(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039485 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.01

(21) Номер заявки
201791209

(22) Дата подачи заявки
2015.12.21

(51) Int. Cl. ***A61K 31/5685*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ 4-ГИДРОКСИТЕСТОСТЕРОНА В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА АНГИОГЕНЕЗА

(31) **14200543.8**
(32) **2014.12.30**
(33) **EP**
(43) **2017.11.30**
(86) **PCT/EP2015/080762**
(87) **WO 2016/107778 2016.07.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КУРАДИС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Унтереггер Герхард (DE)

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

(56) CUTOLO M. ET AL.: "Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis.", ARTHRITIS AND RHEUMATISM JAN 1991, vol. 34, № 1, January 1991 (1991-01), p. 1-5, XP002740502, ISSN: 0004-3591, abstract, p. 4, left-hand column, paragraph 2nd

EP-A1-2060300

EP-A1-1854465

ADAM W. ET AL.: "Invasively growing nasopharyngeal fibroma: Tentative treatment with testosterone (100 mg per week) to reduce vascularization of the tumor", H+G ZEITSCHRIFT FUR HAUTKRANKHEITEN, 1982, DE, vol. 57, № 17, 1982, p. 1295, XP008177510, ISSN: 0301-0481, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к применению 4-гидрокситестостерона или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира в качестве ингибитора ангиогенеза, а также для ингибирования неоваскуляризации в профилактике или лечении солидной опухоли или не солидной опухоли. Данное изобретение позволяет эффективно ингибировать рост и васкуляризацию опухоли.

039485 B1

039485 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности к принципиально новым применениям стероидных соединений С-19, конкретнее к стероидам С-19, имеющим структуру андростен-3-онов со специфической структурной конфигурацией, в частности, в 4-м и/или 17-м положениях, с целью ингибирования неоваскуляризации, ангиогенеза и других применений. Настоящее изобретение, в частности, относится к отобранным стероидам С-19, ингибирующим пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток и/или гладкомышечных клеток при лечении заболеваний, связанных с появлением патологической неоваскуляризации и/или чрезмерными регенеративными процессами, например, связанных с опухолями или воспалительными процессами. Кроме того, настоящее изобретение, особенно в терапевтических случаях воспалительных заболеваний и/или раковых заболеваний и схожих состояниях ассоциированных тканей, имеет отношение к снижению синтеза или экспрессии следующих участвующих в процессе пролиферации, раковых и/или воспалительных процессах факторов роста или рецепторов фактора роста, отобранных из группы, состоящей из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и функционально связанных факторов роста, в частности рецепторов 13 фактора роста фибробластов (FGFR 13), рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) α и/или β, рецепторов фактора роста тучных/стволовых клеток (SCFR; также известный как c-Kit, или [протоонкогенный рецептор] тирозин-специфичной протеинкиназы Kit [или рецептор тирозинкиназы Kit], или CD117).

Уровень техники

Ангиогенез - это физиологический процесс тканевой васкуляризации, который влечет за собой разрастание новых кровеносных сосудов в ткани, где в них [сосудах] есть необходимость. Например, в условиях кислородного голодания, подобно как это может быть в случае после возникновения раны, считается, что клетки высвобождают ангиогенные факторы, вызывая таким образом рост новых сосудов. Например, фактор роста сосудистого эндотелия расценивается как наиболее важный фактор, вызывающий пролиферацию эндотелиальных клеток, т.е. тех клеток, которые образуют сосуды, что в результате приводит к васкуляризации.

Однако этот физиологический процесс может быть нарушен при некоторых патологических состояниях, что приводит к чрезмерному и ненужному или даже вредному образованию новых сосудов, что также называют неоваскуляризацией. С одной стороны, это состояние неоваскуляризации само по себе может вызвать заболевание или патологическое состояние, например, в случае чрезмерного образования рубцов или неоваскулярной глаукомы. С другой стороны, неоваскуляризация способствует прогрессированию определенных заболеваний, как, например, в случае инициации некоторых солидных [плотных] опухолей, например рака молочной железы, рака предстательной железы или лимфом, таких как лимфомы Ходжкина или неходжкинских лимфом, или [в случае инициации] не солидных опухолей, таких как множественная миелома.

Поскольку ангиогенез или неоваскуляризация являются отличительным признаком опухолей, то концепцией в противораковой терапии является ингибирование образования новых сосудов и в связи с этим "истощение" опухоли. Было разработано несколько новых соединений, направленных на блокирование пролиферации и миграции эндотелиальных клеток. Например, моноклональные антитела против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) - препарат "Бевацизумаб" (Bevacizumab, Avastin) - успешно используются у пациентов с различными опухолями для предотвращения метастазов и уменьшения опухолей.

В дополнение к антителам, блокирующим фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторы (VEGFR), низкомолекулярные соединения широко используются в качестве ингибиторов тирозинкиназы (ингибиторы тирозинкиназы, такие как "Сунитиниб" (Sunitinib), и препараты второго поколения, такие как "Довитиниб" (Dovitinib или TKI258), кратко охарактеризованы в обзорах Mukherji и др. или Heidegger и др. в связи с ситуацией рака предстательной железы (Mukherji D., Temraz S., Wehbe D., Shamseddine A. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer // Critical Reviews in Oncology/Hematology. - 2013. - 87. - P. 122-131; Heidegger I., Massoner P., Eder I.E., Pircher A., Pichler R., Aigner F., Bektic J., Horninger W., Klocker H. Novel therapeutic approaches for the treatment of castration-resistant prostate can cer // Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. - 2013. - 138. - P. 248-256).

Однако прием "Бевацизумаба" или низкомолекулярных ингибиторов может сопровождаться некоторыми более и/или менее серьезными побочными эффектами. Помимо того, развитие лекарственной устойчивости регулярно наблюдается в клинических условиях в течение курса лечения. Следовательно, существует потребность в принципиально новых целевых молекулах для антиангиогенной терапии, терапии, которая будет связана с меньшими побочными эффектами.

Не так давно стероидные гормоны были спорно оценены из-за их влияния на ангиогенез. Например, Frank-Lissbrant и его коллеги описали быструю неоваскуляризацию в вентральной доле простаты у кастрированных крыс после повторяющегося подкожного введения тестостерона (Franck-Lissbrant I., Haggstrom S., Damber J.E., Bergh A. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats // Endocrinology. - 1998. -139(2). - P. 451-456).

