

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 263**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/138** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2018 PCT/EP2018/071220**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2019 WO19030151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2018 E 18752134 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3664788**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de la enfermedad de von Hippel-Lindau**

30 Prioridad:

**07.08.2017 ES 201731019**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.09.2023**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS M.P. (50.0%)**

**Serrano, 117**

**28006 Madrid, ES y**

**ALIANZA ESPAÑOLA DE FAMILIAS DE VON  
HIPPEL-LINDAU -VHL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOTELLA CUBELLS, LUISA MARÍA;**

**ALBIÑANA DÍAZ, VIRGINIA y**

**VILLAR GOMEZ-DE LAS HERAS, KARINA**

74 Agente/Representante:

**MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 949 263 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de la enfermedad de von Hippel-Lindau

### 5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la terapéutica y la prevención, más específicamente al tratamiento y la prevención de la enfermedad de von Hippel-Lindau.

### 10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL) es un tipo raro de cáncer con una incidencia de 1-por-36.000 individuos en la población general. VHL es un trastorno genético autosómico predominantemente hereditario. La enfermedad se describió primero por separado por von Hippel en 1911 y por Lindau en 1926.

15 Las manifestaciones clínicas incluyen múltiples tumores benignos y malignos que aparecen a lo largo de la vida del paciente: hemangioblastoma retiniano, hemangioblastoma del SNC, carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), feocromocitoma, tumor de islotes pancreáticos, tumores del saco endolinfático y quistes en testículos y ligamento ancho.

20 Las células tumorales de VHL han perdido la función de proteína de von Hippel-Lindau, que conduce a una expresión constitutiva del factor inducible por hipoxia (HIF), incluso en condiciones normóxicas.

25 El HIF es responsable de la activación de genes implicados en la angiogénesis, el metabolismo y la apoptosis que promueven la adaptación y la supervivencia bajo condiciones de bajo O<sub>2</sub> (hipoxia), tales como podrían encontrarse en los tejidos isquémicos y en la mayoría de los tumores sólidos.

30 En normoxia, la degradación rápida del HIF se controla mediante unión pVHL a residuos hidroxilados del HIF- $\alpha$ . En condiciones hipóxicas, el PHD no puede hidroxilar las subunidades de HIF $\alpha$  que luego escapan la proteólisis mediada por ubiquitina, lo que permite que el HIF $\alpha$  se acumule, se transloca al núcleo y se une a HIF $\beta$ . Este heterodímero es capaz de unirse a secuencias de ADN específicas (“elementos sensibles a hipoxia” o HRE - Hypoxia Responsive Elements) para activar la transcripción de más de 200 genes diana. Los genes principales regulados por pVHL están implicados en el desarrollo tumoral, angiogénesis (factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF] y factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF]), proliferación o supervivencia celular (factor de crecimiento transformante [TGF $\alpha$ ]), regulación de la captación y metabolismo de glucosa (transportador de glucosa Glu-1) y eritropoyesis (EPO). Otros genes diana relevantes para la biología tumoral están implicados en la formación de la matriz extracelular (metaloproteinasa de matriz 1 [MMP1]), quimiotaxis (factor derivado de células estromales 1 [SDF1] y su receptor de quimiocinas CXC 4 [CXCR4], receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR], receptor del factor de crecimiento de hepatocitos [HGFR codificado por MET]), regulación de pH (anhidrasas carbónicas IX y XII [CA9 y CA12]), y ciclo celular (ciclina D1 [CCND1]).

40 Hasta ahora, las opciones terapéuticas para pacientes con VHL se derivan de cirugía. La terapia sistémica usada para cánceres metastásicos ha mostrado una respuesta limitada en los tumores pancreático y renal de VHL, mientras que los tumores del SNC no responden en absoluto.

45 La Alianza Española de VHL llevó a cabo un ensayo clínico con 7 pacientes de VHL durante 12 meses, de diciembre de 2014 hasta abril de 2016. Los pacientes fueron tratados para los hemangioblastomas de la retina con 120 mg de propranolol al día (una dosis subóptima, para muchos pacientes bajo 2 mg/Kg de peso corporal/día). Como resultado, los tumores no crecieron en ningún caso durante el ensayo clínico y en algunos casos se incrementó la agudeza visual. Más interesante, en 2 casos con exudados de los hemangioblastomas, estos desaparecieron completamente entre 3 y 6 meses de tratamiento. La presión arterial baja se registró como un efecto secundario (Albiñana y col., 2017), por lo que la falta de terapias para la enfermedad recurrente significa que existe un requisito urgente de fármacos efectivos con efectos secundarios reducidos para pacientes con VHL, especialmente aquellos que detienen la progresión de los tumores y retrasan el tratamiento quirúrgico.

