептор и ослаблять конститутивную активность рецептора. Термин «антагонист» также включает конкурентные антагонисты, которые представляют собой лекарственные средства, которые связываются с тем же участком, что и природный лиганд; неконкурентные антагонисты, которые связываются с другим участком на рецепторе, чем природный лиганд; обратимые антагонисты, которые связывают и развязывают рецептор со скоростями, определяемыми кинетикой рецептор-лиганд; и необратимые антагонисты, которые постоянно связываются с рецептором либо путем образования ковалентной связи с активным сайтом, либо просто путем настолько сильного связывания, что скорость диссоциации фактически равна нулю.

Термин «селективный «антагонист β_2 -адренергического рецептора», используемый в настоящем описании, означает антагонист, который является селективным в отношении β_2 -адренергических рецепторов по сравнению с β_1 -адренергическими рецепторами. В конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергических рецепторов проявляет по меньшей мере в 10 раз большую активность связывания с β_2 -, чем с β_1 -адренергическими рецепторами, то есть имеет коэффициент селективности β_2/β_1 по меньшей мере 10. Более предпочтительно, селективный антагонист β_2 -рецептора будет иметь коэффициент селективности β_2/β_1 , по меньшей мере 50. Сродство различных активных средств к β_2 - и β_1 -адренергическим рецепторам можно определить, путем оценки тканей, содержащих большинство β_2 -рецепторов (например, цилиарный отросток кролика, печень крысы, хориоидное сплетение кошек или легкое), тканей, содержащих большинство β_1 -рецепторов (например, сердце кошки и морской свинки) и тканей, содержащих смесь (например, трахея морской свинки). Способы определения относительной селективности связывания для этих различных типов тканей широко раскрыты в O'Donnell and Wanstall, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, 308, 183-190 (1979), Nathanson, *Science*, 204, 843-844 (1979), Nathanson, *Life Sciences*, 26, 1793-1799 (1980), Minneman et al., *Mol.Pharmacol.*, 15, 21-33 (1979a), and Minneman et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 211, 502-508 (1979).

Известно значительное количество соединений, обладающих селективной активностью β_2 -адренергического антагониста, подходящих для применения в настоящем изобретении. В конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора представляет собой производное алканоламина формулы I



формула I

где R^1 представляет собой алкильную группу с числом атомов углерода до 6, которая разветвляется на α -атоме углерода,

где R^2 представляет собой алкил с числом атомов углерода до 3,

где R^3 представляет собой водород, галоген или алкил с числом атомов углерода до трех и

где n равно 1 или 2,

или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

Термин «алкильная группа», используемый в настоящем описании, относится к ациклическим прямым и разветвленным группам, полученным из алканов, и имеющим формулу $--C_nH_{2n+1}$ путем удаления атома водорода.

Термин «галоген», используемый в настоящем описании, относится к атому, выбранному из фтора, хлора, брома и йода.

R^1 может быть, например, изопропилом или трет-бутилом. В конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил.

R^2 может быть, например, метилом или этилом. В конкретном варианте осуществления R^2 представляет собой метил.

R^3 может быть, например, водородом, хлором, бромом, метилом или этилом. В конкретном варианте осуществления R^3 представляет собой метил.

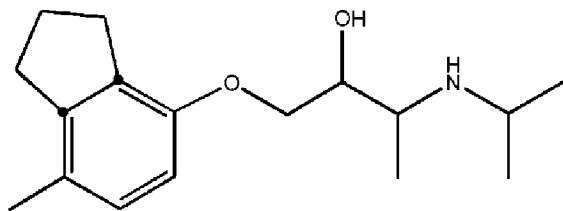
В конкретном варианте осуществления n равно 1.

В конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил и R^2 представляет собой метил. В конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил и R^3 представляет собой метил. В конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил и n равно 1. В конкретном варианте осуществления R^2 представляет собой метил и R^3 представляет собой метил. В конкретном варианте осуществления R^2 представляет собой метил и n равно 1. В конкретном варианте осуществления R^3 представляет собой метил и n равно 1.

В конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил и R^2 и R^3 представляют собой метил. В другом конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил, R^2 представляет собой метил и n равно 1. В другом конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил, R^3 представляет собой метил и n равно 1. В конкретном варианте осуществления R^2 и R^3 представляют собой метил и n равно 1.

В более конкретном варианте осуществления R^1 представляет собой изопропил, R^2 и/или R^3 представляют собой метил и n равно 1.

В еще более конкретном варианте осуществления производное алканоламина имеет формулу II:



формула II

Это соединение формулы II также известно как ICI 118,551 и имеет химическое название эритро-D, L-1(метилинден-4-илокси)-3-изопропиламинобутан-2-ол. ICI 118,551 имеет коэффициент селективности β_2/β_1 по меньшей мере 50, как определено и описано в Life Sciences, 27,671 (1980) and Bilsky et al., J.Cardiovasc.Pharmacol., 5, 430-437 (1983).

Следует отметить, что производное алканоламина формулы I имеет два асимметрических атома углерода, а именно, группы $-CHON-$ и $-CHR_2-$, и что поэтому оно может существовать в двух рацемических диастереоизомерных формах, в форме *трео* и *эритро*, и четыре оптически активные формы, которые являются (+) и (-) изомерами каждой из рацемических форм. Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает любую из этих изомерных форм, которые обладают селективной антагонистической активностью в отношении β_2 -адренергического рецептора, как определено выше, поскольку общеизвестно, как может быть выделен любой конкретный изомер и как может быть измерена любая селективная блокирующая активность β_2 -адренергического рецептора, которой он может обладать.

Следует понимать, что в общем случае оптический изомер, который имеет (S)-абсолютную конфигурацию группы $-CHON$, более активен в качестве β_2 -адренергического блокирующего средства, чем соответствующий изомер, который имеет (R)-абсолютную конфигурацию. Также известно, что в целом эритро-изомер является более β_2 -селективным, чем соответствующий *трео*-изомер, но что как *трео*-, так и *эритро*-изомеры соединений по настоящему изобретению обладают требуемой селективностью.

Термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» относится к любой соли присоединения кислоты, которая при введении реципиенту способна обеспечить (прямо или косвенно) соединение, как описано в настоящем документе. Предпочтительно, как используется в настоящем изобретении, термин «фармацевтически приемлемая соль» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или внесенный в список фармакопеи США или другой общепризнанной фармакопеи для применения на животных и, в частности, на людях. Получение солей можно осуществлять методами, известными в данной области техники. Иллюстративными неограничивающими примерами фармацевтически

приемлемой кислотнo-аддитивной соли производного алканoламина формулы I является, например, соль, полученная из неорганической кислоты, например, гидрохлорид, гидробромид, фосфат или сульфат, или соль, полученная из органической кислоты, например, оксалат, лактат, тартрат, ацетат, салицилат, цитрат, бензоат, β -нафтоат, адипат или 1,1-метилен-бис(2-гидрокси-3-нафтоат), или соль, полученная из кислой синтетической смолы, например, сульфированная полистирольная смола. В конкретном варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты представляет собой гидрохлорид. В более конкретном варианте осуществления селективный антагонист антагониста β_2 -адренергического рецептора представляет собой гидрохлоридную соль соединения формулы II.

В другом конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора выбран из перечня, включающего следующие соединения:

- Бутоксамин

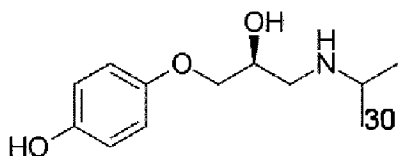
Химическое название для бутоксамина представляет собой DL-эритро- α -(2,5-диметоксифенил)- β -трет-бутиламинопропанол гидрохлорид. Определение бета₂-селективности бутоксамина описано в O'Donnell and Wanstall, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 308, 183-190 (1979), в котором описано, что коэффициент селективности β_2/β_1 составляет по меньшей мере 17.

- H35/25

Химическое название для H35/25 представляет 1-(4'-метилфенил)-b 2,2-1-изопропиламинопропанол.

- Преналтерол

Преналтерол представляет собой соединение формулы



Селективная антагонистическая активность β_2 -адренергического рецептора описана Johansson and Waldeck, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 32(9), 659-660.

- Различные 4- и 5-[2-гидрокси-3-(изопропиламино)пропокси]бензимидазолы, как описано Crooks et al, J. Med. Chem., 22(2), 210-214 (1979).

- 1-(трет-бутиламино-3-ол-2-пропил)оксимино-9 флуорен, как описано Imbs et al, Br. J. Pharmacol. 60(3), 357-362 (1977).

- Различные 2-(альфа-гидроксиарилметил)-3,3-диметилазиридины, как описано Jain et al, J. Med. Chem., 21(1), 68-72 (1978).

Термин «лечение», как используется в настоящем документе, относится к любому процессу, действию, применению, терапии или тому подобному, где субъекту (или пациенту), включая человека, оказывается медицинская помощь с целью улучшения состояния субъекта, прямо или косвенно, или замедления прогрессирования состояния или расстройства у субъекта, или облегчения по меньшей мере одного симптома

заболевания или расстройства, подвергаемого лечению.

Термин «профилактика», как используется в настоящем документе, относится к введению соединения по изобретению на начальной или ранней стадии заболевания или также для предотвращения его возникновения.

Термин «болезнь фон Гиппеля-Линдау» или «болезнь VHL», или «заболевание фон Гиппеля-Линдау», или «заболевание VHL», или «синдром VHL», или «синдром фон Гиппеля-Линдау» при использовании в настоящем документе относится к редкому заболеванию, вызванному мутацией в опухолевом супрессоре Von Hippel-Lindau (VHL), приводящей к отсутствию белка VHL или к aberrантному нефункциональному белку VHL. У людей с болезнью фон Гиппеля-Линдау было выявлено более 370 наследственных мутаций в гене VHL (<http://www.umd.be/VHL/>). Мутации гена VHL, связанные с этим состоянием, либо предотвращают продуцирование какого-либо белка VHL, либо приводят к выработке аномальной версии белка. Болезнь VHL характеризуется образованием множественных доброкачественных и злокачественных опухолей и заполненных жидкостью мешочков (кист) во многих различных частях тела, включая: гемангиобластому сетчатки, гемангиобластому ЦНС, светлоклеточный рак почки (CCRCC), феохромоцитому, опухоль островков Лангерганса, опухоли эндолимфатического мешка и кисты в яичках и широкой связке.

Термин «пациент» или «субъект», как используется в настоящем описании, относится к любому животному, предпочтительно млекопитающему, и включает, но не ограничивается ими, домашних и сельскохозяйственных животных, приматов и человека, например, человека, приматов, кроме человека, коров, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек или грызунов. В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой человека любого возраста или расы. В настоящем изобретении пациент страдает от болезни фон Гиппеля-Линдау.