Помимо этого, Liao и др. описал влияние тестостерона на стимулирование миграции эндотелиаль-

ных клеток сосудов в культивируемых эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) (Liao W., Huang W., Guo Y., Xin M., Fu X. Testosterone promotes vascular endothelial cell migration via upregulation of ROCK-2/moesin cascade // Mol Biol Rep. - 2013. - 40. - P. 6729-6735).

Роль тестостерона в регуляции функции эндотелия и участие в развитии и созревании эндотелиальных клеток-предшественников в контексте эректильной физиологии рассматриваются далее в обзоре Traish и Galoosian (Traish A.M., Galoosian A. Androgens modulate endothelial function and endothelial progenitor cells in erectile physiology // Korean J Urol. - 2013. - 54. - P. 721-731).

Eisermann и др. сообщил, что аналог андрогена R1881 индуцирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в линиях клеток рака предстательной железы, что, вероятно, приводит к индуцированному фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) ангиогенезу (Eisermann K., Broderick C.J., Bazarov A., Moazam M.M., Fraizer G.C. Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site // Molecular Cancer. - 2013. - Vol. 12, № 7).

В противоположность этому Chao и др. описал антиангиогенный эффект SR16388 - синтетического стероида - со связывающими свойствами по отношению к ER-альфа и ER-бета рецепторам (Chao W.R., Amin K., Shi Y., Hobbs P., Tanabe M., Tanga M., Jong L., Collins N., Peters R., Laderoute K., Dinh D., Yean D., Hou C., Sato B., Alt C., Sambucetti L. SR16388: a steroidal antiangiogenic agent with potent inhibitory effect on tumor growth in vivo // Angiogenesis. - 2011. - Mar, 14(1). - P. 1-16).

Не поддающиеся прогнозу воздействия на ангиогенез наблюдаются также у других хорошо известных андрогенов, которые тем временем либо все запрещены на рынке, либо изъяты из-за их побочных эффектов. Thomas и др. описывает, что "Даназол" (Danazol) (17α-этинил-17β-гидрокси-андрост-4-ено [2,3-d]изоксазол) ингибирует определенные функции эндотелиальных клеток, такие как пролиферацию и образование трубок, но не оказывает ингибирования на критическую стадию прорастания в ткань (Thomas G.W., Rael L.T., Shimonkevitz R., Curtis C.G., Bar-Or R., Bar-Or D. Effects of danazol on endothelial cell function and angiogenesis // Fertil Steril. - 2007. - Oct, 88, 4 Suppl. - P. 1065-1070). Из-за его андрогенных свойств (вирилизации, увеличения свободного тестостерона несмотря на ингибирование синтеза тестостерона) и его неблагоприятных параметров [профиля] использования он был выведен из обращения.

"Нандролон" (Nandrolone), 17β-гидрокси-эстр-4-ен-3-он, также известный анаболический препарат, оказывает определенные антипролиферативные свойства на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (D'Ascenzo S., Millimaggi D., Di Massimo C., Saccani-Jotti G., Botre F., Carta G., Tozzi-Ciancarelli M.G., Pavan A., Dolo V. Detrimental effects of ana-bolic steroids on human endothelial cells // Toxicol Lett. - 2007. - Mar, 8, 169 (2). - P. 129-136). Однако неизвестно, переносится ли это на ингибирование ангиогенеза, поскольку на животной модели амиотрофического латерального склероза было обнаружено, что "Нандролон" увеличивает образование трансформирующего фактора роста-бета (TGF-beta), который, как известно, стимулирует экспрессию одного из наиболее сильных ангиогенных факторов, т.е. фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Galbiati M., Onesto E., Zito A., Crippa V., Rusmini P., Mariotti R., Bentivoglio M., Bendotti C., Poletti A. The anabolic/androgenic steroid nandrolone exacerbates gene expression modifications induced by mutant SOD1 in muscles of mouse models of amyotrophic lateral sclerosis // Pharmacol Res. - 2012. - Feb, 65(2). - P. 221-230). В противоположность этому "Нандролон" уменьшал количество фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в мышцах тренирующихся крыс (Paschoal M., de Cassia Marqueti R., Perez S., Selistre-de-Araujo H.S. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle // Int J Sports Med. - 2009. - Nov, 30(11). - P. 775-778).

"Станазолол" (Stanazolol) (17α-метил-5α-андростано[3,2-c] пиразол-17β-ол) увеличивает экспрессию трансформирующего фактора роста-бета 1 (TGF-beta 1), что, как известно, увеличивает выработку наиболее сильного ангиогенного фактора - фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Cao Y.,Townsend C.M., Ko T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene expression through Smad3 transcription factor // ACS. - 2005. - Volume 201, Issue 3, Suppl. - P. 17-18).

Кроме того, Thorpe и др. показал, что коньюгат гепарина с гидразидом адипиновой кислоты, связанный с кортизолом (HAH-связанный кортизол), может представлять собой принципиально новый ингибитор ангиогенеза для лечения рака и других ангиогенных заболеваний (Thorpe P.E., Derbyshire E.J., Andrade S.P., Press N., Knowles P.P., King S., Watson G.J., Yang Y.C., Rao-Bette M. Heparin-steroid conjugates: new angiogenesis inhibitors with anti-tumor activity in mice // Cancer Res. - 1993. - Jul, 1, 53(13). - P. 3000-3007).

В свете различных потенциальных целевых молекул стероидных гормонов, например, рецепторов стероидных гормонов или ферментов, становится очевидным, что результат взаимодействия определенной клетки или ткани с определенными стероидами отличается от пола [половой принадлежности] к полу, от ткани к ткани и специфической комбинации [паттерна] стероидных рецепторов - доступных и активных. Специфический биологический ответ на стероидные гормоны находится под влиянием

(i) различий в профиле экспрессии, например, рецепторов стероидных гормонов,

(ii) экспрессии ферментов,

(iii) различий в экспрессии рецепторных кофакторов (коактиваторов или корепрессоров), модулирующих рецепторный ответ, и

(iv) наличия стероидов в культуре клеток, органе или ткани.