### 55 **Breve descripción de la invención**

60 Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que ICI 118.551 disminuye la viabilidad de las células de hemangioblastoma de los pacientes con VHL (Figuras 1 y 2) e inhibe la formación de hemangioesfera de pacientes con VHL (Figura 3). Además, los inventores han demostrado que ICI 118.551 inhibe la migración celular y la angiogénesis de células endoteliales (Figuras 3 y 4) y que inhibe la actividad de HIF inducida por hipoxia.

65 Por lo tanto, la invención se refiere a un antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de von Hippel-Lindau, como se define en las reivindicaciones.

### **Descripción detallada de las figuras**

**Figura 1. ICI 118.551 y Propranolol disminuyen la viabilidad de las células de hemangioblastoma de los pacientes con VHL.** El Propranolol, (P) es un beta-bloqueador no selectivo que se une a los receptores adrenérgicos beta 1 y 2. ICI 118.551 (I), es un beta-bloqueador selectivo que se une solo al receptor beta 2. Ambos beta-bloqueadores actúan disminuyendo la viabilidad de los cultivos de células primarias de hemangioblastoma hasta el 40 % -50 % a 100  $\mu$ M durante 72 horas. La Figura 1 muestra la disminución de la viabilidad en el cultivo celular primario HB11cib. Los resultados son representativos de 8 cultivos de células primarias de hemangioblastoma tratados de la misma manera. Cada medida proviene de triplicados y se cuantifica mediante un kit luminiscente que detecta ATP (Cell titer Glo, de Promega).

**Figura 2. ICI 118.551 actúa como propranolol disminuyendo la viabilidad en células de hemangioblastoma de VHL. A.** Cultivo primario de células de hemangioblastoma (muestra de paciente HB18), sin (Control) y después de 4 días de tratamiento con ICI 118.551 a 50 y 100  $\mu$ M. Después del tratamiento con ICI 118.551 100  $\mu$ M podemos ver espacios vacíos en la placa, en comparación con el control, que es confluyente después de 4 días de cultivo, comenzando con el mismo número de células. **B** Comparación del tratamiento de 4 días con Propranolol (P) e ICI 118.551 (I) a la misma concentración 100  $\mu$ M de cultivo primario de células de hemangioblastoma (muestra de paciente HB4).

**Figura 3. El tratamiento ICI 118.551 induce la apoptosis celular estimulando genes proapoptóticos BAX y Caspasa 9 A.** Niveles relativos de expresión de ARNm de BAX y CASP9 (genes implicados en la apoptosis) detectados por RT-qPCR en cultivo de células de hemangioblastoma HB26, después de 72 h de ICI 118.551 (I) 100  $\mu$ M. **B** Niveles de expresión de ARNm relativos de Bax y Casp9 (genes implicados en la apoptosis) detectados por RT-qPCR en el cultivo de células de hemangioblastoma HB11, después de 72 h de ICI 118.551 de 100  $\mu$ M. Ambos genes, Bax y Casp 9 aumentan después del tratamiento con ICI 118.551, por lo tanto, ICI 118.551 induce apoptosis en estas células.

**Figura 4. El Propranolol y ICI 118.551 son agentes antitumorales, inhibiendo la formación de hemangioesfera de células de pacientes de VHL. A.** Estructuras de tipo esfera redonda con un borde bien definido aparecen como agregados de los tumores de células VHL. Se usaron dos hemangioblastomas diferentes para estos experimentos HB2 y HB3. Sin embargo, cuando las células se cultivan durante 7 días en presencia de 100  $\mu$ M de cualquiera de Propranolol (P) o ICI 118.551 (I), las esferas aparecen disgregadas y los grupos observados son irregulares con pocas células. Se tomaron fotografías el último día de tratamiento **B**. Lo mismo que en el panel A pero con otros dos hemangioblastomas de pacientes con VHL. **C**. Lo mismo que en los paneles A y B pero con HB23 de un paciente VHL.

**Figura 5. ICI 118.551 y propranolol inhiben la migración celular de células endoteliales. A.** Pruebas funcionales *in vitro* para la angiogénesis incluyen “herida-cicatrización” o placa-arañazo, para seguir la capacidad de migración de las células endoteliales después de tiempos cortos. Cuando se altera una monocapa confluyente con la punta de una micropipeta para crear una discontinuidad, las células endoteliales normalmente migran para cubrir la discontinuidad “herida-curación” en un corto tiempo, dependiendo del tamaño de la “herida” pero normalmente, menos de 8 horas. Esta prueba mide la migración tomando imágenes en diferentes momentos desde el momento en que se crea la herida. Solo se muestra la imagen final después de 6 horas. La distancia migrada se cuantifica, y en el siguiente gráfico se muestra la evolución. ICI 118.551 y propranolol retrasan la migración celular, por lo que son antiangiogénicos. **B**. La distancia migrada por células no tratadas y tratadas con propranolol/ICI 118.551 después de 6 horas de hacer un arañazo en la capa confluyente de HUVEC (Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana).