Термин «пациент с болезнью фон Гиппеля-Линдау», используемый в настоящем документе, означает, что у пациента диагностирована болезнь VHL. Болезнь VHL может быть диагностирована согласно следующим диагностическим критериям (Frantzen et al, Von Hippel-Lindau Syndrome, GeneReviews®):

- У индивидуума, не имеющего семейного анамнеза болезни VHL, болезнь VHL диагностируется, если у пациента имеются два или более характерных поражения:

Две или более гемангиобластомы сетчатки, позвоночника или мозга или одна гемангиобластома в сочетании с висцеральным проявлением (например, множественные кисты почки или поджелудочной железы).

Почечно-клеточная карцинома.

Феохромоцитомы надпочечников и внемочечниковые феохромоцитомы.

Реже, опухоли эндолимфатического мешка, сосочковая цистаденома придатка яичка или широкой связки или нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы.

У индивидуума с положительным анамнезом болезни VHL, болезнь VHL диагностируется при наличии одного или нескольких из следующих проявлений

заболевания:

Ангиома сетчатки

Спинальная или мозжечковая гемангиобластома

Феохромоцитомы надпочечников и внематочечниковые феохромоцитомы

Почечно-клеточная карцинома

Множественные кисты почек и поджелудочной железы

В любом случае, когда гетерозиготный герминальный VHL патогенный вариант идентифицируется с помощью молекулярного тестирования.

В конкретном варианте осуществления заболевание VHL возникает с появлением одной или нескольких опухолей.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к селективному антагонисту β_2 -адренергического рецептора для применения при лечении и/или профилактике опухоли у пациента с болезнью фон Гиппеля-Линдау.

Термин «опухоль» или «рак», как используется в настоящем документе, относится к широкой группе заболеваний, включающих нерегулируемый рост клеток и которые также называют злокачественными новообразованиями. Термин обычно применяется к заболеванию, характеризующемуся неконтролируемым делением клеток (или увеличением выживаемости или устойчивости к апоптозу) и способностью указанных клеток проникать в другие соседние ткани (инвазия) и распространяться в другие области тела, где клетки обычно не локализуются (метастазирование) через лимфатические и кровеносные сосуды, циркулировать через кровоток, а затем проникать в нормальные ткани в других частях тела. В конкретном варианте осуществления рак проявляется как доброкачественная опухоль, то есть опухоли, которые не могут распространяться в результате инвазии или метастазирования, то есть они растут только локально. В другом конкретном варианте осуществления рак проявляется как злокачественная опухоль, то есть опухоль, которая способна распространяться путем инвазии и метастазирования.

Иллюстративными неограничивающими примерами опухолей являются гемангиобластома, феохромоцитома, опухоль эндолимфатического мешка, лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярная рабдомиосаркома, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак ануса, анального канала или аноректума, рак глаза, рак внутрипеченочного желчного протока, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак вульвы, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный рак, рак шейки матки, глиома, лимфома Ходжкина, рак гипоталамуса, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого, злокачественная мезотелиома, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, рак яичника, кисту в широкой связке, рак брюшной полости, сальника и брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, включая почечно-клеточный рак, рак кожи, рак мягких тканей, рак яичка, кисты яичек, рак щитовидной железы, рак мочеочника, рак мочевого пузыря и рак желудочно-кишечного тракта, такой как, например, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта,

рак поджелудочной железы, включая опухоль островков Лангерганса, рак желудка, рак тонкой кишки, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, рак полости рта, колоректальный рак и гепатобилиарный рак.

В конкретном варианте осуществления опухоль не является опухолью поджелудочной железы. Термин «опухоль поджелудочной железы», используемый в настоящем документе, включает как экзокринные, так и эндокринные опухоли. Экзокринные опухоли поджелудочной железы включают аденокарциному, ацинарно-клеточный рак, внутритротоковую папиллярно-муцинозную опухоль (IPMN), муцинозную цистаденокарциному, среди прочих. Эндокринные опухоли в поджелудочной железе, также называемые «опухолями островковых клеток», включают гастриному (синдром Золлингера-Эллисона), глюкагому, инсулиному, соматостатиному, ВИПому (синдром Вернера-Моррисона), атрофированную опухоль островков поджелудочной железы и множественную эндокринную неоплазию типа-1 (MEN1) среди других. В более конкретном варианте осуществления опухоль не является экзокринной опухолью поджелудочной железы. В еще более конкретном варианте осуществления опухоль не является аденокарциномой поджелудочной железы.

В другом конкретном варианте осуществления опухоль выбрана из гемангиобластомы, светлоклеточного рака почки (CCRCC), феохромоцитомы, опухоли островков Лангерганса, опухоли эндолимфатического мешка и кист в яичках и широкой связке.

Термин «гемангиобластома», используемый в настоящем документе, относится к доброкачественной высокососудистой опухоли, которая может возникать в центральной нервной системе (головной или спинной мозг) и в сетчатке. В более конкретном варианте осуществления опухоль представляет собой гемангиобластому. В еще более конкретном варианте осуществления опухоль представляет собой гемангиобластому сетчатки или гемангиобластому центральной нервной системы.

Термин «светлоклеточный рак почки» или «ccRCC», используемый в настоящем документе, относится к почечной кортикальной опухоли, обычно характеризующейся злокачественными эпителиальными клетками с прозрачной цитоплазмой и компактно-альвеолярным или ацинарным характером роста с венозной сосудистой сетью.

Термин «феохромоцитома» или «PCC», используемый в настоящем документе, относится к нейроэндокринной опухоли мозгового вещества надпочечников или внепочечной хромаффинной ткани, сформированной в эволюенте после рождения, которая выделяет большое количество катехоламинов, в основном норадреналин и, в меньшей степени, адреналин.

Термин «опухоль эндолимфатического мешка», используемый в настоящем документе, относится к папиллярному эпителиальному новообразованию, возникающему в эндолимфатическом мешке или эндолимфатическом протоке.

Термин «киста», используемый в настоящем документе, относится к кластеру клеток, сгруппированных вместе с образованием мешка. Отличительной особенностью

кисты является то, что клетки, образующие «оболочку» такого мешка, являются явно ненормальными (как по внешнему виду, так и по поведению) по сравнению со всеми окружающими клетками для данного местоположения. Он может содержать воздух, жидкости или полутвердое вещество. В конкретном варианте осуществления кисты поражают яички или широкую связку.

Для его введения пациенту селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты, будет сформулирован в фармацевтической композиции.

Термин «фармацевтическая композиция», используемый в настоящем документе, относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество селективного антагониста β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно алканоламина формулы формулы II, или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты и, по меньшей мере, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Термин «терапевтически эффективное количество», используемый в настоящем документе, относится к количеству соединения, достаточному для обеспечения желаемого эффекта, и, как правило, будет определяться, среди прочих причин, характеристиками самого соединения и достигаемым терапевтическим эффектом. Это также будет зависеть от субъекта, подлежащего лечению, тяжести заболевания, от которого страдает указанный субъект, выбранной лекарственной формы, способа введения и т.п. По этой причине дозы, упомянутые в настоящем изобретении, должны рассматриваться только как руководство для специалиста в данной области, который должен корректировать дозы в зависимости от вышеупомянутых переменных.

Даже если индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов для терапевтически эффективных количеств соединений для применения в соответствии с изобретением относится к общему опыту этих специалистов в данной области. В общем случае, дозировка, необходимая для обеспечения эффективного лечения, которая может регулироваться одним специалистом в данной области, будет варьироваться в зависимости от возраста, состояния здоровья, физической формы, пола, питания, массы, степени алтерации рецептора, частоты лечения, характера и состояния повреждения, характера и степени нарушения или заболевания, состояние здоровья субъекта, способа введения, фармакологических критериев, таких как активность, эффективность, фармакокинетического и токсикологического профиля конкретного используемого соединения, если используется системная доставка лекарств, и если соединение вводится как часть комбинации лекарств. Количество соединения для применения в соответствии с изобретением, которое является терапевтически эффективным для профилактики и/или лечения ишемии/реперфузионного повреждения у

субъекта, может быть определено обычными клиническими методами (см., например, The Physician's Desk Reference, Medical Economics Company, Inc., Oradell, NJ, 1995, and Drug Facts and Comparisons, Inc., St. Louis, MO, 1993).

В конкретном варианте осуществления терапевтически эффективное количество вызывает уменьшение одного или нескольких симптомов заболевания VHL. В конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе от примерно 0,2 мг/кг/день до примерно 5 мг/кг/день, предпочтительно от примерно 0,5 мг/кг/день, примерно 0,7 мг/кг/день, примерно 1 мг/кг/день, примерно 1,5 мг/кг/день, примерно 1,7 мг/кг/день, примерно 1,9 мг/кг/день, примерно 2,1 мг/кг/день, примерно 2,2 мг/кг/день, примерно 2,5 мг/кг/день, примерно 2,7 мг/кг/день, примерно 2,9 мг/кг/день, примерно 3,1 мг/кг/день, примерно 3,3 мг/кг/день, до примерно 4,9 мг/кг/день, примерно 4,8 мг/кг/день, примерно 4,7 мг/кг/день, примерно 4,6 мг/кг/день, примерно 4,5 мг/кг/день. В более конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе от 3,3 мг/кг массы тела/день до 4,5 мг/кг массы тела/день. В другом более конкретном варианте осуществления, селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе от 0,5 мг/кг массы тела/день до 1 мг/кг массы тела/день. В еще более конкретном варианте осуществления, селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе 0,81 мг/кг массы тела/день.

Дозы соединений по изобретению могут быть выражены либо в мг антагониста на кг массы тела, либо в мг антагониста на квадратный метр поверхности тела. Опытный специалист знает, как определить дозу для конкретного животного, в частности, дозу для человека, из доз, экспериментально проверенных на мышах. Например, статья от Reagan-Shaw S. et al. (Reagan-Shaw S. et al. "Dose translation from animal to human studies revisited". FASEB J 2008, 22(3):659-661), предоставляет стандартные коэффициенты пересчета, используемые для преобразования мг/кг в мг/м².

$$\text{Доза (мг/кг)} \times K_m = \text{Доза (мг/м}^2\text{)}$$

В статье также объясняется, что это преобразование является основой для преобразования дозы у первого вида животных в дозу у второго вида животных (аллометрический перевод дозы). Таким образом, доза животного (AD) в мг/кг может быть преобразована в эквивалентную дозу человека (HED) в мг/кг с использованием

следующей формулы:

$$\text{HED (мг/кг)} = \text{AD (мг/кг)} \times (\text{животное } K_m / \text{человек } K_m)$$

где K_m для каждого вида показан в таблице 1 (данные взяты из Reagan-Shaw S. et al. "Dose translation from animal to human studies revisited". FASEB J 2008, 22(3):659-661).