Прогнозирование биологического ответа на натуральный стероид или его синтетический аналог представляется сложным; на основании имеющейся литературы квалифицированный специалист может уже прогнозировать, что соединения, подобные тестостерону, могут индуцировать ангиогенез.

Существует потребность - и ввиду этого это цель настоящего изобретения - предложить эффективный ингибитор ангиогенеза, который способен ингибировать пролиферацию эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток и/или миграцию эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток и/или уменьшить синтез или экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и/или рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), тем самым ингибируя неоваскуляризацию при заболеваниях, связанных с чрезмерными регенеративными процессами, т.е. процессами, которые возникают при различных заболеваниях.

Эти цели, так же как и другие, которые станут очевидными из последующего описания настоящего изобретения, достигаются посредством содержания независимых пунктов формулы изобретения. Некоторые из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения определяются содержанием зависимых пунктов формулы изобретения.

Краткое описание изобретения

Различные аспекты, преимущественные признаки и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, обобщенные в следующих пунктах, соответственно отдельно или в сочетании, способствуют решению цели изобретения.

1. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира в качестве ингибитора ангиогенеза.

2. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира согласно вышеприведенному п.1 для терапии воспаления и/или рака путем ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток, миграции эндотелиальных клеток, фактора роста эндотелия сосудов, рецепторов фактора роста эндотелия сосудов, рецепторов фактора роста фибробластов 13 и/или рецепторов тромбоцитарного фактора роста α и/или β.

3. Применение согласно вышеприведенному п.1 или 2, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют в качестве ингибитора, отдельно или в комбинации, неоваскуляризации при патологиях, включающих регенеративные процессы.

4. Применение согласно любому из вышеприведенных пп.1-3, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют для предотвращения или ингибирования васкуляризации при воспалительных состояниях.

5. Применение согласно вышеприведенному п.4, где воспалительное состояние выбрано из группы, состоящей из артритов, воспалительных заболеваний кишечника, экзем и нейродермитов.

6. Применение согласно любому из вышеприведенных пп.1-3, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют для предотвращения или ингибирования васкуляризации, вызванной опухолью.

7. Применение согласно вышеприведенному п.6, где васкуляризация вызвана раком молочной железы или раком предстательной железы.

8. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира для ингибирования неоваскуляризации в профилактике или лечении солидной опухоли или не солидной опухоли.

9. Применение согласно вышеприведенному п.8, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака почек, колоректального рака, рака легких, рака мозга, рака яичников, рака поджелудочной железы и лимфомы, а также соответствующих метастазов, и не солидная опухоль представляет собой множественную миелому или соответствующий метастаз.

10. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира для ингибирования неоваскуляризации в профилактике или лечении заболевания или состояния, выбранного из сосудистых или вазопролиферативных новообразований.

11. Применение согласно вышеприведенному п.10, где сосудистые или вазопролиферативные новообразования выбраны из группы, состоящей из эндотелиомы, заживления раны и сосудистой мальформации.

12. Применение согласно вышеприведенному п.11, где сосудистая мальформация представляет собой гемангиому в коже или в паренхиматозных органах и эндотелиома представляет собой гемангиому.

13. Применение фармацевтической композиции, содержащей 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество для ингибирования неоваскуляризации.

14. Применение согласно вышеприведенному п.13, причем фармацевтическая композиция предназначена для введения на кожу, слизистую или подслизистую, трансдермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, внутрикожного, перорального, интраназального, интраокулярного или суппозиторного введения или закапывания в полости.

Описание чертежей

Фиг. 1A и B. Пролиферационный анализ воздействия препаратов 4-OHT и TKI258 на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) при использовании тестов с WST-1 соответственно по отдельности или в комбинации.

Фиг. 2A. Принцип теста миграции клеток в системе "Трансвелл".

Фиг. 2B. Анализ теста миграции клеток в системе "Трансвелл" при воздействии на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) препаратом 4-OHT.

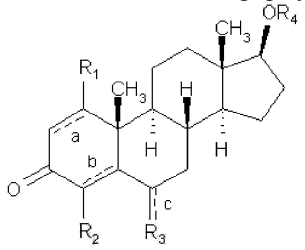
Фиг. 3. Анализ заживления ран (царапин) эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) при воздействии 4-OHT.

Фиг. 4. Тест миграции трубок эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) при воздействии 4-OHT с использованием матригеля.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение здесь описано более подробно в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления и примерами, которые, однако, представлены только в иллюстративных целях и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение предлагает соединение общей формулы 1



которое, как было неожиданно обнаружено, эффективно ингибирует ангиогенез и, в частности, проявляет следующие свойства по отдельности или в комбинации от (i) до (vii):

(i) ингибирование пролиферации эндотелиальных клеток;

(ii) ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток;

(iii) ингибирование миграции эндотелиальных клеток;

(iv) ингибирование миграции гладкомышечных клеток;

(v) снижение экспрессии или синтеза белков фактора роста эндотелия сосудов (VEGF);

(vi) снижение экспрессии или синтеза белков рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR);

(vii) снижение экспрессии белков или синтеза функционально связанных факторов роста, в том числе рецепторов фактора роста фибробластов 13 (FGFR 13), рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFR) α и/или β и рецепторов фактора роста тучных/стволовых клеток (SCFR, также известный как c-Kit, или рецептор тирозинкиназы Kit, или CD117).