**Figura 6. ICI 118.551 y propranolol inhiben la angiogénesis celular de células endoteliales.** La tuberculosis es otra prueba *in vitro* para la angiogénesis. Las células endoteliales cultivadas en matrigel tienen la propiedad de construcción de estructuras similares a un tubo de construcción, que imitan la estructura de “vasos”. **A**. Propranolol y ICI 118.551 a 100  $\mu$ M inhiben significativamente la tubulogénesis. **B**. El número de células cerradas (red de densidad) se cuantifica y se promedia de 5 campos diferentes en cada caso. Los histogramas de barras representan la media  $\pm$  DE.

**Figura 7. Propranolol e ICI 118.551 inhiben la estimulación mediada por HIF.** Los histogramas de barras muestran la actividad relativa de luciferasa dependiendo de HIF-1 (hipoxia) en transfectantes estables de células HeLa para el indicador HRE9x-luc, que contiene 9 repeticiones en tándem del elemento de secuencia sensible a hipoxia unido por HIF-1 fusionado con proteína indicadora de luciferasa. Ct significa células control (normoxia e hipoxia). Deferxamina (DFO) a 100  $\mu$ M produce hipoxia química en las células tratadas. El tratamiento con Propranolol o con ICI 118.551 a 50 o 100  $\mu$ Molar (P50, P100, I50, I100, respectivamente, durante 24 h), inhibe la estimulación de hipoxia inducida por DFO. Sorprendentemente, el efecto de ICI 118.551 es claramente superior al propranolol a una dosis igual. Tanto el DFO como el tratamiento farmacológico se administraron simultáneamente.

**Figura 8. El Propranolol y el ICI 118.551 regulan negativamente la transcripción dependiente de HIF significativamente en células HeLa pero no Atenolol.** Los ensayos de luciferasa se realizaron en células HeLa transfectadas de manera estable HRE-luc en condiciones hipóxicas y tratamiento con Propranolol, atenolol e ICI118.551. El Propranolol e ICI (100  $\mu$ M) evitó la estimulación de hipoxia en células HeLa, como se muestra por la

disminución en la actividad de luciferasa, al inhibir la activación de los elementos de hipoxia (HRE) por HIF. Los resultados del atenolol fueron menos significativos que los otros (Propranolol e ICI).

**Figura 9. ICI-118551 muestra actividad específica antitumoral en células VHL-/-.** Viabilidad (contenido de ATP) de varias células (cultivo primario y líneas) expuestas a diferentes concentraciones mM de ICI-118551 o Propranolol, durante 72 horas. Los pocillos de control no contenían ICI-118551 o Propranolol. ICI-118551 (un antagonista beta-adrenérgico específico tipo 2) y propranolol (un receptor beta-adrenérgico no específico tipo 1 y 2 antagonista) disminuyen, de una manera dependiente de la dosis y con especificidad más alta, la viabilidad de las células VHL-/- . Se midió el contenido de ATP usando el ensayo CellTiter-Glo® de Promega. A: Línea celular HUVEC, B: Línea celular HMEC, C: Cultivo primario de Hemangioblastoma 18, D: Cultivo primario de Hemangioblastoma 14, E: ccRCC *Vhl* -/- línea celular 786-O. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  EEM (n = 3).

**Figura 10. Xenoinjertos de 786-O *Vhl* -/- células ccRCC humanas en ratones.** Se inyectaron ratones NOD scid gamma (NSG) de 7-8 semanas de edad en el flanco dorsal con una suspensión celular única de  $10^6$  células 786-O. Cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen de 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, de 9/10 ratones cada uno. Dos grupos se trataron diariamente por vía intraperitoneal con el cuerpo de 10 mg/Kg propranolol o ICI-118.551, respectivamente, y se inyectó un tercer grupo con el disolvente. El tamaño del tumor se midió mediante un calibrador cada 2-3 días y los volúmenes se calcularon siguiendo la fórmula: más corto<sup>2</sup> x más largo x 0,52. Los ratones se sacrificaron cuando el promedio del volumen tumoral del grupo de control alcanzó un punto final establecido en base a los procedimientos éticos. La flecha marca el comienzo del tratamiento.

**Figura 11. ICI 118.551 afecta diferencialmente células *Vhl* -/- y células endoteliales normales HUVEC y HMEC.** Cultivo primario de Haemangioblastoma de VHL, HUVEC endoteliales primarias normales y la línea celular microendotelial no tumoral HMEC-1 se cultivaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ICI 118.551 (50-250  $\mu$ M) para medir la viabilidad. En concordancia a las curvas de viabilidad, las células de Haemangioblastoma (HB) muestran solo un 20 % de viabilidad a 100  $\mu$ M, mientras que células no tumorales HUVEC o HMEC-1 muestran un 80 % y un 55 % respectivamente de disminución en la viabilidad a 100  $\mu$ M

#### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de von Hippel-Lindau.

