

Даний винахід стосується використання селективних антагоністів альфа-2В-адреноцепторів, придатних для виробництва фармацевтичного препарату, корисного для лікування чи профілактики хвороб, медійованих альфа-2В-адреноцепторів, у ссавців. Даний винахід також стосується способу лікування чи профілактики хвороб, медійованих альфа-2В-адреноцелторами, у ссавців, шляхом введення вказаному ссавцю вказаного селективного антагоніста альфа-2В-адреноцепторів.

Публікації та інші матеріали, що використовуються тут для ілюстрації відомого рівня техніки за винаходом і, зокрема, випадків, що розкривають додаткові деталі щодо практичного застосування, включені сюди за посиланням.

Селективні антагоністи альфа-2В-адреноцепторів, зображені на Схемі I нижче, є всі раніше відомими. Винахідники одержали сполуки А [замовлення №AE-848/34956037], С [замовлення №AF-399/36012031] та D [замовлення №AH-034/34347043] від фірми SPECS and BioSPECS B.V., Fleminglaan 16, 2289 CP Rijswijk, The Netherlands. Сполуки В [замовлення №653716] та Е [замовлення №569063] були надані фірмою ChemBridge Corporation, 16981 Via Tazon, Suite G, San Diego [CA 92127].

Відомо, що альфа-2В-адреноцептори медіують судинні контракції. Тому альфа-2В-антагоністи є придатними для лікування чи профілактики хвороб, пов'язаних із судинною контракцією. Було також знайдено, що у певних осіб існує генетичний поліморфізм у гені альфа-2В-адреноцептора. Було виявлено, що альфа-2В-адреноцепторний протеїн у деяких осіб має делецію 3 глутаматів з елементу повтору глутамової кислоти, що складається з 12 глутаматів (амінокислоти 297-309), у кислотному фрагменті секвенування з 17 амінокислот, розташованому в третій внутрішньоклітинній петлі рецепторного поліпептиду (Heinonen et al., 1999).

Було знайдено, що сполуки, обрані з групи, яка складається зі сполук А, В, С, D та Е, формули яких наведені на Схемі I, є селективними антагоністами альфа-2В-адреноцепторів.

Таким чином, даний винахід стосується використання селективного антагоніста альфа-2В-адреноцепторів для виробництва фармацевтичного препарату, придатного для лікування чи профілактики хвороби, медійованої альфа-2В-адреноцептором, у ссавця. Згідно з винаходом, вказаний антагоніст є сполукою, обраною з групи, що складається зі сполук А, В, С, D та Е, зображених на Схемі I, або фармацевтично прийнятною сіллю такої сполуки.

Винахід стосується також способу лікування чи профілактики хвороби, медійованої альфа-2В-адреноцептором, у ссавця, який включає введення вказаному ссавцю ефективної кількості селективного антагоніста альфа-2В-адреноцепторів, де вказаний антагоніст є сполукою, обраною з групи, що складається зі сполук А, В, С, D та Е, зображених на Схемі I, або фармацевтично прийнятною сіллю вказаної сполуки.

Антагоністи альфа-2В-адреноцепторів є корисними у лікуванні та/або профілактиці багатьох хвороб.

Особи, що мають делецію в протеїні альфа-2В-адреноцептора (Heinonen et al., 1999), особливо генотип делеція/делеція (генотип D/D), є важливою цільовою групою, для якої введення селективного антагоніста альфа-2В-адреноцелторів буде корисним.

Для відібраної із загального населення Фінляндії когорти чоловіків середнього віку при проведенні п'ятирічних досліджень з тривалим контролем було знайдено, що особи з D/D-генотипом гена альфа-2В-адреноцептора мають істотно збільшений ризик гострого інфаркту міокарда (ГІМ). Ризик ГІМ був збільшений для суб'єктів, у яких на початку дослідження не було раніше діагностованої коронарної хвороби серця (КХС). Тому був зроблений висновок про те, що D/D-генотип пов'язаний із порушеною здатністю знижувальної регуляції функції альфа-2В-адреноцепторів при постійній активації рецептора. Тому вважається, що альфа-2В-адреноцептори беруть участь у патогенезі значної частини усіх випадків ГІМ, особливо у суб'єктів з генотипом D/D, але також у I/D- та I/I-суб'єктів (I - від "інсерція" і позначає "нормальну" алель).