Таким образом, оно особенно подходит для лечения заболеваний, связанных с чрезмерными регенеративными процессами, включая неоваскуляризацию внутри ткани. Кроме того, любое противоопухолевое/антипролиферативное и/или противовоспалительное лечение по пп.(i)-(vii) (выше) будет особенно и избирательно эффективным у пациентов, подверженным такой аномальной пролиферации, и/или в специальных целевых тканях и органах у пациентов, у которых наблюдается такая аномальная пролиферация. Соединение формулы 1 и его предпочтительные варианты осуществления, как указано выше (т.е. соединение 1, в котором предпочтительно "a" и "c" представляют собой одинарную связь, "b" представляет собой двойную связь, а R_2 представляет собой OR_5, OR_5 является таким, как определено выше, предпочтительно в котором R_5 представляет собой либо водород, либо линейный или разветвленный C_1-C_6-алкил, а R_4 представляет собой либо водород, либо COR_6, где R_6 представляет собой C_1-C_6; более предпочтительно, когда соединение представляет собой 4-гидрокситестостерон (4-OHT), или его соли, или сложные эфиры), к удивлению, как было обнаружено, проявляет антиангиогенную активность и ингибирующие эффекты, указанные пунктами от (i) до (vii) выше. При условии, что если в структуре формулы 1 символ "a" представляет собой одинарную связь, "b" представляет собой двойную связь, а R_2 не является H, то обеспечивается отсутствие тестостерон-зависимых/связанных и тестостерон-подобных эффектов.

Важно отметить, что вышеупомянутая ткань может, в частности, быть тканью или органом в организме человека, в которой/ом (нео)васкуляризация может иметь место и может быть спровоцирована определенной опухолью, такой как раковой или не раковой тканью груди, тканью предстательной железы, любой кишечной тканью, легочной тканью, тканью почек, мозга, глаз, тканью яичников или [вышеупомянутая ткань может быть] сосудистой тканью самой по себе в контексте сосудистых аномалий, как, например, сосудистых или вазопролиферативных новообразований, таких как гемангиомы или сосудистые мальформации, такие как сосудистые мальформации с медленным током жидкости: капиллярные мальформации, венозные мальформации, лимфатические мальформации; сосудистые мальформации с быстрым током жидкости: артериальные мальформации; артериовенозные мальформации, артериовеноз-

ные фистулы или комбинированные сосудистые мальформации (различные комбинации вышеизложенного).

Поэтому соединение формулы 1 очень эффективно при патологических состояниях или ситуациях, приводящих к (нео)васкуляризации, например, в соответствующих случаях опухолей или любых воспалительных процессах. Соединение формулы 1 очень эффективно для профилактики или лечения других видов рака и/или соответствующих метастазов, когда антиангиогенез или антиваскуляризация/неоваскуляризация или случаи вышеупомянутого ингибирования или снижения от (i) до (vii) имеют значение для, например, профилактики или лечения рака почки, такого как почечноклеточного рака (карциномы), колоректального рака, рака легких, рака мозга, в частности глиобластомы, рака яичников, множественных миелом, лимфом, воспалительных заболеваний, таких как, например, ревматоидный артрит, уменьшения образования рубцов при заживление ран (особенно в таких органах, как печень или сердце после острой или хронической травмы, или же на коже), сосудистых мальформаций, сосудистых или вазопролиферативных новообразований, эндотелиом, таких как гемангиомы (особенно в печени, мозгу и/или сердце), глазных заболеваний, таких как (диабетическая) ретинопатия, дегенерация желтого пятна, воспаление глаз, сердечно-сосудистых заболеваний, в частности высокого кровяного давления, стеноза или рестеноза кровеносных сосудов, например, вызванного артериосклерозом, в частности атеросклерозом, например, после повреждения и/или в ситуации ангиопластики или имплантации стента.

Кроме того, ингибитор ангиогенеза по настоящему изобретению может быть использован в качестве средства против ожирения, поскольку известно, что кровеносные сосуды в жировой ткани никогда в полной мере не развиваются и, таким образом, разрушаются ингибиторами ангиогенеза (Bruemmer D. Targeting Angiogenesis as Treatment for Obesity // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. - 2012. - 32 (2). - P. 161-162).

Кроме того, ингибитор ангиогенеза данного изобретения можно использовать в качестве активного вещества для лечения эндометриоза из-за связи между антиангиогенезом и положительным эффектом против эндометриоза.

Кроме того, соединение формулы 1 очень эффективно для лечения опухолей, таких как карциномы почек, которые часто развивают устойчивость к первоначальному противораковому лечению, что, таким образом, требует второй линии терапии, с использованием, например, ингибитора мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) или ингибиторов тирозинкиназы (TKI) второго поколения. Следовательно, соединение данного изобретения представляет собой альтернативу классической противораковой терапии после появления резистентности.

Более того изобретение предлагает комбинацию, заключающую в себе соединение формулы 1 или его предпочтительные структурные формы, указанные выше, и активное вещество, выбранное из группы, состоящей из антител, направленных против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) или растворимых VEGFR/VEGFR гибридов и ингибиторов тирозинкиназы (TKI). "Комбинация" обозначает зафиксированную комбинацию внутри обычной композиции или обычной лекарственной формы или раздельную, но ассоциированную комбинацию, например, в форме одновременно или последовательно вводимых композиций, соответственно содержащих соединение формулы 1 и упомянутые антитела или ингибиторы тирозинкиназы (TKI). Предпочтительные примеры указанных антител включают в себя моноклональные антитела против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) - "Бевацизумаб" (Avastin), и предпочтительные примеры ингибиторов тирозинкиназ (TKI) включают в себя препараты "Сунитиниб", "Довитиниб" (TKI258), "Иматиниб", "Сорафениб" и прочие ингибиторы тирозинкиназы (TKI), о которых подробнее сообщают Mukherji и др. (2013) и Heidegger и др. (2013), упомянутые выше.

Помимо того, соединение формулы 1 очень эффективно для лечения ангиогенеза, вызванного опухолью, в частности рака или соответствующих метастазов, например рака молочной железы, или рака предстательной железы, или соответствующих метастазов.