El término “receptor  $\beta_2$ -adrenérgico” o “ $\beta_2$ AR”, como se usa en esta invención, se refiere a una clase A de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que responde a hormonas y neurotransmisores difusibles y reside predominantemente en músculos lisos. Hay dos grupos principales de receptores adrenérgicos,  $\alpha$  y  $\beta$ , con varios subtipos:

-  $\alpha$  receptores tienen los subtipos  $\alpha_1$  (un receptor  $G_q$  acoplado) y  $\alpha_2$  (un receptor  $G_i$  acoplado).

-  $\beta$  receptores tienen los subtipos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Los tres están vinculados a proteínas  $G_s$ , que a su vez están unidas a adenilato ciclasa. La unión agonista a estos receptores provoca un aumento en la concentración intracelular del segundo mensajero cAMP.

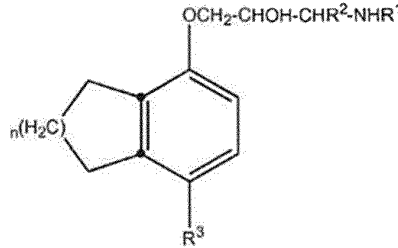
Agonista uniéndose al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico da como resultado una relajación del músculo liso.

El término “receptor antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico”, como se usa en esta invención, se refiere a un compuesto que une un receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y carece de cualquier capacidad sustancial para activar el propio receptor. El término “receptor antagonista  $\beta_2$ -adrenérgico” incluye tanto antagonistas neutros como agonistas inversos. Un “antagonista neutro” es un compuesto que bloquea la acción del agonista pero no tiene efecto sobre la actividad intrínseca o espontánea del receptor. Un “agonista inverso” es capaz de bloquear la acción del agonista en el receptor y atenuar la actividad constitutiva del receptor. El término “antagonista” también incluye antagonistas competitivos, que son fármacos que se unen al mismo sitio que el ligando natural; antagonistas no competitivos que se unen a un sitio diferente en el receptor que el ligando natural; antagonistas reversibles que se unen y desunen al receptor a velocidades determinadas por la cinética del receptor-ligando; y antagonistas irreversibles que se unen permanentemente al receptor mediante la formación de un enlace covalente con el sitio activo o simplemente mediante la unión de manera tan estricta que la tasa de disociación sea efectivamente cero.

El término “receptor antagonista selectivo  $\beta_2$ -adrenérgico”, como se usa en esta invención, significa un antagonista que es selectivo para receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos sobre receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. En una realización particular, un receptor antagonista selectivo  $\beta_2$ -adrenérgico exhibe una potencia al menos 10 veces mayor en la unión a  $\beta_2$ - que a los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, es decir, tiene una relación de selectividad  $\beta_2/\beta_1$  de al menos 10. Más preferiblemente, el receptor antagonista selectivo  $\beta_2$  tendrá una relación de selectividad  $\beta_2/\beta_1$  de al menos 50. La afinidad de diversos agentes activos para receptores  $\beta_2$ - y  $\beta_1$ - adrenérgicos se pueden determinar evaluando los tejidos que contienen una mayoría de receptores  $\beta_2$  (p. ej., procedimiento ciliar de conejo, hígado de rata, plexo de coroides de gato o pulmón), tejidos que contienen una mayoría de receptores  $\beta_1$  (por ejemplo, corazón de gato y cobaya), y tejidos que contienen

una mezcla (por ejemplo, tráquea de cobaya). Los procedimientos para determinar la selectividad de unión relativa para estos diferentes tipos de tejidos se describen ampliamente en O'Donnell y Wanstall, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmaco., 308,183-190 (1979), Nathanson, Science. 204, 843-844 (1979), Nathanson, Life Sciences, 26, 1793-1799 (1980), Minneman y col., Mol.Pharmacol., 15, 21-33 (1979a), y Minneman y col., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 211, 502-508 (1979).

El antagonista del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico selectivo es el derivado de alcanolamina de fórmula I



Fórmula I

en donde  $R^1$  es un grupo alquilo de hasta 6 átomos de carbono que está ramificado en el átomo de  $\alpha$ -carbono,

en donde  $R^2$  es un alquilo de hasta 3 átomos de carbono,

en donde  $R^3$  es hidrógeno, un halógeno o un alquilo de hasta tres átomos de carbono y en donde n es 1 o 2,

o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

El término "grupo alquilo", como se usa en esta invención, se refiere a grupos acíclicos lineales y ramificados derivables de alcanos, y que tienen la fórmula  $-C_nH_{2n+1}$  mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno.

El término "halógeno", como se usa en esta invención, se refiere a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

$R^1$  puede ser, por ejemplo, isopropilo o t-butilo. En una realización particular,  $R^1$  es isopropilo.

$R^2$  puede ser, por ejemplo, metilo o etilo. En una realización particular,  $R^2$  es metilo.

$R^3$  puede ser, por ejemplo, hidrógeno, cloro, bromo, metilo o etilo. En una realización particular,  $R^3$  es metilo.