Таблица 1. Коэффициент K_m для преобразования AD в HED

Вид		K_m коэффициент
Человек	взрослые	37
	дети	25
бабуин		20
Собака		20
обезьяна		12
кролик		12
морская свинка		8
крыса		6
хомяк		5
мышь		3

Таким образом, эксперименты с дозами 10 мг/кг у мышей соответствуют общим дозам у человека 0,8 мг/кг.

В другом конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят человеку в дозе, где каждое введение составляет от 0,2 мг/м² до 5 мг/м². предпочтительно от примерно 0,2 мг/кг/день, примерно 0,25 мг/кг/день, примерно 0,3 мг/кг/день, примерно 0,35 мг/кг/день, примерно 0,4 мг/кг/день, примерно 0,45 мг/кг/день, примерно 0,50 мг/кг/день, примерно 0,55 мг/кг/день, примерно 0,6 мг/кг/день, примерно 0,65 мг/кг/день, примерно 0,7 мг/кг/день, примерно 0,75 мг/кг/день, примерно 0,8 мг/кг/день, примерно 0,85 мг/кг/день, примерно 0,90 мг/кг/день, примерно 0,95 мг/кг/день, примерно 1 мг/кг/день, примерно 1,2 мг/кг/день, примерно 1,4 мг/кг/день, примерно 1,6 мг/кг/день, примерно 1,8 мг/кг/день, примерно 2 мг/кг/день, примерно 2,2 мг/кг/день, примерно 2,4 мг/кг/день, примерно 2,6 мг/кг/день, примерно 2,8 мг/кг/день, примерно 3 мг/кг/день, примерно 3,2 мг/кг/день, до примерно 3,4 мг/кг/день, примерно 3,6 мг/кг/день, примерно 3,8 мг/кг/день, примерно 4 мг/кг/день, примерно 4,5 мг/кг/день, примерно 5 мг/кг/день. В более предпочтительном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе от 0,7 мг/кг массы тела/день до 1 мг/кг массы тела/день. В еще более предпочтительном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического

рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в дозе 0,81 мг/кг массы тела/день.

В другом конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят ежедневно, предпочтительно 1 раз в день, 2 раза в день, 3 раза в день. В более предпочтительном варианте осуществления вводят 1 раз в день. В другом конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят в течение 10 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев или более 12 месяцев, предпочтительно в течение 25 дней.

Термины «фармацевтически приемлемый эксципиент» или «фармацевтически приемлемый носитель» относятся к любому соединению или комбинации соединений, которые по существу нетоксичны для субъекта в используемых дозировке и концентрации и совместимы с другими компонентами фармацевтической композиции. Таким образом, эксципиент представляет собой неактивное вещество, составленное вместе с активным ингредиентом (т.е., селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты) фармацевтической композиции, с целью увеличения объема композиций, которые содержат указанные активные ингредиенты. Увеличение в объеме позволяет удобно и точно дозировать лекарственное вещество при изготовлении лекарственной формы. Эксципиенты также могут служить различным терапевтическим целям, таким как облегчение абсорбции или растворимости соединения (лекарственного средства) или другим фармакокинетическим критериям. Эксципиенты также могут быть полезны в процессе производства для помощи в обращении с соответствующим активным веществом, например, для улучшения текучести порошка или свойств не допускающих прилипания, в дополнение к обеспечению стабильности *in vitro*, такой как предотвращение денатурации в течение ожидаемого срока годности. Выбор подходящих эксципиентов зависит от пути введения и лекарственной формы, а также от активного ингредиента и других факторов. Эксципиент может представлять собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого обычного типа. Иллюстративные, не ограничивающие примеры эксципиентов или носителей включают воду, солевые (соляной) растворы, спирт, декстрозу, растительные масла, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, поверхностно-активные вещества, кремниевую

кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, сложные эфиры жирных кислот петрозфиры, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты, можно вводить любым подходящим путем введения, таким как, но не ограничиваясь, парентеральный, пероральный, местный, назальный, ректальный, интравитреальный путь. В конкретном варианте осуществления селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты, вводят внутрибрюшинно, внутривенно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно или интравитреально. В предпочтительном варианте осуществления изобретения селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят перорально, внутривенно или интравитреально. В более предпочтительном варианте осуществления, селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора по изобретению, предпочтительно производное алканоламина формулы I, более предпочтительно производное алканоламина формулы II или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты, вводят внутрибрюшинно.

Изобретение описано ниже с помощью следующих примеров, которые следует рассматривать только как иллюстративные и не ограничивающие объем изобретения.

Примеры

Способы

Культура клеток

Клетки HeLa 9XHRE стабильно трансфицировали HREluc репортером, несущим девять копий в тандеме гормон-респонсивного элемента (HRE), за которым следовал ген люциферазы, и культивировали в DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла, Gibco, Grand Island, NY, USA) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Gibco). Для индуцирования гипоксических состояний клетки HeLa культивировали со 100 мкМ десферриоксиамином (DFO) (химическая гипоксия). При необходимости клетки HeLa обрабатывали пропранололом (неселективным бета-блокатором, который связывает как бета 1, так и бета 2 рецепторы), ICI 118.551 (специфичным для бета 2) и атенололом (специфичным для бета 1) (100 мкМ). Первичные культуры гемангиобластомы ЦНС получали в соответствии с ранее описанным Albíñana et al., Orphanet J Rare Diseases, 2015, 10: 118. При необходимости первичные культуры гемангиобластомы ЦНС обрабатывали пропранололом и ICI (100 мкМ).

RT-PCR в реальном времени

Тотальную клеточную РНК выделяли из клеток гемангиобластомы с использованием набора Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Один микрограмм тотальной РНК обратно транскрибировали в конечном объеме 20 мкл с помощью набора для синтеза кДНК First Strand (Roche, Mannheim, Germany) с использованием случайных праймеров. Систему SYBR Green PCR (BioRad, Hercules, CA, USA) использовали для проведения PCR в реальном времени с системой iQ5. Праймеры, используемые для qPCR, представляли собой:

Таблица 2. Праймеры, использованные для qPCR

ГЕН	Прямой	Обратный
18S	5'- CTCAACACGGGAAACCTCAC - 3'	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG - 3'
BAX	5'- CACTCCCGCCACAAAGAT - 3'	5'- CAAGACCAGGGTGGTTGG - 3'
CASP9	5'- CCCAAGCTCTTTTTCATCCA -3'	5'- TTA CTGCCAGGGGACTCGT - 3'

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток гемангиобластомы и HeLa 9X HRE измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA). Это гомогенный метод определения количества жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, который сигнализирует о наличии метаболически активных клеток. В общей сложности 10000 клеток высевали в 96-луночные планшеты и культивировали с пропранололом/ICI118,551 в 100 мкл среды. После обработки планшеты уравнивали до комнатной температуры в течение 30 минут перед добавлением 100 мкл реагента Cell Titer-Glo (буфер для лизиса, рекомбинантная люцифераза Ultra-Glo, люциферин и Mg²⁺). Люминесценцию измеряли с помощью системы мультidetекции Glomax (Promega).

Анализ ранозаживления и формирование канальцев

Царапины in vitro получали путем соскабливания конфлюэнтных монослоев HUVEC-1 в лунках планшета P-24 стерильными одноразовыми наконечниками пипеток. Оставшиеся клетки промывали PBS и инкубировали с EGM-2 (Lonza) в отсутствие или в присутствии пропранолола/ICI 118,551 100 мкМ в течение до 6-8 часов. Для анализов образования канальцев HUVEC высевать на чашке, как и раньше, но на чашке с матригелем ((BD Biosciences, Bedford, MA, USA), и инкубировали при 37°C без обработки и с обработкой пропранололом/ICI 118,551 (100 мкМ). Формирование канальцев контролировали в течение до 8 часов.

Формирование и культура гемангиосферы

Клетки гемангиобластомы, полученные из VHL, выращивали в суспензии в среде DMEM:F-12, не содержащей фенолового красного, с GlutaMAX, дополненной B27, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF и 1% пенициллин/стрептомицин при 37°C в 5% CO₂. Суспензии отдельных клеток высевали с плотностью 50000 клеток/мл в колбы со сверхнизким прикреплением 75 см² (Corning). Культуры не обрабатывали или

обрабатывали пропранололом/ICI 118,551 в указанных концентрациях.

Измерение жизнеспособности клеток

Эндотелиальные клеточные линии (HUVEC и HMEC), человеческую клеточную линию ccRCC Vhl -/- 786-O и первичные культуры гемангиобластом от пациентов (Hb14 и 18) высевали в трех повторах на 96-луночный планшет (2×10^3 на лунку). На следующий день клетки обрабатывали носителем или различными концентрациями мМ пропранолола или ICI-118,551 в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток (пролиферация клеток, содержание АТФ) определяли с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями поставщика. Cell Titer-Glo reagent ((буфер для лизиса, рекомбинантная люцифераза Ultra-Glo, люциферин и Mg^{2+}). Клеточный лизис индуцировали в орбитальном шейкере в течение 2 минут, а затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала. Люминесценцию измеряли с использованием системы GlomaxMultidetector (Promega). Показания были нормализованы для контроля (100%).

Ксенотрансплантаты человеческих клеток ccRCC 786-O у мышей

Самцам 7-8 недельных мышей NOD scid gamma (NSG) инъектировали в заднюю область суспензию отдельных клеток из 10^6 786-O клеток. Когда размер опухоли достигал объема 100 мм^3 , мышей случайным образом разделяли на 3 группы по 9/10 мышей в каждой. Две группы ежедневно получали внутривенно 10 мг/кг массы тела пропранолол или ICI-118,551, соответственно, и третьей группе вводили растворитель. Размер опухоли измеряли штангенциркулем каждые 2-3 дня, и объемы рассчитывали по формуле: $\text{наименьший}^2 \times \text{наибольший} \times 0,52$. Мышей умерщвляли, когда средний объем опухоли контрольной группы достигал конечной точки, установленной на основе этических процедур

Результаты

ICI 118,551 снижает жизнеспособность гемангиобластомы и ингибирует образование гемангиосферы у пациентов с VHL

Результаты, показанные в примерах, демонстрируют, что ICI 118,551, селективный бета 2 блокатор, не только отражает результаты, полученные с пропранололом (неселективный бета блокатор, который связывает бета 1 и бета 2 рецепторы) (см. Albiñana et al., Orphanet J of rare diseases, 10:118 (2015)), но также показывает превосходные результаты по сравнению с пропранололом. В частности, в случае клеток, происходящих из опухоли VHL, ICI 118,551 снижает жизнеспособность за счет увеличения апоптоза клеток, ингибирует образование гемангиосферы, которая является специфическим свойством опухолей, содержащих недифференцированные стволовые клетки, и является антиангиогенным средством посредством ингибирования HIF-стимулированной транскрипции его генов-мишеней.