Неожиданно и отдельно от предшествующих исследований подобных соединений, связанных с ингибированием роста и метастазирования гормонально зависимых опухолевых клеток, в частности, в отношении рака молочной железы или рака предстательной железы (WO 2007/131736, WO 2007/131737), авторами изобретения было обнаружено, что соединения общей формулы 1, как охарактеризовано выше, ингибируют пролиферацию и/или миграцию человеческих эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток. При этом было неожиданно установлено, что соединения общей формулы 1, как охарактеризовано выше, уменьшают экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) в условиях воспаления и/или рака. Например, в случаях противоракового лечения и опять же независимо и отдельно от лечения, включающего в себя ингибирование роста и метастазирования гормонально зависимых опухолевых клеток, как это было в случае, например, в связи с раком молочной железы или раком предстательной железы (WO 2007/131736, WO 2007/131737), открытия в настоящем изобретении позволяют использовать антиангиогенную терапию в соответствующих новых медицинских схемах лечения. Например, в отличие от прямого разрушения злокачественных клеток и тканей-мишеней, ингибирование ангиогенеза, согласно настоящему изобретению, позволяет эф-

фективно ингибировать дальнейший рост опухоли и васкуляризацию опухоли посредством антиангиогенеза и/или посредством эффектов ингибирования или снижения (i)-(vii), указанных выше. Таким образом, можно влиять на средства, которыми опухоли могут питать себя и, таким образом, с помощью которых метастазирование может быть прервано, что в конечном итоге приведет к голоданию опухоли и, соответственно, к непрямой противоопухолевой активности. Например, лечение таких гормонально зависимых раковых заболеваний и метастазов, как рак молочной железы или рак предстательной железы, может быть осуществлено путем ингибирования ангиогенеза, вызванным такой опухолью.

Кроме того, отдельно от только лишь общих анаболических эффектов, таких как стабилизация коллагена и в некоторых случаях других соединительнотканных белков, и вследствие этого, принимая во внимание стабилизацию соединительной ткани и связанного лечения наподобие инфаркта миокарда и инфаркта головного мозга, артериосклероза, непроизвольного мочеиспускания и т.п. (WO 2009/062683), опять же открытия настоящего изобретения позволяют использовать антиангиогенную терапию в соответствующих новых медицинских схемах лечения.

В целом относительно к терапевтическому применению новые медицинские схемы лечения характеризуются различиями в отношении, например, группы пациентов, сроков (например, решений, когда и где начинать лечение), дозировки и комбинации с другим лечением.

Без привязки к какой-либо теории предполагается, что это связано со снижением экспрессии, например фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и/или рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), и/или других факторов роста или рецепторов факторов роста, причастных к процессу пролиферации, раковым и воспалительным процессам, например, в клетках воспаленной и/или раковой ткани, упомянутой выше, например в любой эпителиальной клетке, образующей вышеупомянутый орган и/или вышеупомянутую опухоль, или в клетках стромы, таким образом, косвенно оказывая антиангиогенное действие на клетки сосудов, или из-за снижения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), и/или рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), и/или других факторов роста или рецепторов фактора роста, причастных к процессу пролиферации, раковым и/или воспалительным процессам в эндотелиальных и/или гладкомышечных клетках. Таким образом, настоящее изобретение предлагает соединение для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией и/или миграцией эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток, например, для упомянутых выше заболеваний.

Исходя из этих поразительных открытий в настоящем изобретении соединение формулы 1 достоверно эффективно в терапевтических схемах лечения, в которых задействованы функционально связанные факторы роста, в частности рецепторы фактора роста фибробластов 13 (FGFR 13), рецепторы фактора роста тромбоцитов (PDGFR) α и/или β и рецепторы фактора роста тучных/стволовых клеток (SCFR, также известный как c-Kit, или рецептор тирозинкиназы Kit, или CD117).

Этот ингибирующий эффект можно использовать в различных аспектах.

1. Неоваскуляризация, вызванная опухолью, может быть эффективно ингибирована.

2. Неоваскуляризация внутрь воспаленной ткани может быть ингибирована.

3. Аномальная пролиферация эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток сама по себе может быть ингибирована, поскольку это может быть патологическое изменение в эндотелиомах или сосудистых мальформациях.

При использовании вышеуказанные соединения могут быть назначены пациенту в количестве, подходящем для ингибирования пролиферации и/или миграции эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток.

Помимо того, использование может быть предопределено соответствующим условием применения, таким как тип пациента, или тип целевого места или органа или фармацевтической композиции или состава, способных доставить вышеупомянутые функции/активности in vivo в назначенное конечное целевое место или орган внутри пациента.

Помимо того, вышеупомянутое соединение можно назначить местно и/или нанести на слизистую оболочку, например, в виде мази, крема, лосьона, геля, аэрозоля, порошка, масла или трансдермального пластыря, также включая депонированные лекарственные формы (в том числе пеллеты). Его можно вводить парентерально, например внутримышечно или путем внутривенной или подкожной инъекции или капельного вливания, или интраназально путем инстилляции в полости (например, мочевого пузыря, живота, кишечника), и/или перорально, например в форме таблеток, капсул, таблеток с сахарным или пленочным покрытием, жидких растворов или суспензий, или ректально, например в виде суппозиториев, или интраокулярно, например в виде инъекций и в виде глазных капель.

Применяемое количество для ингибирования пролиферации и/или миграции эндотелиальных и/или гладкомышечных клеток может быть надлежаще/гибко подобрано, например, в зависимости от возраста, веса, состояния потребителя и формы назначения. Например, дозировка, принимаемая для перорального назначения взрослым людям, может составлять от примерно 1 до примерно 150-1000 мг на одно применение от 1 до 5 раз в день.

Соответственно указанные соединения могут быть включены в фармацевтические композиции, дополнительно содержащие фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество и/или разбавитель.

Для местного применения композиция может быть составлена путем включения, например, растительных масел и жиров, таких как миндальное растительное масло, арахисовое растительное масло, оливковое растительное масло, растительное масло персиковых косточек, касторовое растительное масло; растительных экстрактов; эфирных масел; помимо этого, растительных восков и синтетических и животных масел; жиров и восков, таких как стеариновая кислота и сложные эфиры стеариновой кислоты, лауриновая кислота и сложные эфиры лауриновой кислоты, сложные эфиры сорбитана, цетеариловый спирт; лецитин, спирты ланолина, каротин, ароматизаторы, одно- или многоатомные спирты, карбамид, поверхностно-активные вещества, такие как полоксамеры, твин эмульгаторы и т.п.; консерванты и красители; и т.д. Предпочтительна композиция в виде эмульсии "масло в воде" или "вода в масле".