Антагоністи альфа-2В-адреноцепторів, розкриті в даному винаході, особливо корисні у лікуванні чи профілактиці коронарних хвороб серця. Як приклади, можна згадати:

а) Гострий ІМ

Якщо альфа-2В-адреноцептор-залежна вазоконстрикція є причинним фактором у деяких випадках ГІМ, то антагонізм цих рецепторів повинен відновляти коронарну циркуляцію і зменшувати ішемічні uszkodження міокарда.

б) Нестабільна стенокардія

Антагоніст альфа-2В-адреноцепторів буде зменшувати вазоконстрикторний компонент при тривалому ішемічному епізоді, тим самим полегшуючи симптоми та попереджуючи ГІМ.

в) Стенокардія Принцметала

У патогенезі стенокардії Принцметала вазоконстрикція є ключовим фактором, і антагоністи альфа-2В-адреноцепторів можуть припиняти та попереджати приступи.

г) Інші форми хронічної стенокардії та КХС

Антагоніст альфа-2В-адреноцепторів допоможе послабляти вазоконстрикторний компонент усіх типів КХС, забезпечуючи як полегшення симптомів, так і захист від ГІМ. Це буде пов'язане із загальним зниженням судинного тону за рахунок зниження венозного повернення крові, навантаження серця та споживання кисню (нітратоподібний ефект, див.нижче).

д) Профілактика рестенозу після коронарної ангіопластики у випадках, коли вазоконстрикція відіграє певну роль у рестенозі.

Крім того, антагоністи альфа-2В-адреноцептора, розкриті в даному винаході, будуть корисними для лікування чи профілактики есенціальної гіпертензії, особливо у осіб з підвищеною симпатичною активністю та гіпердинамічною циркуляторною системою.

У згаданих вище дослідженнях D/D варіант гена альфа-2В-адреноцептора не був чітко асоційований з кров'яним тиском. Винахідники вважають, що це було спричинено двома основними факторами: 1) антигіпертензивним курсом лікування, і 2) комплексною регуляцією системного кров'яного тиску. В іншому дослідженні [Heinonen et al.] було виявлено, що генотип D/D асоційований зі зниженням основним обміном речовин і зниженою частотою серцевих скорочень. Ці залежності, можливо, відображають підвищений судинний опір у цих осіб.

У трансгенних мишей із цільовою інактивацією гена альфа-2В-адреноцетора внутрішньовенно введені агоністи альфа-2В-адреноцеторів не індукують характерного підвищення кров'яного тиску, яке спостерігається у нормальних тварин, а також у людей після великих доз таких ліків [Link et al., 1996]. Гіпотензивний ефект таких ліків був помітно посиленним. Це демонструє, що альфа-2В-адреноцетори медіують судинну контракцію. Отже, антагоніст повинен зменшувати кровний тиск. Цей ефект не спостерігався для альфа-2В-неселективних антагоністів альфа-2В-адреноцетора, оскільки антагонізм альфа-2А-адреноцеторів збільшує симпатичний відтік, хвилинний об'єм серця та кров'яний тиск. У мишей з дисфункціональними альфа-2А-адреноцеторами агоністи альфа-2-адреноцеторів спричинювали істотну гіпертензивну відповідь, а не гіпотензію [MacMillan et al., 1996].