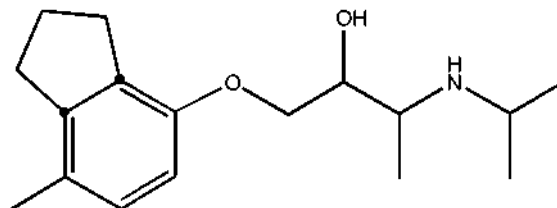
En una realización particular n es 1.

En una realización particular,  $R^1$  es isopropilo y  $R^2$  es metilo. En una realización particular,  $R^1$  es isopropilo y  $R^3$  es metilo. En una realización particular,  $R^1$  es isopropilo y n es 1. En una realización particular,  $R^2$  es metilo y  $R^3$  es metilo. En una realización particular,  $R^2$  es metilo y n es 1. En una realización particular,  $R^3$  es metilo y n es 1.

En una realización particular,  $R^1$  es isopropilo y  $R^2$  y  $R^3$  son metilo. En otra realización particular,  $R^1$  es isopropilo,  $R^2$  es metilo y n es 1. En otra realización particular,  $R^1$  es isopropilo,  $R^3$  es metilo y n es 1. En una realización particular,  $R^2$  y  $R^3$  son metilo y n es 1.

En una realización más particular,  $R^1$  es isopropilo,  $R^2$  y/o  $R^3$  son metilo y n es 1.

En una realización aún más particular, el derivado de alcanolamina tiene la fórmula II:



Fórmula II

Este compuesto de fórmula II también se conoce como ICI 118.551 y su nombre químico es eritro-D,L-1(metilinden-4-iloxi) -3-isopropilaminobutan-2-ol. ICI 118.551 tiene una relación de selectividad  $\beta_2 / \beta_1$  de al menos 50, determinada e indicada en Life Sciences, 27.671 (1980) y Bilsky y col., J.Cardiovasc.Pharmacol., 5, 430-437 (1983).

Se observará que el derivado de alcanolamina de fórmula I posee dos átomos de carbono asimétricos, concretamente aquellos del grupo -CHOH- y el grupo -CHR 2-, y que, por lo tanto, puede existir en dos formas diastereoisoméricas racémicas, las formas *treo* y *eritro* y cuatro formas ópticamente activas, que son los isómeros (+) y (-) de cada una de las formas racémicas. Debe entenderse que esta invención abarca cualquiera de estas formas isoméricas que poseen una actividad antagonista selectiva del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico como se definió anteriormente, es una cuestión del conocimiento general común de cómo cualquier isómero particular puede aislarse y cómo cualquier actividad de bloqueo del receptor selectivo  $\beta_2$ -adrenérgico que se pueda tener se puede medir.

Debe entenderse que en general un isómero óptico que tiene la configuración absoluta (S) del grupo -CHOH es más activo como un agente de bloqueo  $\beta_2$  adrenérgico que el isómero correspondiente que tiene la configuración absoluta (R). También se conoce que en general el *isómero eritro* es más  $\beta_2$ -selectivo que el correspondiente *threo-isómero*, pero que ambos *threo* y *eritro* isómeros de los compuestos de la presente invención poseen la selectividad requerida.

La expresión “sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sal de adición de ácido, que, tras la administración al receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto como se describe en esta invención. Preferiblemente, como se usa en esta invención, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” significa aprobada por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. La preparación de sales se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos ilustrativos de sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del derivado de alcanolamina de fórmula I es, por ejemplo, una sal derivada de un ácido inorgánico, por ejemplo, un clorhidrato, bromhidrato, fosfato o sulfato, o una sal derivada de un ácido orgánico, por ejemplo, un oxalato, lactato, tartrato, acetato, salicilato, citrato, benzoato, pamoato, adipato o 1,1-metilen-bis (2-hidroxi-3-naftoato), o una sal derivada de una resina sintética ácida, por ejemplo, una resina de poliestireno sulfonada. En una realización particular, la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable es clorhidrato. En una realización más particular, el antagonista selectivo del receptor antagonista  $\beta_2$  adrenérgico es la sal clorhidrato del compuesto de fórmula II.

El término “tratamiento”, como se usa en esta invención, se refiere a cualquier procedimiento, acción, aplicación, terapia o similar, en donde a un sujeto (o paciente), que incluye un ser humano, se proporciona ayuda médica con el objeto de mejorar la afección del sujeto, directa o indirectamente, o ralentizar la progresión de una afección o trastorno en el sujeto, o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en el tratamiento.

El término “prevención”, como se usa en esta invención, se refiere a la administración de un compuesto de la invención en una etapa inicial o temprana de la enfermedad, o también para prevenir su aparición.