Твердые лекарственные формы для перорального приема могут, например, содержать вместе с активным соединением разбавители, например лактозу, декстрозу, сахарозу, целлюлозу, кукурузный или картофельный крахмалы; смягчающие компоненты, например диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния или кальция и/или полиэтиленгликоли, полоксамеры, токоферилполиэтиленгликольсукцинат (TPGS); связывающие компоненты, например крахмалы, гуммиарабик, желатин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливинилпирролидон; дезагрегирующие агенты, например крахмал, альгиновую кислоту, альгинаты или натрия карбоксиметилкрахмал; шипучие соединения; красители, подсластители; увлажняющие компоненты, такие как лецитин, полисорбаты, лаурилсульфаты; и в общем нетоксичные и фармакологически неактивные вещества, используемые в фармацевтических композициях. Эти препараты могут быть произведены общеизвестными способами, например, путем смешивания, гранулирования, таблетирования, покрытия сахарной или пленочной оболочкой. Жидкие взвеси для перорального применения могут быть, например, сиропами, эмульсиями и суспензиями.

Сиропы могут содержать в качестве наполнителя, например, сахарозу или сахарозу с глицерином, и/или маннит, и/или сорбит.

Суспензии и эмульсии могут содержать в качестве наполнителя, например, природную камедь, агар, альгинат натрия, пектин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливиниловый спирт, полоксамеры или токоферилполиэтиленгликольсукцинат (TPGS).

Суспензии или растворы для внутримышечных инъекций могут содержать вместе с активным соединением фармацевтически приемлемый наполнитель, например стерильную воду, оливковое масло, этилолеат, гликоли, например пропиленгликоль и при необходимости подходящее количество лидокаина гидрохлорида.

Растворы для внутривенных или подкожных инъекций или капельных вливаний могут содержать в качестве наполнителя, например, стерильную воду или предпочтительно они могут быть в виде стерильных, водных, изотонических физиологических солевых растворов.

Суппозитории могут содержать вместе с активным соединением фармацевтически приемлемый наполнитель, например какао-масло, полиэтиленгликоль, поверхностно-активный полиоксиэтиленсорбитановый сложный эфир жирной кислоты или лецитин.

Содержание активного соединения подходящей композиции может составлять по меньшей мере 0,0001 мас.%, например от 0,0001 до 20 мас.%, предпочтительно от 0,6 до 10 мас.%, еще более предпочтительно 1-5 мас.% соединения, используемого согласно данному изобретению.

Если вещества примешивают, чтобы способствовать проникновению через кожу, то их содержание может составлять, например, когда используется гиалуронидаза, от 0,01 до 1 мас.%, предпочтительно 0,05-0,2 мас.%, при использовании диметил изосорбида или диметилсульфоксида (DMSO) от 1 до 25% мас.%, предпочтительно 5-10 мас.%, полоксамеров 0,5-30 мас.%, токоферилполиэтиленгликольсукцината (TPGS) 0,5-30 мас.%.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется описанием следующих примеров, которые, однако, предназначены только для пояснительных целей и не имеют ограничительного характера.

Подготовка и обработка эндотелиальных клеток пупочной вены человека.

Все эксперименты, описанные в следующих главах, выполнялись по меньшей мере в трех повторах, в основном с использованием двух разных количеств клеток и различного времени инкубации. Все эксперименты дополнительно выполнялись в нескольких повторах (одни [клетки] HUVEC в разных пассажах, а также разных приготовлениях).

Коротко говоря, эндотелиальные клетки пупочной вены человека (далее - HUVEC) были свежевыделенными из пуповины человека методами, известными в данной области, и использовались в экспериментах от пассажа p4 до пассажа p10 для предотвращения любых артефактов из-за изменений клеток in vitro.

Во всех экспериментах стероидное C-19 соединение 4-гидрокситестостерон (4-OHT) добавляли к клеткам в указанной концентрации в среде для роста эндотелиальных клеток EGM-2 (Lonza), чтобы избежать любых артефактов, возникающих из-за экзогенных факторов, содержащихся в среде. Все эксперименты проводились по меньшей мере три раза и показывали один и тот же шаблон ответа.

Идентичность, дифференциацию и долгосрочную стабильность экспрессии генов культивируемых HUVEC-клеток оценивали путем иммуноцитохимического окрашивания с помощью антител к фактору фон Виллебранда (vWF). Экспрессия фактора фон Виллебранда (vWF) высокоспецифична для эндотелиальных клеток. Устойчивость уровня экспрессии фактора фон Виллебранда (vWF) определялась количественно меж-

ду пассажами 1 и 10. Только незначительные изменения происходили на протяжении данных сроков исследования в течение периода культивирования и между разными исследованными партиями.

Примеры

Пример 1. Ингибирование пролиферации эндотелиальных клеток В качестве одного из методов для определения клеточной пролиферации эндотелиальных клеток млекопитающих исследования пролиферации проводились так, как описано ниже.

Для определения скорости пролиферации выполнялись анализы с водорастворимыми солями тетразолия (WST-1). Суть состоит в том, что в 96-луночный планшет высевали по 1000 HUVEC-клеток в лунку и подвергали воздействию указанных концентраций 4-гидрокситестостерона (также обозначенного лабораторным кодом "CR 1447") в течение 5 дней. Ингибирование пролиферации определяли количественно путем измерения ферментативного расщепления соли тетразолия WST-1 до формазана с помощью клеточных митохондриальных дегидрогеназ как показателя жизнеспособности клеток, где жизнеспособность для обработанных клеток выражалась в виде процента (%) от необработанных контролей, содержащих только растворитель в соответствующих концентрациях. Среднее значение от 3 независимых экспериментов, выполненных в трех повторах, показано на фиг. 1А.

Как показано на фиг. 1А, ингибирование роста 4-гидрокситестостероном при всех концентрациях 1, 2 и 5 мкМ оказалось очень значительным ($p<0,001$) во всех 3-х культурах HUVEC-клеток (t-тест) в сравнении с известным ингибитором фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) - TKI258 (препарат "Довитиниб") (0,2, 0,4 и 1,0 мкМ). Клетки выращивали и пересеивали в среде для роста эндотелиальных клеток (EGM) в течение 3 и 5 дней соответственно. Как далее показано на фиг. 1В, ингибирование роста с помощью CR 1447 в комбинации с TKI258 (в сравнении с каждым соединением отдельно) также очень значительно ($p<0,001$) во всех 3-х культурах HUVEC-клеток (t-тест).