Було визначено, що антагоніст альфа-2В-адреноцеторів чинить сприятливий ефект на осіб з гіпертензією завдяки своїй дії на ниркову функцію, м'язовий кровотік та на судинний опір в інших судинних ложах. Анти-ГІМ дія такого лікарського засобу буде додатковою перевагою, оскільки гіпертензія є значним фактором ризику ГІМ. Цей захист спричинений трьома факторами: 1) зниженням системного кров'яного тиску, 2) зменшенням ризику коронарної вазоконстрикції, і 3) нітрабоподібним впливом на венозне повернення крові, навантаження міокарду та споживання кисню.

Крім того, антагоністи альфа-2В-адреноцеторів, розкриті в даному винаході, будуть корисними у лікуванні чи профілактиці інших судинних хвороб. Конкретніше, можна очікувати корисного впливу у лікуванні чи профілактиці:

- вазоконстрикції та гіпоксичного ушкодження мозку внаслідок субарахноїдального крововиливу,
- мігрені,
- хвороби Рейно та нестерпності до холоду,
- преекламсії,
- чоловічої еректильної дисфункції, і
- ожиріння та метаболічного синдрому.

Згаданий останнім ефект спричинений тим, що знижений м'язовий кровотік та зменшений основний обмін речовин роблять внесок у розвиток ожиріння та гіпертензії. Антагоніст альфа-2В-адреноцеторів за рахунок збільшення м'язового кровотоку буде підвищувати витрату енергії та зсувати калорійний баланс у сприятливому напрямку.

Антагоністи альфа-2В-адреноцеторів, розкриті в даному винаході, є також корисними у анестезії та аналгезії для потенціації клінічної ефективності агоністів альфа-2-адреноцеторів, не селективних щодо субтипу альфа-2В-адреноцеторів. За рахунок блокування вазоконстрикції, спричиненої цими агоністами, введення одночасно з ними антагоніст альфа-2В-адреноцеторів дозволяє використовувати більші дози вказаних агоністів аж до рівнів анестезуючих доз, які досі були неможливими у людей, і використовувались лише у практиці ветеринарної анестезії.

Експериментальний розділ

Здатність до зв'язування альфа-2-адреноцеторів людини

Спорідненість випробовуваних сполук до трьох субтипів  $\alpha_2$ -адреноцеторів людини ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_{2B}$  та  $\alpha_{2C}$ ) визначали шляхом проведення аналізів на конкурентне зв'язування з  $^3\text{H}$ -раувольсцином. Біологічний матеріал для цих експериментів складався з мембран клітин Shionogi S115, стабільно трансфектованих одним з трьох субтипів  $\alpha_2$  людини [Marjamaeki et al., 1992]. Мембрану (5-10мкг загального протеїну на зразок) та 1нМ-2нМ  $^3\text{H}$ -раувольсцину (питома активність 78Кі/ммоль) інкубують в 50мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,5, з 6 концентраціями сполук. Для кожної концентрації аналіз проводять з двома паралельними зразками. Неспецифічне зв'язування визначалося за допомогою 100мкМ оксиметозоліну і відповідало 5-15% від загального зв'язування. Після 30хв. при кімнатній температурі інкубацію припиняли швидким вакуумним фільтруванням крізь скловолоконний фільтр GF/B і промивали трьома порціями по 5мл охолодженого на льоді буфера для інкубування. Потім фільтри висушували, імпрегнували сцинтиляційним агентом і виміряли їх радіоактивність підрахунком сцинтиляції. Аналіз експериментів проводили шляхом нелінійної апроксимації методом найменших квадратів. Експериментально визначені значення  $\text{IC}_{50}$  переводили в Кі (константа інгібування) за допомогою рівняння Ченга-Пруссофа [Cheng and Prussoff, 1973]. експерименти повторювали мінімум три рази.