El término “enfermedad de von Hippel-Lindau” o “enfermedad de VHL” o “enfermedad de van Hippel-Lindau” o “enfermedad de VHL” o “síndrome de VHL” o “síndrome de von Hippel-Lindau”, como se usa en esta invención, se refiere a una enfermedad rara causada por una mutación en supresor del tumor de von Hippel-Lindau (*VHL*) que conduce a una ausencia de proteína VHL o a una proteína VHL no funcional aberrante. Más de 370 mutaciones heredadas en el gen *VHL* se han identificado en personas con la enfermedad de von Hippel-Lindau (<http://www.umd.be/VHL/>). Las mutaciones genéticas *VHL* asociadas con esta condición evitan la producción de cualquier proteína VHL o conducen a la producción de una versión anormal de la proteína. La enfermedad de VHL se caracteriza por la formación de múltiples tumores benignos y malignos y bolsas rellenas de fluido (quistes) en muchas partes diferentes del cuerpo, que incluyen: hemangioblastoma retiniano, hemangioblastoma del SNC, carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), feocromocitoma, tumor de islotes pancreáticos, tumores del saco endolinfáticos y quistes en testículos y ligamento ancho.

El término “paciente” o “sujeto”, como se usa en esta invención, se refiere a cualquier animal, preferentemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o raza. En la presente invención, el paciente sufre de enfermedad de von Hippel-Lindau.

El término “paciente con enfermedad de von Hippel-Lindau”, como se usa en esta invención, significa que el paciente ha sido diagnosticado con la enfermedad de VHL. La enfermedad de VHL puede diagnosticarse de acuerdo con los siguientes criterios de diagnóstico (Frantzen y col, *Von Hippel-Lindau Syndrome*, GeneReviews®):

- Para un individuo sin antecedentes familiares de enfermedad de VHL, la enfermedad de VHL se diagnostica si el paciente presenta dos o más lesiones características:

- Dos o más hemangioblastomas de la retina, columna vertebral o cerebro o un único hemangioblastoma en asociación con una manifestación visceral (por ejemplo, múltiples quistes de riñón o pancreáticos).
- Carcinoma de células renales.
- Espiromocitomas adrenales o extra-adrenales.

- Menos comúnmente, los tumores de saco endomolámicos, los cistadenomas papilares del epiddidimo o el ligamento ancho, o tumores neuroendocrinos del páncreas.

5 - Para un individuo con un historial positivo de enfermedad VHL, la enfermedad de VHL se diagnostica si está presente una o más de las siguientes manifestaciones de enfermedad:

- Angioma retiniano

10 • Hemangioblastoma espinal o cerebeloso

- Feocromocitoma adrenal o extra-adrenal

15 • Carcinoma de células renales

- Quistes renales y pancreáticos múltiples

- En cualquier caso en el que una variante germinal heterocigota patogénica de *VHL* se identifique mediante pruebas moleculares.

20 En una realización particular, la enfermedad de VHL se produce con la aparición de uno o más tumores.

En una realización particular, la invención se refiere a un antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso en el tratamiento y/o prevención de un tumor en un paciente con enfermedad de von Hippel-Lindau.

25 El término “tumor” o “cáncer”, como se usa en esta invención, se refiere a un amplio grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular no regulado y que también se denominan neoplasias malignas. El término generalmente se aplica a una enfermedad caracterizada por división celular incontrolada (o por un aumento de la resistencia a la supervivencia o apoptosis) y por la capacidad de dichas células para invadir otros tejidos vecinos (invasión) y diseminarse a otras áreas del cuerpo donde las células no están normalmente ubicadas (metástasis) a través de los vasos linfáticos y sanguíneos, circulando a través del torrente sanguíneo, y luego invadan los tejidos normales en otro lugar del cuerpo. En una realización particular, el cáncer aparece como un tumor benigno, es decir, tumores que no pueden propagarse por invasión o metástasis, es decir, solo crecen localmente. En otra realización particular, el cáncer aparece como un tumor maligno, es decir, un tumor que es capaz de extenderse por invasión y metástasis.

35 Ejemplos ilustrativos no limitativos de tumores son hemangioblastoma, feocromocitoma, tumor del saco endolinfático, cáncer linfocítico, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrectal, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de cuello uterino, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, quiste en el ligamento ancho, peritoneo, epiplón y cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer renal, incluido el carcinoma de células renales, cáncer de piel, cáncer de tejidos blandos, cáncer testicular, quistes en testículos, cáncer de tiroides, cáncer de uréter, cáncer de vejiga urinaria y cáncer del tracto digestivo tal como, por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, incluyendo tumor de los islotes pancreáticos, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de Cavidad oral, cáncer colorrectal y cáncer hepatobiliar.

50 En una realización particular, el tumor no es un tumor pancreático. El término “tumor pancreático”, como se usa en esta invención, incluye tanto tumores exocrinos como endocrinos. Los tumores exocrinos en el páncreas incluyen adenocarcinoma, carcinoma de células acinares, neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) y cistoadenocarcinoma mucinoso, entre otros. Los tumores endocrinos en el páncreas, también llamados “tumores de células de islotes” incluyen gastrinoma (síndrome de Zollinger-Ellison), glucagoma, insulinoma, somatostatina, VIPoma (síndrome Verner- Morrison), tumor de células de islotes no funcional y neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1) entre otros. En una realización más particular, el tumor no es un tumor pancreático exocrino. En una realización aún más particular, el tumor no es un adenocarcinoma pancreático.