Пример 2. Ингибирование миграции эндотелиальных клеток с использованием теста миграции клеток в системе "Трансвелл" (Transwell).

Предпосылкой ангиогенеза является способность клеток эндотелия мигрировать в ткань. Этот процесс наблюдается при заживлении ран, а также при росте опухоли. Эндотелиальные клетки мигрируют в ткань вдоль градиента [концентрации] факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Это поведение может быть изучено в in vitro модели миграции с использованием системы "Трансвелл", например, как наглядно отображено на фиг. 2А. В частности, фиг. 2А показывает типичную схему проведения теста в системе "Трансвелл" для мониторинга миграции клеток.

Для изучения миграции HUVEC-клеток с использованием системы "Трансвелл" с полиэтилентерефталатными [PET]-мембранами с порами размером 3 мкм (24 лунки без фибронектинового покрытия) HUVEC-клетки в разных количествах помещались в верхние камеры, тогда как аттрактант был помещен в нижние камеры. Количество клеток со стороны мембраны в месте локализации аттрактанта сравнивали с количеством клеток, видимых в контрольной системе (буферный контроль), а также с аттрактантом (фактором роста эндотелия сосудов - VEGF) в присутствии 4-гидрокситестостерона (4-OHT).

Фиг. 2В показывает типичную картину трех независимых экспериментов, в частности, с помощью теста в системе "Трансвелл" с использованием F1-связывающих мембран и пропидиум йодидного окрашивания мигрировавших HUVEC-клеток. Клетки высевали, как описано, и миграцию проводили в течение 48 ч, используя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) в качестве аттрактора в нижней камере. Фигуры представляют собой примеры из трех независимых экспериментов в сравнении с контролем ("Co"). Как можно увидеть, 4-гидрокситестостерон (4-OHT) значительно ингибирует миграцию клеток в мембране, что указывает на заметно уменьшенное количество мигрирующих клеток в образцах, подвергнутых обработке 4-гидрокситестостероном (код "CR").

Пример 3. Ингибирование миграции эндотелиальных клеток при помощи анализа заживления ран (царапин).

Другим методом изучения миграции клеток является анализ заживления ран (царапин). Этот метод моделирует процессы, происходящие в ходе заживления острой раны. При выделении факторов из области раны эндотелиальные клетки мигрируют в область царапины, что будет напоминать процесс заживления и закрытия раны путем васкуляризации и последующего образования рубца. Таким образом, HUVEC-клетки высевали в 12-луночный планшет и позволяли расти до слияния. Затем наносилась царапина, при этом удалялись клетки в зоне царапины. Клетки подвергали воздействию 10 мкМ 4-гидрокситестостерона (4-OHT), и миграция эндотелиальных клеток в область повреждения отслеживалась микроскопически, по расписанию от 2 до 48 ч, в зависимости от индивидуального плана эксперимента.

Типичная картина трех независимых экспериментов показана на фиг. 3, представляющей типичные результаты десяти независимых экспериментов с использованием разных концентраций и временных сроков исследований. Как показано, миграция эндотелиальных клеток эффективно ингибируется 4-гидрокситестостероном, как продемонстрировано в анализе заживления ран (царапин). Через 24 ч наблюдается явное уменьшение миграции клеток HUVEC в область повреждения под влиянием 4-гидрокситестостерона (CR 1447) по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Пример 4. Анализ миграции трубок.

После миграции в ткань царапины клетки HUVEC меняют свои ростовые характеристики и образуют микрососуды. Этот эффект можно оценить микроскопически.

Клетки HUVEC высевали на матригель (7 мг/мл). Клеточные суспензии, а также гели, содержащие 10 мкМ/л 4-гидрокситестостерона, добавлялись при посеве. Предусматривалось формирование точек ветвления во время адгезии на эту поверхность, имитирующую особенности базальной мембраны. Образование трубок анализировали микроскопически через 12 и 48 ч.

Типичная картина трех независимых экспериментов показана на фиг. 4. Следовательно, образование трубок эндотелиальных клеток человека (HUVEC) значительно ингибируется применением 4-гидрокситестостерона (образцы, обозначенные "CR", в нижнем ряду). Когда человеческие эндотелиальные клетки помещались на слой матригеля, точки ветвления, как один из маркеров образования трубки, ингибируются 4-гидрокситестостероном в сравнении с необработанными контрольными образцами (серые стрелки). Таким образом, 4-гидрокситестостерон заметно ингибировал ветвление клеток и в значительной степени нарушал линейные соединения "клетка-клетка" на геле, что указывало на значительное ингибирование (нео)васкуляризации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира в качестве ингибитора ангиогенеза.

2. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира по п.1 для терапии воспаления и/или рака путем ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток, миграции эндотелиальных клеток, фактора роста эндотелия сосудов, рецепторов фактора роста эндотелия сосудов, рецепторов фактора роста фибробластов 13 и/или рецепторов тромбоцитарного фактора роста α и/или β.

3. Применение по п.1 или 2, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют в качестве ингибитора, отдельно или в комбинации, неоваскуляризации при патологиях, включающих регенеративные процессы.

4. Применение по любому из предшествующих пунктов, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют для предотвращения или ингибирования васкуляризации при воспалительных состояниях.

5. Применение по п.4, где воспалительное состояние выбрано из группы, состоящей из артритов, воспалительных заболеваний кишечника, экзем и нейродермитов.

6. Применение по любому из пп.1-3, где 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир применяют для предотвращения или ингибирования васкуляризации, вызванной опухолью.

7. Применение по п.6, где васкуляризация вызвана раком молочной железы или раком предстательной железы.

8. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира для ингибирования неоваскуляризации в профилактике или лечении солидной опухоли или не солидной опухоли.

9. Применение по п.8, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака почек, колоректального рака, рака легких, рака мозга, рака яичников, рака поджелудочной железы и лимфомы, а также соответствующих метастазов, и не солидная опухоль представляет собой множественную миелому или соответствующий метастаз.