Таблиця 1-

Таблиця 1

Здатність до зв'язування  
із субтипами  $\alpha$ -адреноцеторів людини

Дані представлені як Кі в нМ (середнє  $\pm$  стандартна похибка), n=3, якщо не вказано інше

| Сполука | альфа-2А       | альфа-2В       | альфа-2С     |
|---------|----------------|----------------|--------------|
| А       | 4100 $\pm$ 200 | 30 $\pm$ 4     | >4700        |
| С       | >30000 (n=2)   | 1860 (n=2)     | >30000 (n=2) |
| D       | >30000         | 530 $\pm$ 90   | >30000       |
| B       | >30000         | 215 $\pm$ 60   | >30000       |
| E       | >100000        | 2900 $\pm$ 300 | >100000      |

Здатність до зв'язування коркових  $\alpha_1$ -адреноцеторів пацієнтів

Здатність до зв'язування  $\alpha_1$ -адреноцеторів неокортексу пацієнтів визначали шляхом проведення аналізу на конкурентне зв'язування з  $^3\text{H}$ -празосином. Біологічний матеріал для цих аналізів складався з мембран неокортексу пацієнтів. Суспензії мембран (100-200мкг загального протеїну на зразок) та 0,2нМ-0,25нМ  $^3\text{H}$ -

празосину (питома активність 74Кі/ммоль) інкубували з 6 концентраціями сполук у загальному об'ємі 0,25мл (50мМ Трис-НСІ, рН 7,7, при 25°C). Для кожної концентрації ставили два паралельні досліди. Неспецифічне зв'язування, визначене за допомогою 10мкМ фентоламіну метансульфонату, відповідало 25-30% від загального зв'язування. Після 30хв. при кімнатній температурі інкубування припиняли швидкою фільтрацією крізь скловолоконні пласкі фільтри GF/B і тричі промивали охолодженим на льоді 10мМ Трис (рН 7,7, при 4°C). Після висушування твердий сцинтиляційний агент розплавляли на пласкому фільтрі і їх радіоактивність вимірювали сцинтиляційним підрахунком.

#### Результат

При концентраціях до 30мкМ сполука А спричинювала недостатнє витіснення <sup>3</sup>Н-празосину, що не дозволяло оцінити значення IC50. Тому був зроблений висновок, що IC50 та Кі сполуки А повинні становити >30000нМ.

#### Антагоністична активність на субтипах α<sub>2</sub>-адреноцепторів людини

Антагоністична активність визначалась як здатність досліджуваних сполук конкурентно інгібувати епінефрин-стимульоване зв'язування <sup>35</sup>S-GTPγS з протеїнами G [Tian et al., 1993; Wieland and Jakobs, 1994; Jasper et al, 1998] в мембранах клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO), стабільно трансфектованих одним з трьох субтипів α<sub>2</sub> людини [Pohjanoksa et al., 1997; Marjamaki et al., 1998]. Мембрани (2-6мкг протеїну на зразок) та 12 концентрацій досліджуваної сполуки преінкубували протягом 30хв. з фіксованою концентрацією епінефрину (5мкМ для α<sub>2A</sub>, 15мкМ для α<sub>2B</sub>, 5мкМ для α<sub>2C</sub>) у 50мМ трис, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 150мМ NaCl, 1мМ DTT, 1мМ EDTA, 10мкМ GDP, 30мкМ аскорбінової кислоти, рН 7,4, при кімнатній температурі. Зв'язування радіомітки починали з додавання до інкубаційної суміші слідової кількості <sup>35</sup>S-GTPγS (0,08нМ-0,15нМ, питома активність 1250Кі/ммоль). Після ще 60хв. при кімнатній температурі інкубування припиняли швидким вакуумним фільтруванням крізь скловолоконний фільтр. Фільтри промивали три рази 5мл охолодженого на льоді буфера для промивання (20мМ трис, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 1мМ EDTA, рН 7,4 при кімнатній температурі), висушували і підраховували радіоактивність у сцинтиляційному лічильнику. Аналіз експерименту проводили шляхом нелійнійної апроксимації методом найменших квадратів. Експерименти повторювали щонайменше три рази.