Пропранолол и ICI 118,551 снижают жизнеспособность клеток гемангиобластомы из первичной культуры, полученной из опухоли VHL, по меньшей мере на 55-60% по

сравнению с теми же необработанными клетками (фиг. 1). В большинстве случаев эффект ICI 118,551 превосходит эффект пропранолола, когда оба используются при 100 мкМ, после 72 часов обработки. Снижение жизнеспособности колеблется от 60 до 40% в зависимости от разных опухолей, пациентов и времени культивирования.

На фиг.2 представлены оставшиеся клетки в культурах после 72 часов обработки Р (пропранолол 100 мкМ) и ICI 118,551 50 мкМ (НВ 18) и 100 мкМ в (НВ 4) по сравнению с контролем (необработанные клетки разных гемангиобластом от 2 разных пациентов). Наблюдается значительное снижение количества клеток до 30-40% по сравнению с необработанными. Снижение происходит за счет апоптоза, как показано для ICI 118,551 на фиг. 3. На фиг. 3 показано количество мРНК из двух проапоптотических генов, Вах и протеазы-каспазы 9, которое значительно повышается после обработки клеток ICI 118,551 при 100 мкМ.

Одной из характерных особенностей опухолевых клеток в культуре является свойство образовывать организованные сферы вокруг ядра недифференцированных стволовых клеток, причем эти сферы имеют четко определенную границу, окруженную упорядоченной поверхностью контакта со средой. Противоопухолевые средства ингибируют или нарушают образование сфер путем дезагрегации клеток. На фиг. 4 показаны культуры гемангиосферы из разных гемангиобластом без обработки и после обработки 100 мкМ или пропранололом или ICI 118,551 в течение 7 дней в этих конкретных случаях, показанных на этих фиг. 4 и 5. Как показано на 5 различных опухолевых культурах, гемангиосферы разрушаются при лечении бета-блокаторами, что особенно заметно в случае гемангиобластомы 4 (фиг. 4В) и 23 (фиг. 4С) после 100 мкМ ICI 118,551.

Ангиогенез является свойством эндотелиальных клеток образовывать сосуды из уже существующих. Для ангиогенеза необходима миграция эндотелиальных клеток (включая разрушение клеточного матрикса) и тубулогенез или образование новых канальцев (сосудов). Эти свойства могут быть изучены *in vitro* с помощью теста заживления ран (фиг. 5) и тубулогенеза на матрикеле (фиг. 6).

Если конфлюэнтные монослои эндотелиальных клеток разрушаются из-за царапин на их поверхности, эндотелиальные клетки имеют тенденцию мигрировать и заполнять разрыв. Этот «так называемый» тест на заживление ран может проводиться с течением времени для мониторинга миграции клеток. На фиг. 5А показано, как ICI 118,551 и пропранолол при 100 мкМ задерживают закрытие разрыва по сравнению с необработанными клетками (контроль). Миграция необработанных клеток происходит быстрее, что количественно определено на графике на фиг.5В, в то время как ICI 118,551 и пропранолол значительно влияют на процесс миграции.

На фиг. 6А показана характерная сеть канальцев, имитирующая капиллярную сеть, образованную эндотелиальными клетками в матрикеле через 3 часа. Однако, если клетки предварительно обрабатывают ICI 118,551 или пропранололом (100 мкМ), количество замкнутых структур резко уменьшается. Средняя количественная оценка замкнутых

клеток в пяти различных полях показана на фиг.6В. Ясно, что пропранолол и ICI 118,551 действуют как ингибиторы ангиогенеза.

Ангиогенез в значительной степени зависит от программы транскрипции HIF, запускаемой при наличии гипоксического состояния или, как в случае клеток гемангиобластомы фон Гиппеля-Линдау, из-за отсутствия белка VHL, отвечающего за нацеливание белка HIF для его протеасомного процессинга в нормоксических условиях в клетках дикого типа. Особенный отличительный признак клеток гемангиобластомы и клеток светлоклеточного рака почек заключается в том, что они конститутивно экспрессируют белок HIF, который является активным и транслоцируется в ядро, где он может связываться и активировать свои генные мишени, такие как: VEGF, PDGF, EPO, эндоглин, несколько металлопротеаз, карбоангидразы, Glut-1 и так далее. Для проверки того, что пропранолол и ICI 118,551 являются ингибиторами транскрипционной активности HIF, была использована система репортера люциферазы под контролем девяти копий в тандеме гормон-респонсивного элемента (HRE), за которым следовала люцифераза. Клетки HeLa 9XHRE стабильно трансфицировали HREluc репортером. Для индуцирования гипоксических состояний клетки HeLa культивировали со 100 мкМ десферриоксиамином (DFO) (химическая гипоксия). Эти гипоксические клетки или не обрабатывали, или обрабатывали 100 мкМ пропранолола или ICI 118,551, и люциферазную активность измеряли с помощью люцинометрии. На фиг. 7 показано, как экспрессия люциферазы запускается в условиях гипоксии, и как эта повышающая регуляция ослабляется пропранололом и ICI 118,551. ICI 118,551 явно превосходит пропранолол в полном устранении люциферазной активности, индуцированной гипоксией, поэтому ICI 118,551 нацелен на транскрипционную активность HIF, которая практически сводится к «0».

Пропранолол и ICI 118,551 влияют на путь гипоксии, главным образом, через блокаду бета 2 адренергических рецепторов

Когда клетки HeLa, несущие репортер HRE-люциферазной гипоксии, обрабатывают DFO (деферроксиамином), HIF транслоцируется в ядра и связывается с HRE (гормон-респонсивный элемент), слитыми с люциферазным репортером, и стимуляция мишени гипоксии может количественно определяться люминесценцией. Однако стимуляция гипоксии чрезвычайно снижается в присутствии ICI118,551 и пропранолола при 100 мкМ. Поскольку оба являются блокаторами бета 2 адренергического рецептора, также использовали атенолол, специфический бета 1 адренергический блокатор. Как показано на фиг. 8, атенолол, почти не снижает стимуляцию гипоксии. Соответственно, похоже, что ICI118,551 имитирует пропранолол, нацеленный на HIF-индуцируемый путь, и действие осуществляется путем блокирования рецептора типа бета 2. Опухоли, полученные из VHL, имеют конститутивную экспрессию HIF, поэтому терапевтический эффект ICI118,551, специфического бета 2-блокатора, в отношении болезни фон Гиппеля-Линдау объясняется снижением стимуляции программы гена HIF. Таким образом, ICI 118,551 имитирует эффекты пропранолола, влияющие на

путь гипоксии, главным образом через блокаду бета 2 адренергических рецепторов.

ICI 118,551 преимущественно нацелен на Vhl-/- опухолевые клетки, по сравнению с неопухолевыми клетками, такими как HUVEC и HMEC

Когда Vhl-/- клетки, первичные культуры клеток гемангиобластомы от пациентов с VHL, включая Vhl-/- линию клеток рака почки 786-О, обрабатывают в различных дозах от 0 до 250 мкМ ICI118,551, они более чувствительны, чем не опухолевые клетки, такие как HUVEC (эндотелиальные клетки вены пуповины человека) и HMEC (эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла человека). В то время как LD50 для VHL гемангиобластом составляет от 50 до 100 мкМ, ICI118,551, при 786-О составляет 100 мкМ, в случае HUVEC и HMEC составляет около 150 мкМ. Это очень важно для того, чтобы избирательно нацеливаться на Vhl-/- клетки при дозе ICI118,551 ниже токсического диапазона для клеток без Vhl-/. См. фиг. 9. Таким образом, ICI 118,551 преимущественно нацелен на Vhl-/- опухолевые клетки, по сравнению с неопухолевыми клетками.

ICI 118,551 и пропранолол действуют, уменьшая рост опухоли ксенотрансплантата ccRCC Vhl-/- 786-О у мышей NSG, модели *in vivo*

У мышей NSG, получивших лечение пропранололом или ICI118,551 (бета-блокаторы), ингибируется рост опухоли, как показано на основании значительных различий, обнаруженных между размерами опухолей, через 50-60 дней после инокуляции клеток (фиг. 10). Не было никаких существенных различий между лечениями пропранололом и ICI118,551, в то время как эти лечения показали значительное уменьшение примерно на 30% размера опухоли по сравнению с мышами, получавшими носитель. Во время лечения не наблюдалось никаких токсических или побочных эффектов. Таким образом, ICI 118,551 действует, уменьшая рост опухоли ccRCC Vhl-/- 786-О ксенотрансплантатов в модели *in vivo* NSG мышей.

ICI 118.551 по-разному влияет на Vhl-/- клетки и нормальные эндотелиальные клетки HUVEC и HMEC.

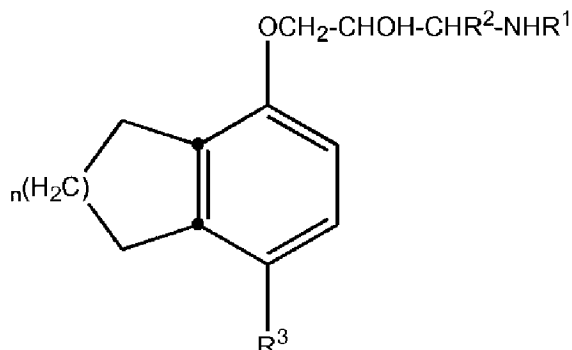
Первичную культуру гемангиобластомы из VHL, нормальных первичных эндотелиальных HUVEC и неопухолевой линии микроэндотелиальных клеток HMEC-1 культивировали в отсутствие или в присутствии различных концентраций ICI 118.551 (50-250 мкМ) для измерения жизнеспособности. В соответствии с кривыми жизнеспособности клетки гемангиобластомы (НВ) показывают только 20% жизнеспособности при 100 мкМ, в то время как неопухолевые клетки HUVEC или HMEC-1 показывают 80% и 55%, соответственно, снижение жизнеспособности при 100 мкМ в обеих культурах,

Пропранолол и ICI 118,551 имеют двойной способ действия: с одной стороны, они стимулируют апоптоз и таким образом останавливают рост и вызывают гибель клеток программируемым образом. С другой стороны, они подавляют транскрипционную активацию HIF-индуцируемой программы, снижая таким образом экспрессию генов-мишеней, таких как VEGF, EPO, эндоглин, металлопротеазы и так далее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения при лечении и/или профилактике болезни фон Гиппеля-Линдау.

2. Селективный антагонист для применения по п.1, где антагонист представляет собой производное алканоламина формулы



где R^1 представляет собой алкильную группу с числом атомов углерода до 6, которая разветвляется на α -атоме углерода,

где R^2 представляет собой алкил с числом атомов углерода до 3,

где R^3 представляет собой водород, галоген или алкил с числом атомов углерода до трех и

где n равно 1 или 2,

или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты.

3. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п.1 или 2, где заболевание VHL возникает с появлением одной или нескольких опухолей.

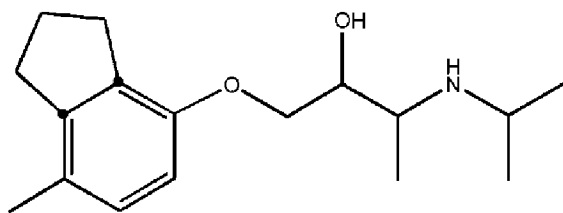
4. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п. 1-3, где опухоль представляет собой гемангиобластому.

5. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по п.4, где гемангиобластома представляет собой гемангиобластому сетчатки или гемангиобластому центральной нервной системы.

6. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 1-5, где n равно 1.

7. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 1-6, где R^1 представляет собой изопропил, R^2 представляет собой метил и/или R^3 представляет собой метил.

8. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по п.7, где производное алканоламина имеет формулу



9. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 2-8, где фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты представляет собой гидрохлорид.

10. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 1-7, где производное алканолamina или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты вводят в дозе от 0,2 мг/кг массы тела/день до 5 мг/кг массы тела/день.

11. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по п. 10, где производное алканолamina или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты вводят в дозе от 0,5 мг/кг массы тела/день до 1 мг/кг массы тела/день.

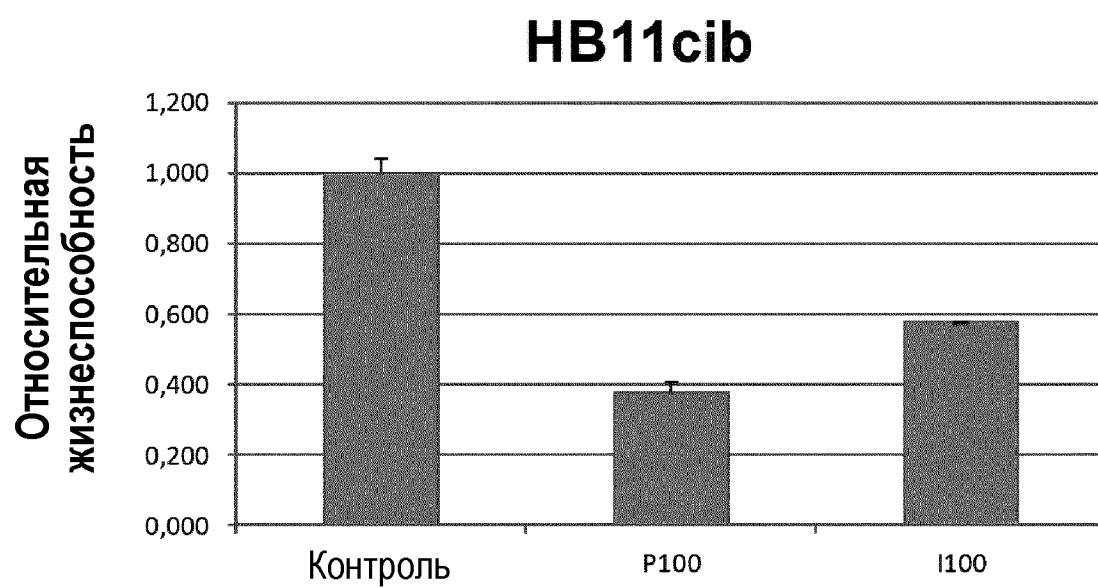
12. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по п. 11, где производное алканолamina или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты вводят в дозе 0,8 мг/кг массы тела/день.

13. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 1-12, где производное алканолamina или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты вводят внутривенно.

14. Селективный антагонист β_2 -адренергического рецептора для применения по любому из п.п. 1-13, где производное алканолamina или его фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты вводят ежедневно в течение 25 дней.

1/14

ФИГ.1

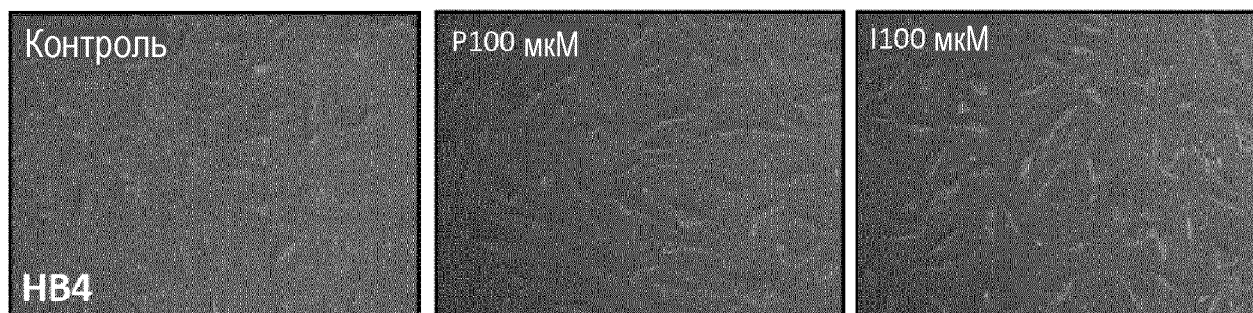


ФИГ.2

А



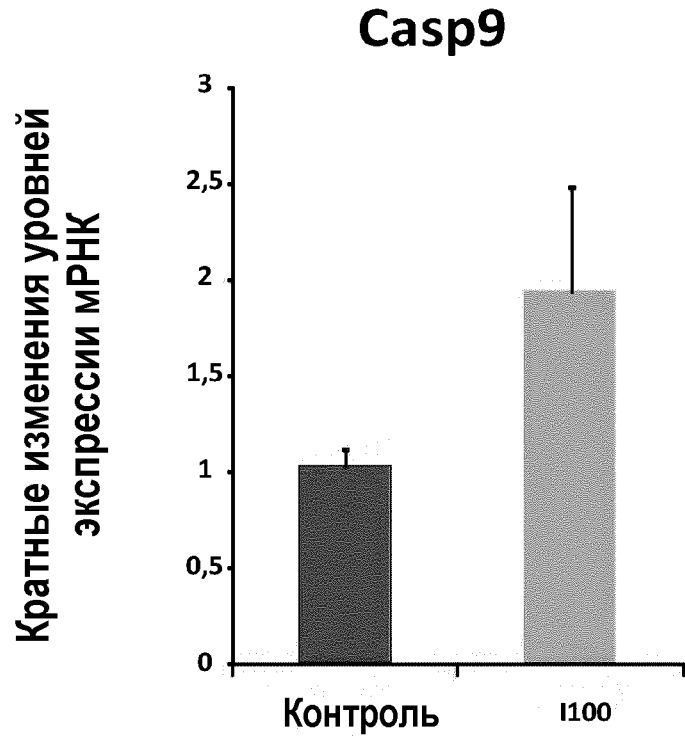
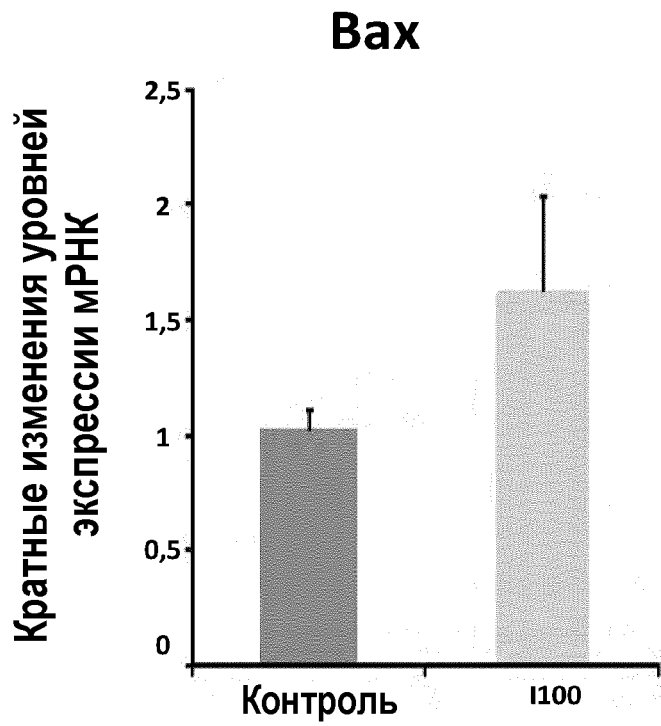
В