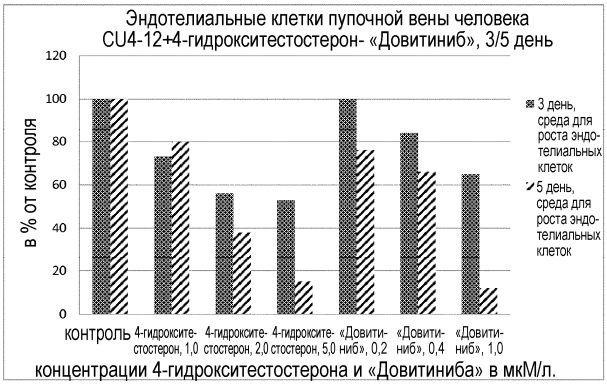
10. Применение 4-гидрокситестостерона, или его фармацевтически приемлемой соли, или сложного эфира для ингибирования неоваскуляризации в профилактике или лечении заболевания или состояния, выбранного из сосудистых или вазопролиферативных новообразований.

11. Применение по п.10, где сосудистые или вазопролиферативные новообразования выбраны из группы, состоящей из эндотелиомы, заживления раны и сосудистой мальформации.

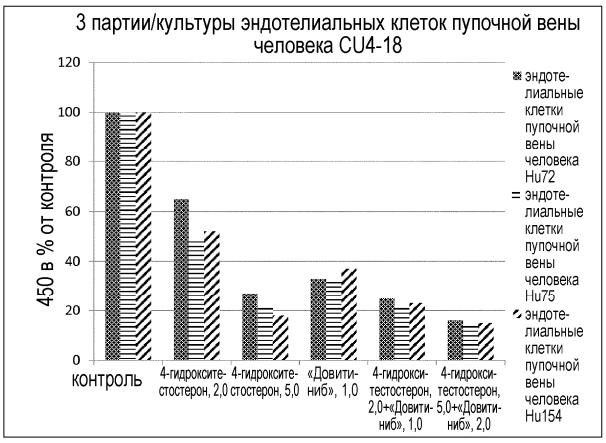
12. Применение по п.11, где сосудистая мальформация представляет собой гемангиому в коже или в паренхиматозных органах и эндотелиома представляет собой гемангиому.

13. Применение фармацевтической композиции, содержащей 4-гидрокситестостерон, или его фармацевтически приемлемую соль, или сложный эфир и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество для ингибирования неоваскуляризации.

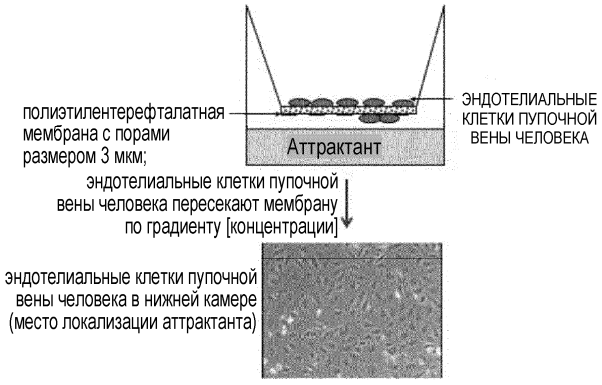
14. Применение по п.13, причем фармацевтическая композиция предназначена для введения на кожу, слизистую или подслизистую трансдермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, внутрикожного, перорального, интраназального, интраокулярного или суппозиторного введения или закапывания в полости.



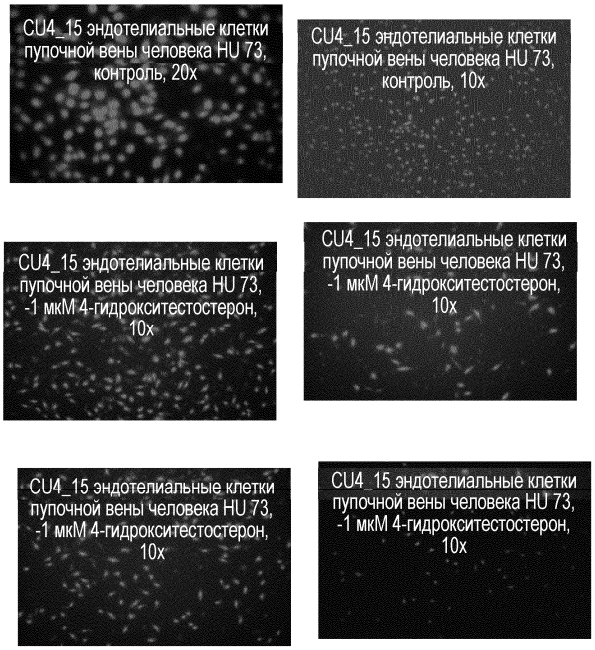
Фиг. 1А



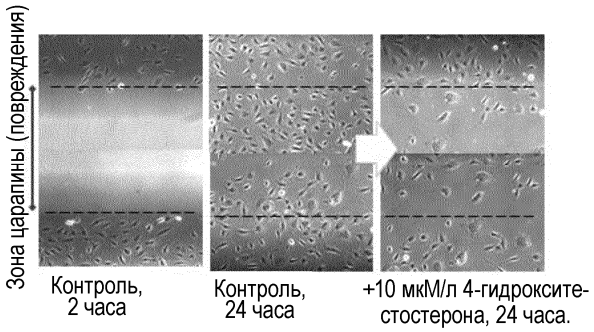
Фиг. 1В



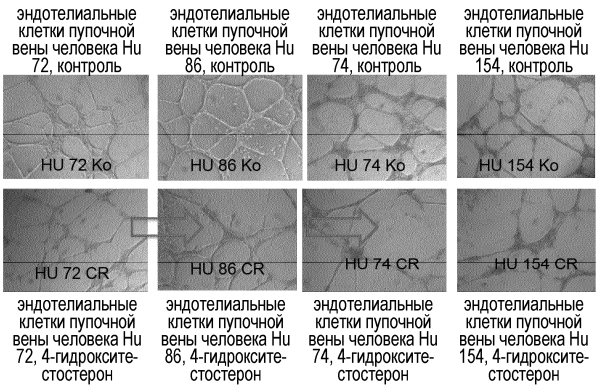
Фиг. 2А



Фиг. 2B



Фиг. 3



Фиг. 4

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