Таблиця 2

#### Антагоністичний ефект сполуки А та сполуки В на α<sub>2</sub>-субтипах адреноцепторів людини

Дані представлені як KB в нМ (середнє ± стандартна похибка), n становить мінімум три експерименти

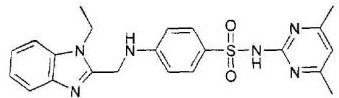
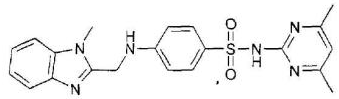
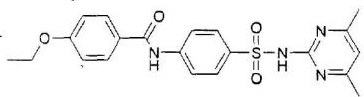
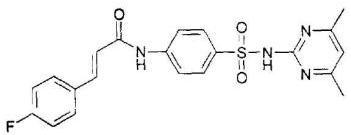
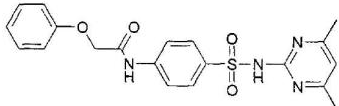
| Сполука | альфа-2A* | альфа-2B | альфа-2C* |
|---------|-----------|----------|-----------|
| А       | 2400±700  | 73±23    | 2400±900  |
| В       | >10000    | 250±80   | >10000    |

\*можна було одержати лише неповні криві доза-відклик, значення KB є мінімальними оцінками

В цілях винаходу, зображений на схемі I антагоніст альфа-2В-адреноцепторів або його фармацевтично прийнятна сіль можуть бути введені різними шляхами. Придатні для введення форми включають, наприклад, композиції для перорального введення; парентеральні ін'єкції, включаючи внутрішньовенні, внутрішньом'язові, інтрадермальні та підшкірні ін'єкції; форми для трансдермального чи ректального введення. Потрібна доза сполук антагоністів альфа-2В-адреноцепторів буде змінюватись у залежності від конкретного стану лікування якого проводиться тяжкості стану, тривалості лікування, шляху введення та від того, яка саме сполука використовується. Придатні дози змінюються в інтервалі від 5мкг до мг на кг ваги тіла в день для дорослої особи.

Слід розуміти, що методи даного винаходу можуть бути здійснені у вигляді різноманітних варіантів втілення, з яких тут розкрито лише кілька. Фахівцю в цій галузі буде зрозуміло, що існують інші варіанти втілення, що не виходять за межі суті винаходу. Отже, описані варіанти втілення є ілюстративними і не повинні вважатись обмежувальними.

#### Схема I

| Сполука  |
|--|
| <p>A</p>  |
| <p>B</p>  |
| <p>C</p>  |
| <p>D</p>  |
| <p>E</p>  |

#### Перелік літератури

- Cheng, Y., and Prusoff, W.H., 1973, *Biochem. Pharmacol.*, 22: 3099.
- Jasper, J.R., Lesnick, J.D., Chang, L.K., Yamanashi, S.S., Chang, T.C., Hsu, S.A.O., Daunt, D.A., Bonhaus, D.W., and Egen, R.M., 1998, *Biochem. Pharmacol.*, 55: 1035.
- Marjamäki, A., Ala-Uotila, S., Luomala, K., Perälä, M., Jansson, C., Jalkanen, M., Regan, J.W., and Scheinin, M., 1992, *Biochem. Biophys. Acta*, 1134: 169.
- Marjamäki, A., Pihlavisto, M., Cockcroft, V., Heinonen, P., Savola, J.-M., and Scheinin, M., 1998, *Mol. Pharmacol.*, 53: 370.
- Pohjanoksa, K., Jansson, C.C., Luomala, K., Marjamäki, A., Savola, J.-M., and Scheinin, M., 1997, *Eur. J. Pharmacol.*, 35: 53.
- Tian, W.-N., Duzic, E., Lanier, S.M., and Deth, R.C., 1993, *Mol. Pharmacol.*, 45: 524.
- Wieland, T., and Jakobs, K.H., 1994, *Meth. Enzymol.*, 237: 3.
- Heinonen et al. 1999, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84:2429.
- Link R. E. et al., 1996, *Science*, 273:803.
- MacMillan L. B. et al., 1996, *Science*, 273:801.