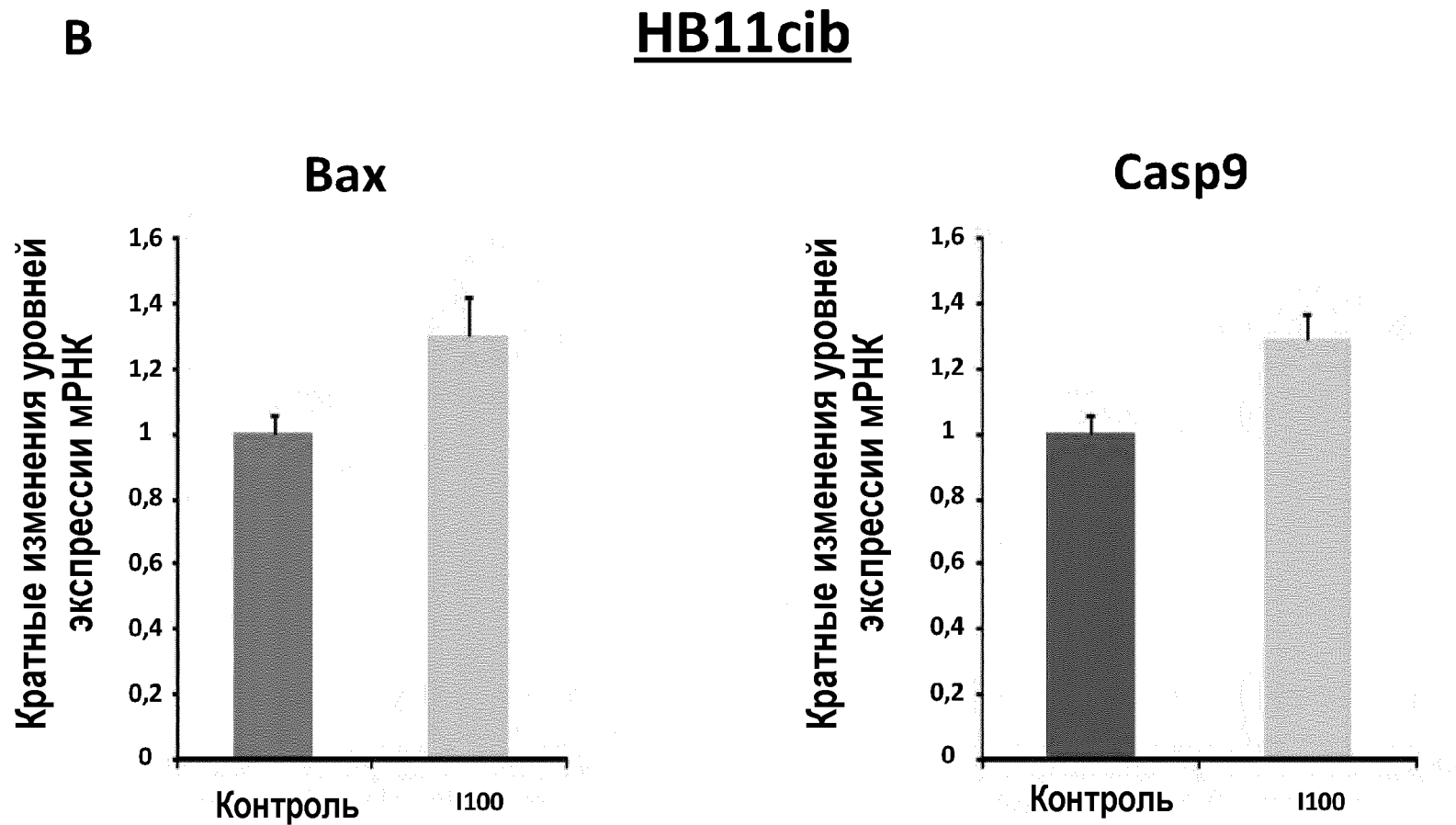
ФИГ.3

A

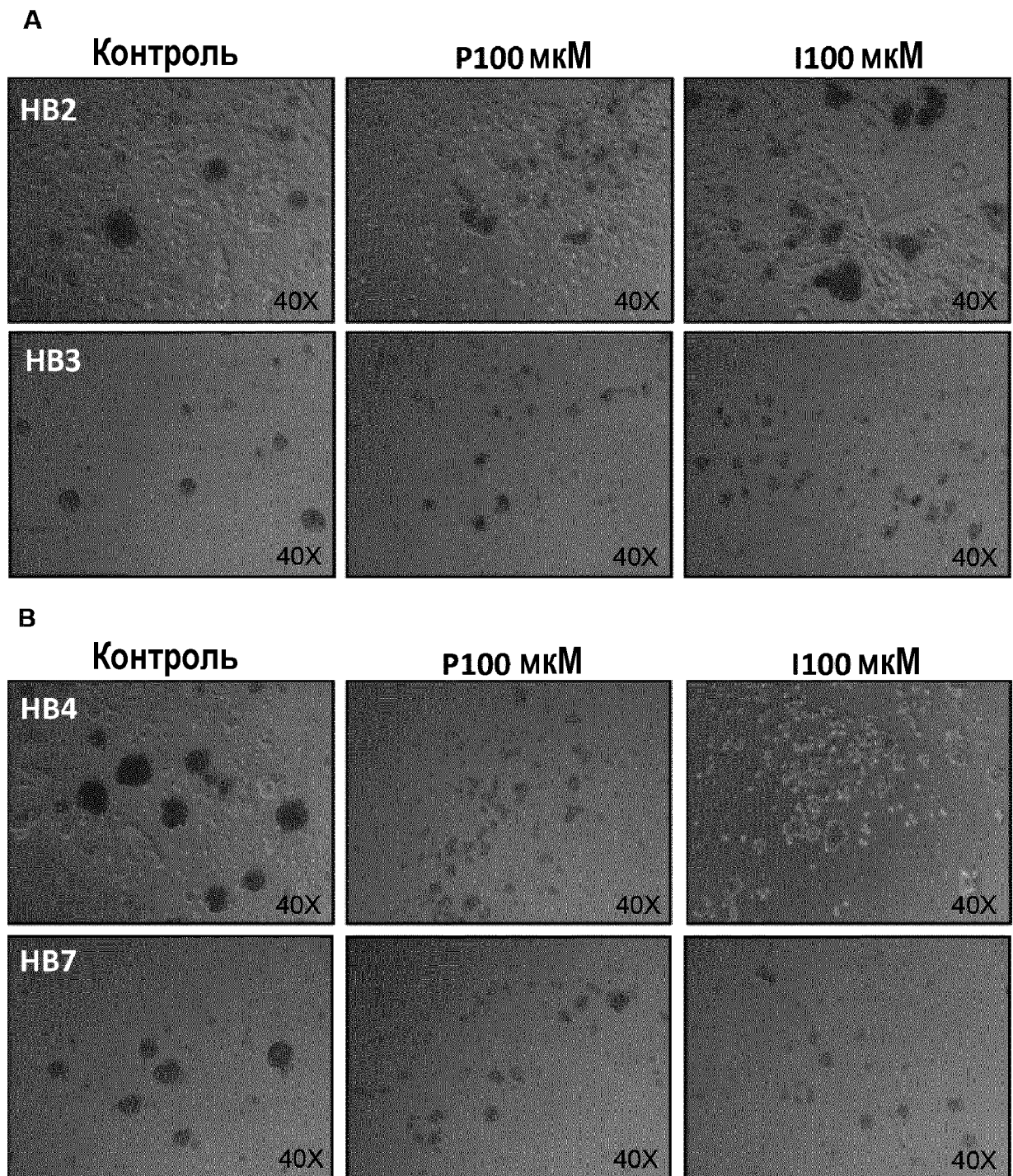
HB26



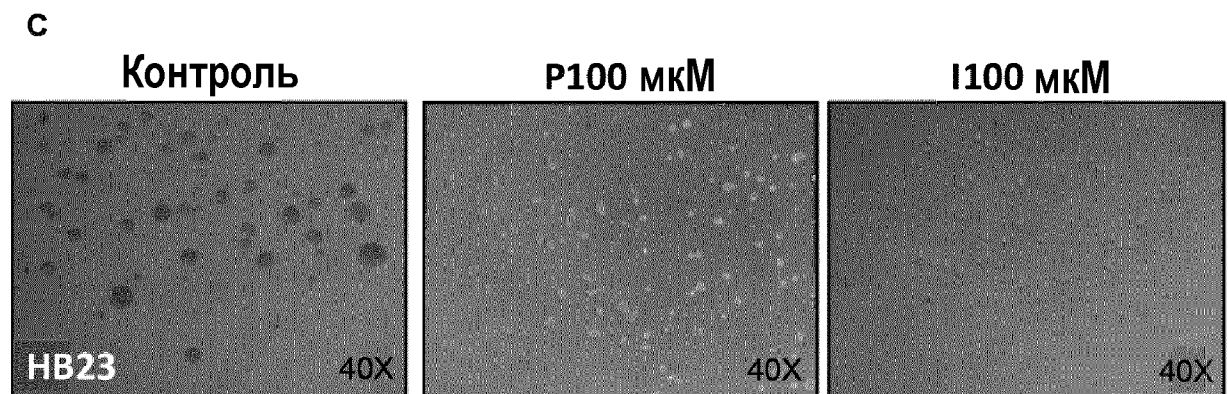
ФИГ.3 (продолжение)