60 En otra realización particular, el tumor se selecciona de hemangioblastoma, carcinoma de células renales de células claras (CCRCC), feocromocitoma, tumor de los islotes pancreáticos, tumores del saco endolinfático y quistes en testículos y ligamento ancho.

65 El término “hemangioblastoma”, como se usa en esta invención, se refiere a un tumor benigno altamente vascular que puede ocurrir en el sistema nervioso central (cerebro o médula espinal) y en la retina. En una realización más

particular, el tumor es hemangioblastoma. En una realización aún más particular, el tumor es un hemangioblastoma retiniano o un hemangioblastoma del sistema nervioso central.

5 El término “carcinoma de células renales de células claras” o “ccRCC”, como se usa en esta invención, se refiere a un tumor cortical renal que se caracteriza típicamente por células epiteliales malignas con citoplasma transparente y un patrón de crecimiento compacto o alveolar o acinar con vasculatura de arborización.

10 El término “feocromocitoma” o “PCC”, como se usa en esta invención, se refiere a un tumor neuroendocrino de la médula de las glándulas suprarrenales, o tejido cromafín extra-adrenal que se llenó para involucionar después del nacimiento, que secreta altas cantidades de catecolaminas, principalmente norepinefrina y, en menor medida, epinefrina.

15 El término “tumor del saco endolinfático”, como se usa en esta invención, se refiere a una neoplasia epitelial papilar que surge dentro del saco endolinfático o del conducto endolinfático.

20 El término “quiste”, como se usa en esta invención, se refiere a un grupo de células que se han agrupado para formar una bolsa. El aspecto distintivo de un quiste es que las células que forman el “caparazón” de dicho saco son claramente anormales (tanto en apariencia como en comportamiento) en comparación con todas las células circundantes para esa ubicación determinada. Puede contener aire, fluidos o material semisólido. En una realización particular, los quistes afectan a los testículos o al ligamento ancho.

25 Para su administración al paciente, el receptor antagonista selectivo  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, concretamente el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma, se formulará en una composición farmacéutica.

30 La expresión “composición farmacéutica”, tal como se usa en esta invención, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del receptor antagonista selectivo  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, concretamente el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma, y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El término “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en esta invención, se refiere a la cantidad suficiente del compuesto para proporcionar el efecto deseado y generalmente se determinará, entre otras causas, las características del propio compuesto y el efecto terapéutico que se va a lograr. También dependerá del sujeto a tratar, la gravedad de la enfermedad sufrida por dicho sujeto, la forma de dosificación elegida, la vía de administración, etc. Por esta razón, las dosis mencionadas en esta invención deben considerarse solo como guías para el experto en la técnica, que deben ajustar las dosis dependiendo de las variables mencionadas anteriormente.

40 Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos para cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos para uso de acuerdo con la invención pertenece a la experiencia común de los expertos en la técnica. En general, la dosis necesaria para proporcionar un tratamiento eficaz, que puede ajustarse por un experto en la técnica, variará dependiendo de la edad, la salud, la aptitud, el sexo, la dieta, el peso, el grado de alteración del receptor, la frecuencia del tratamiento, la naturaleza y la condición de la lesión, la naturaleza y el grado de deterioro o enfermedad, el estado médico del sujeto, la vía de administración, las consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, farmacocinética y perfil de toxicología del compuesto particular usado, si se usa un suministro de fármacos del sistema, y si el compuesto se administra como parte de una combinación de fármacos. La cantidad del compuesto para su uso de acuerdo con la invención que es terapéuticamente eficaz en la prevención y/o el tratamiento de la lesión por isquemia/reperfusión en un sujeto puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales (véase, por ejemplo, the Physician's Desk Reference, Medical Economics Company, Inc., Oradell, NJ, 1995, y Drug Facts and Comparisons, Inc., St. Louis, MO, 1993).