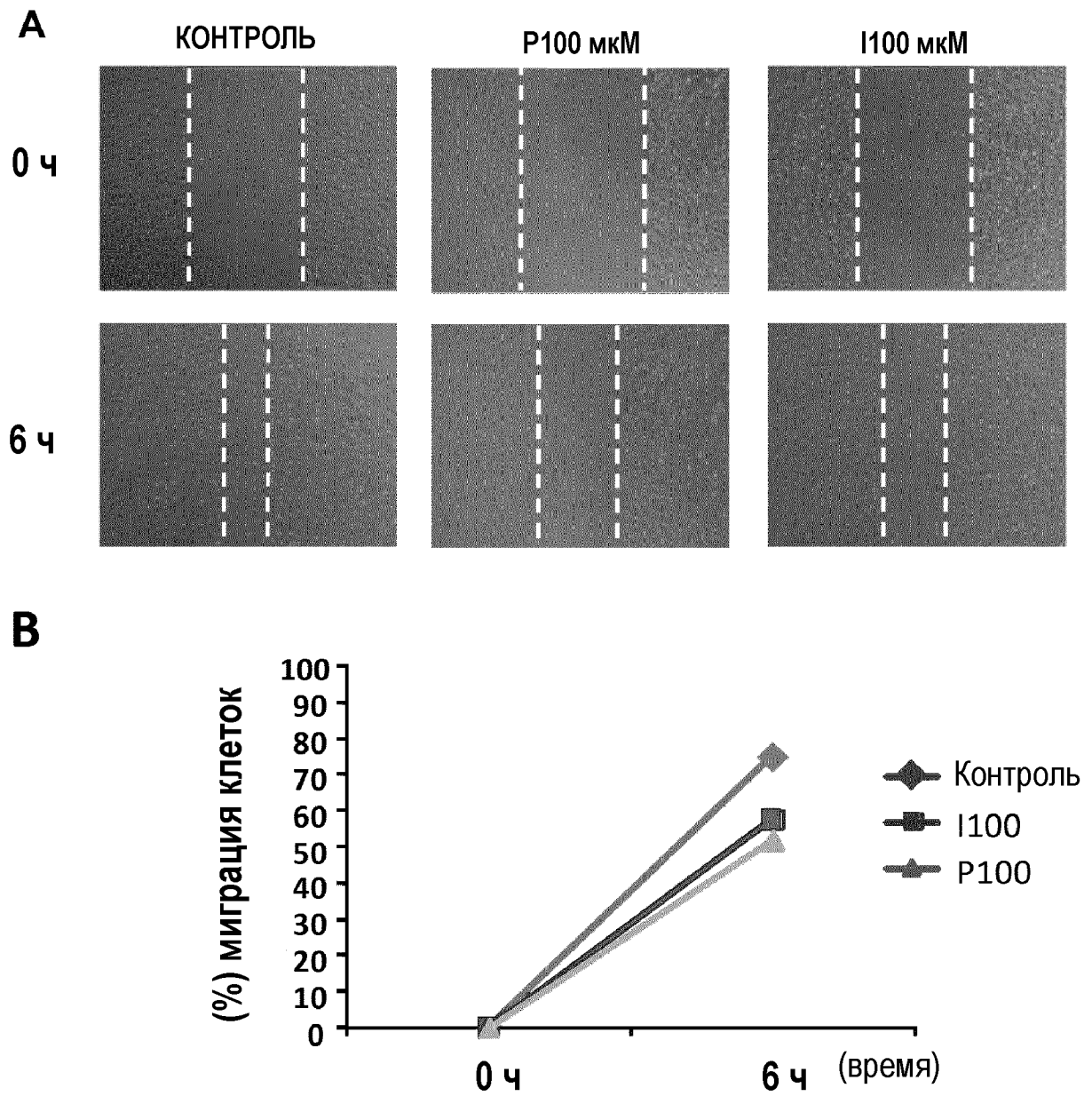
ФИГ.4



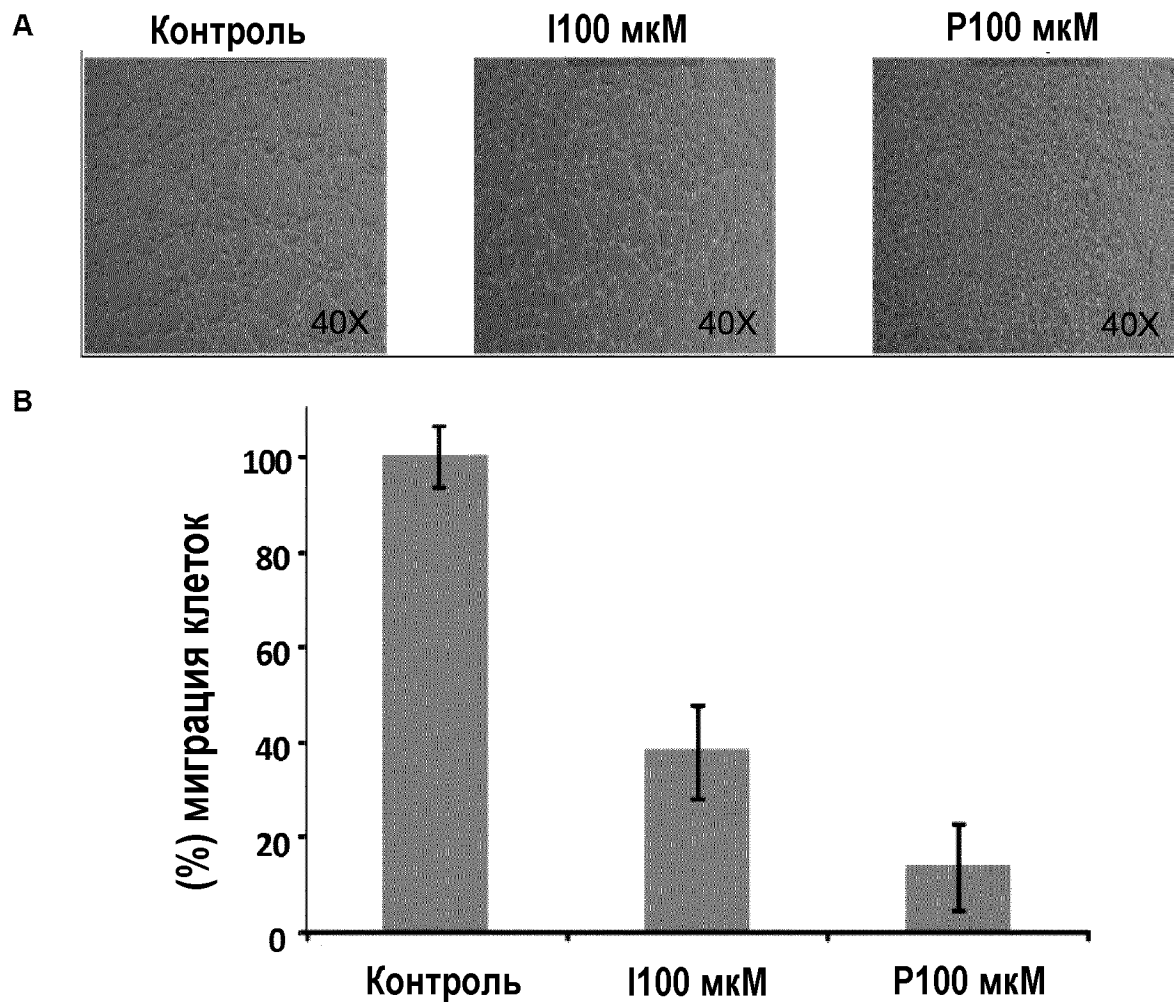
ФИГ.4 (продолжение)



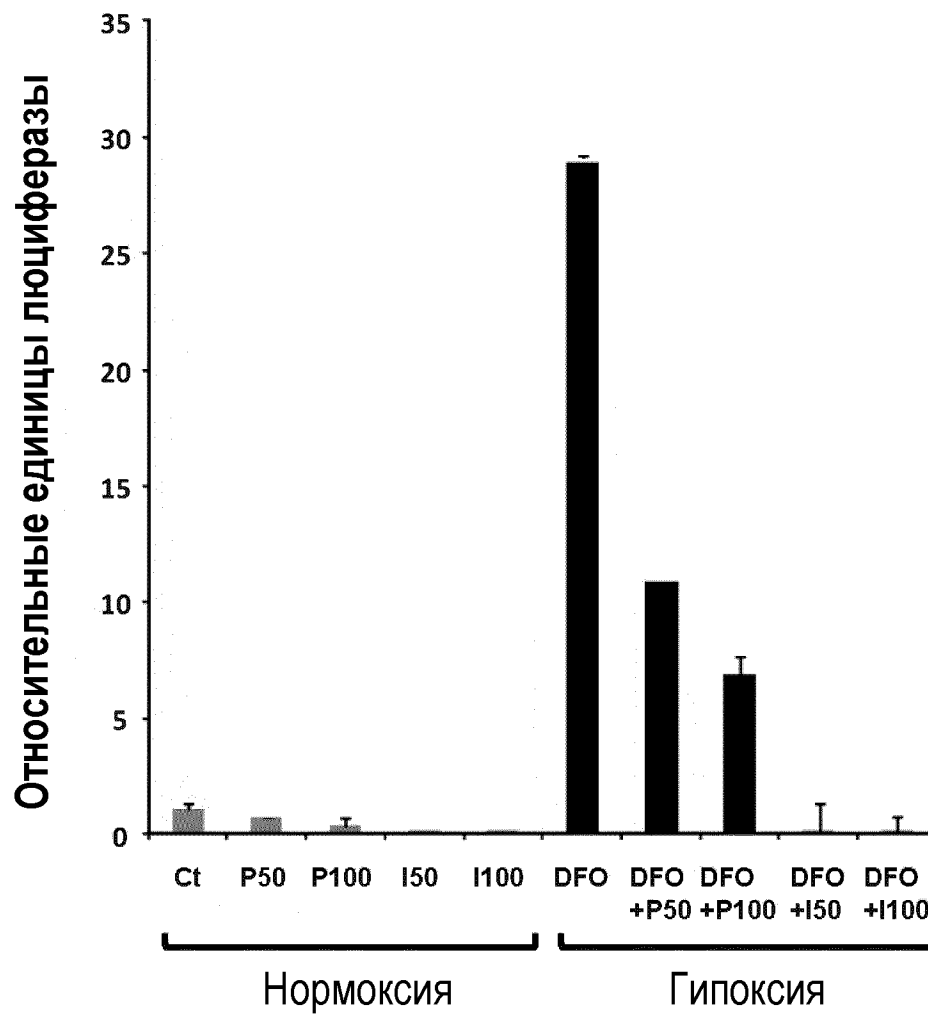
ФИГ.5



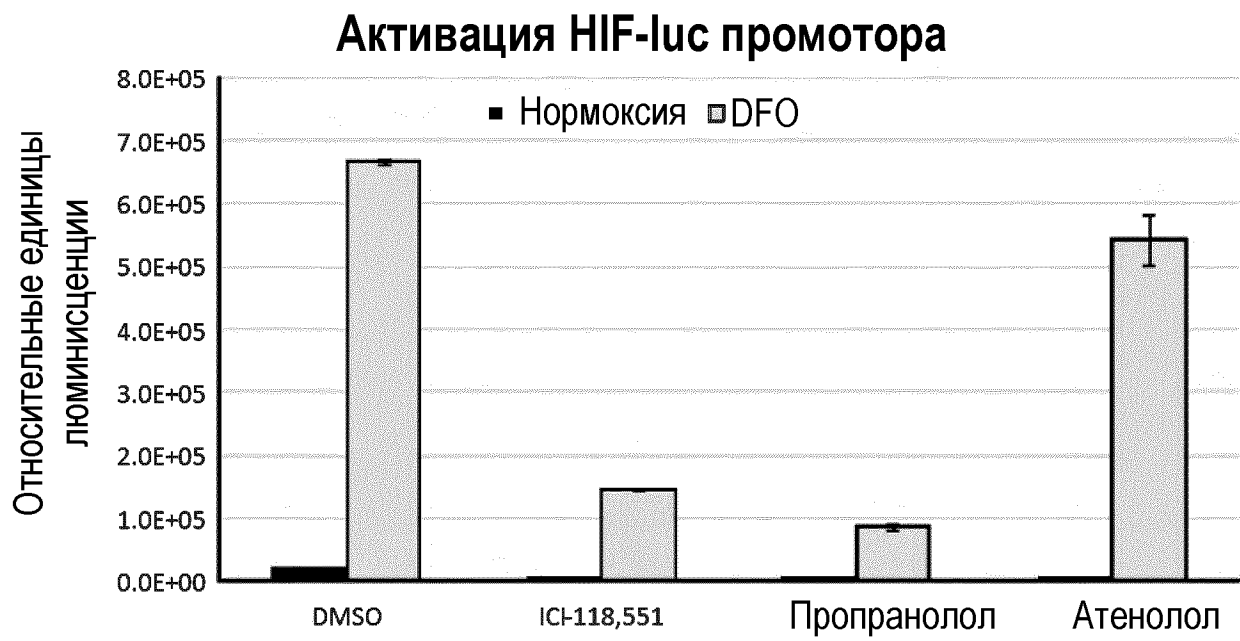
ФИГ.6



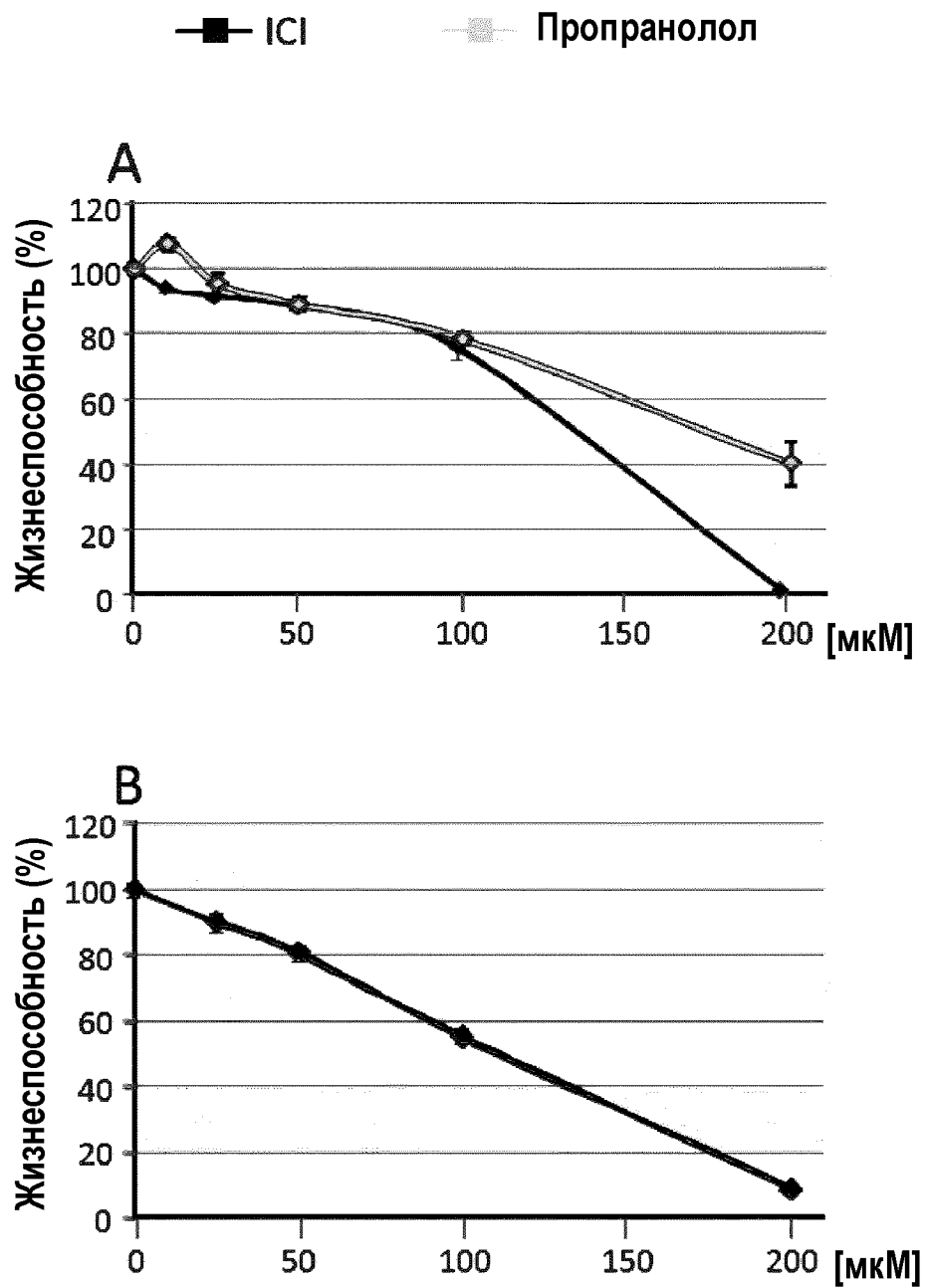
ФИГ.7



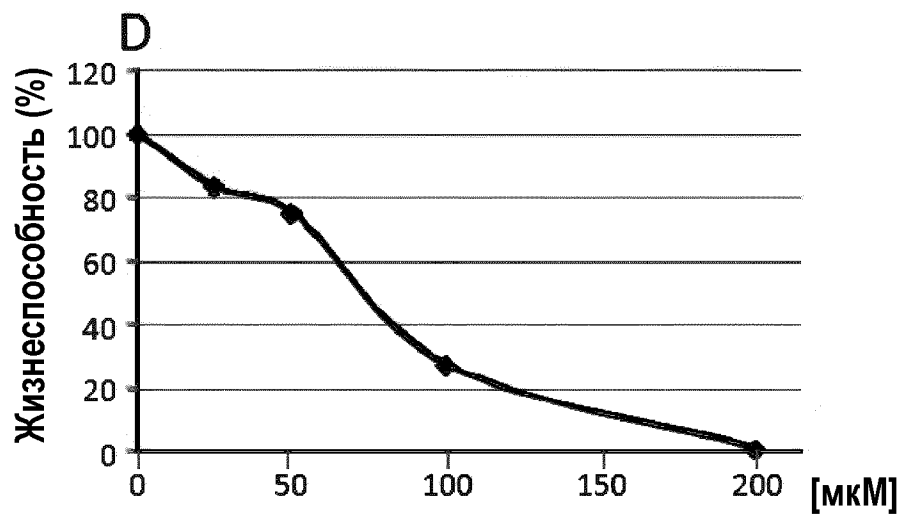
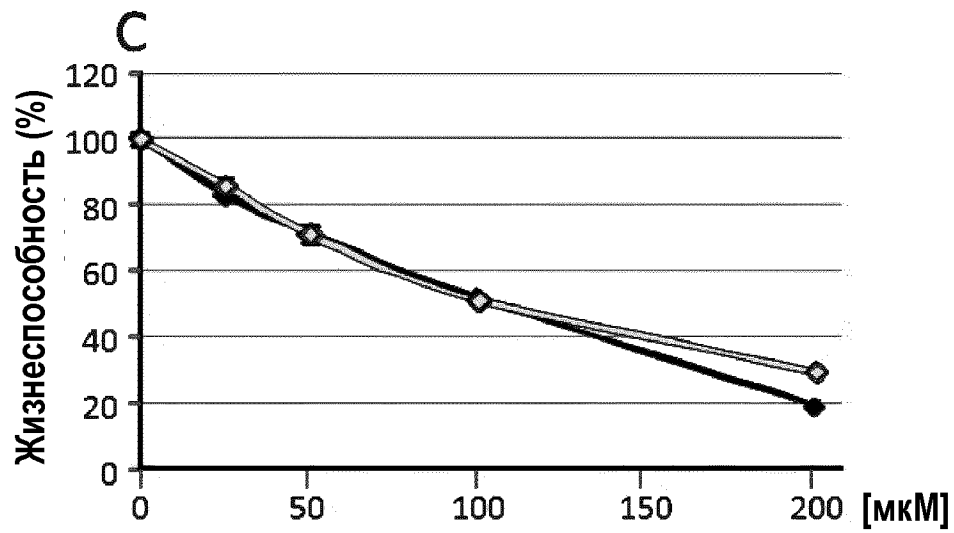
ФИГ.8



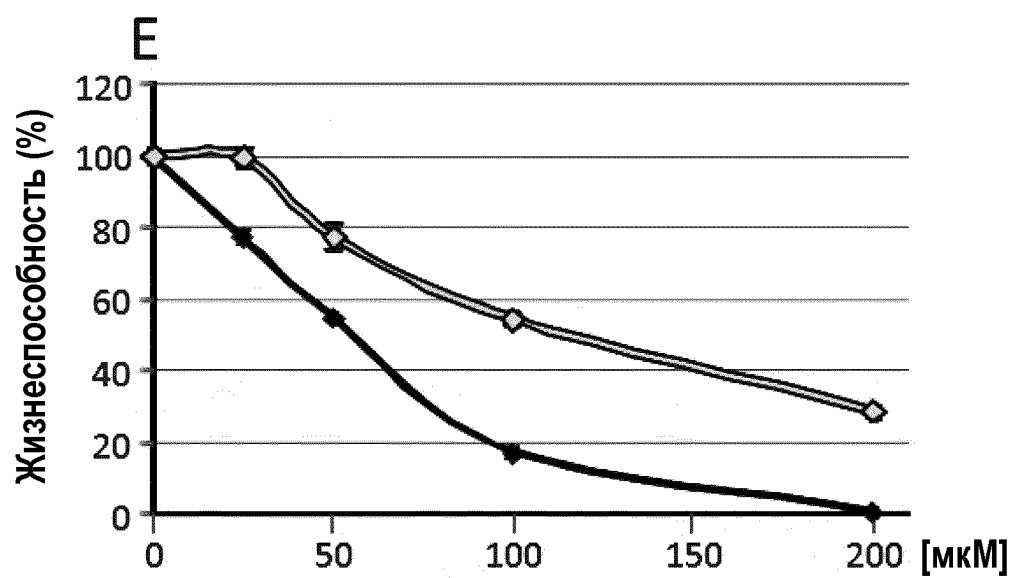
ФИГ.9



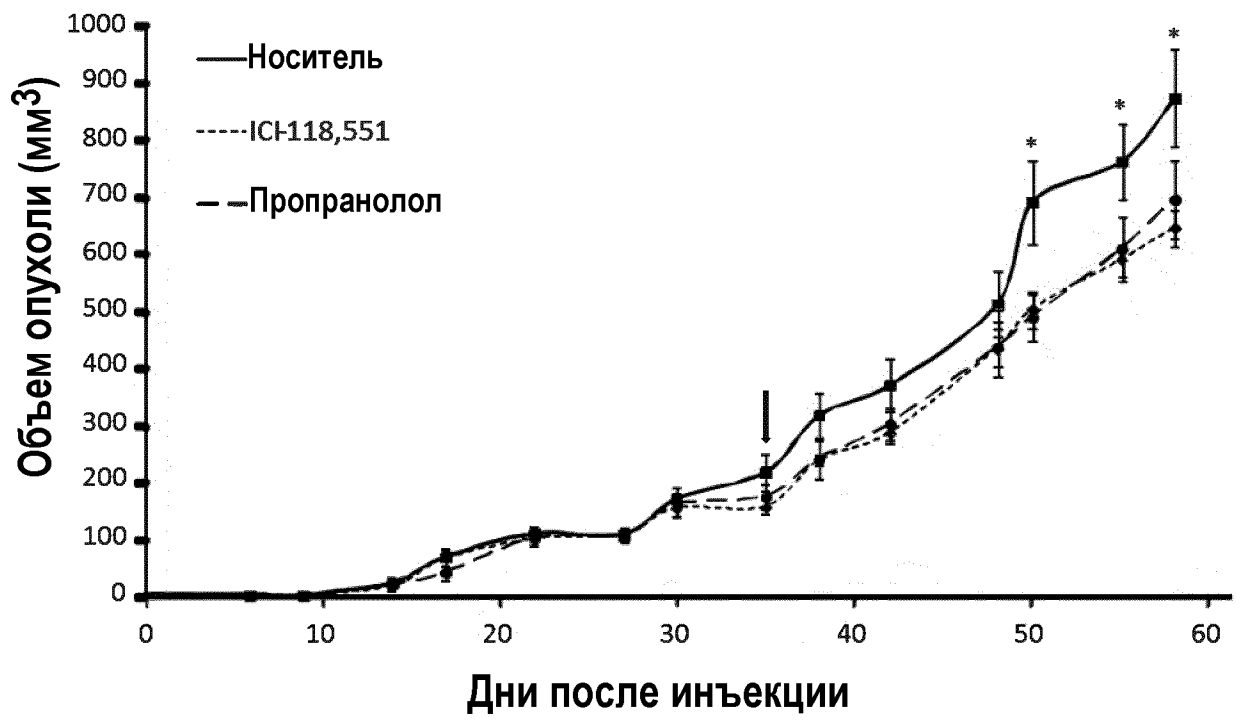
ФИГ.9 (продолжение)



ФИГ.9 (продолжение)



ФИГ.10



ФИГ.11