55 En una realización particular, la cantidad terapéuticamente eficaz produce la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad de VHL. En una realización particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra a una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg/día a alrededor de 5 mg/kg/día, preferiblemente desde alrededor de 0,5 mg/kg/día, alrededor de 0,7 mg/kg/día, alrededor de 1 mg/kg/día, alrededor de 1,5 mg/kg/día alrededor de 1,7 mg/kg/día, aproximadamente 1,9 mg/kg/día, aproximadamente 2,1 mg/kg/día, aproximadamente 2,2 mg/kg/día, aproximadamente 2,5 mg/kg/día, aproximadamente 2,7 mg/kg/día, aproximadamente 2,9 mg/kg/día, aproximadamente 3,1 mg/kg/día, aproximadamente 3,3 mg/kg/día, aproximadamente 3,5 mg/kg/día, aproximadamente 3,7 mg/kg/día, aproximadamente 3,9 mg/kg/día, aproximadamente 4,1 mg/kg/día, aproximadamente 4,3 mg/kg/día, aproximadamente 4,5 mg/kg/día, aproximadamente 4,7 mg/kg/día, aproximadamente 4,9 mg/kg/día, aproximadamente 5,1 mg/kg/día, aproximadamente 5,3 mg/kg/día, aproximadamente 5,5 mg/kg/día, aproximadamente 5,7 mg/kg/día, aproximadamente 5,9 mg/kg/día, aproximadamente 6,1 mg/kg/día, aproximadamente 6,3 mg/kg/día, aproximadamente 6,5 mg/kg/día, aproximadamente 6,7 mg/kg/día, aproximadamente 6,9 mg/kg/día, aproximadamente 7,1 mg/kg/día, aproximadamente 7,3 mg/kg/día, aproximadamente 7,5 mg/kg/día, aproximadamente 7,7 mg/kg/día, aproximadamente 7,9 mg/kg/día, aproximadamente 8,1 mg/kg/día, aproximadamente 8,3 mg/kg/día, aproximadamente 8,5 mg/kg/día, aproximadamente 8,7 mg/kg/día, aproximadamente 8,9 mg/kg/día, aproximadamente 9,1 mg/kg/día, aproximadamente 9,3 mg/kg/día, aproximadamente 9,5 mg/kg/día, aproximadamente 9,7 mg/kg/día, aproximadamente 9,9 mg/kg/día, aproximadamente 10 mg/kg/día. En una realización más particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra a una dosis entre 3,3 mg/kg corporal /día y 4,5 mg/kg cuerpo/día. En otra realización más particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra a una dosis entre

0,5 mg/kg corporal /día y 1 mg/kg cuerpo/día. En una realización aún más particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra a una dosis de 0,81 mg/kg cuerpo/día.

Las dosis de los compuestos de la invención pueden expresarse en mg del antagonista por kg de peso corporal o en mg del antagonista por metro cuadrado de superficie corporal. El experto en la técnica sabe cómo determinar la dosis para un animal particular, en particular la dosis para seres humanos, a partir de las dosis analizadas experimentalmente en ratones. Por ejemplo, el artículo de Reagan-Shaw S. y col. (Reagan-Shaw S. y col. "Dose translation from animal to human studies revisited". FASEB J 2008, 22(3):659-661) proporciona los factores de conversión estándar utilizados para convertir mg/kg en mg/m<sup>2</sup>

$$\text{Dosis (mg/kg)} \times K_m = \text{Dosis (mg/m}^2\text{)}$$

El artículo también explica que esta conversión es la base para convertir la dosis en una primera especie animal para dosificar en una segunda especie animal (traducción de dosis alométricas). Así, la dosis animal (AD) en mg/kg se puede convertir en dosis equivalente humana (HED) en mg/kg usando la siguiente fórmula:

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{AD (mg/kg)} \times \frac{\text{Animal } K_m}{\text{Humano } K_m}$$

en donde la  $K_m$  para cada especie se muestra en la Tabla 1 (datos extraídos de Reagan-Shaw S. y col. "Dose translation from animal to human studies revisited". FASEB J 2008, 22(3):659-661).

Especies		Factor $K_m$
Humano	Adulto	37
	Niño	25
Babuino		20
Perro		20
Mono		12
Conejo		12
Cobaya		8
Rata		6
Hámster		5
Ratón		3

Tabla 1. Factor  $K_m$  para la conversión de AD en HED

Por lo tanto, los experimentos con dosis de 10 mg/kg en ratones corresponden a dosis generales en seres humanos de 0,8 mg/kg.

En otra realización particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra en humanos, a una dosis en la que cada administración varía de 0,2 mg/m<sup>2</sup> a 5 mg/m<sup>2</sup>, preferiblemente de alrededor de 0,2 mg/kg/día, alrededor de 0,25 mg/kg/día, alrededor de 0,3 mg/kg/día, alrededor de 0,35 mg/kg/día, alrededor de 0,4 mg/kg /día, aproximadamente 0,45 mg/kg/día, aproximadamente 0,50 mg/kg/día, aproximadamente 0,55 mg/kg/día, aproximadamente 0,6 mg/kg/día, aproximadamente 0,65 mg/kg/día, aproximadamente 0,7 mg/kg/día, aproximadamente 0,75 mg/kg/día, aproximadamente 0,8 mg/kg/día, aproximadamente 0,85 mg/kg/día, aproximadamente 0,90 mg/kg/día, aproximadamente 0,95 mg/kg/día, aproximadamente 1 mg/kg/día, aproximadamente 1,2 mg/kg/día, aproximadamente 1,4 mg/kg/día, aproximadamente 1,6 mg/kg/día, aproximadamente 1,8 mg/kg/día, aproximadamente 2 mg/kg/día, aproximadamente 2,2 mg/kg/día, aproximadamente 2,4 mg /kg/día, aproximadamente 2,6 mg/kg/día, aproximadamente 2,8 mg/kg/día, aproximadamente 3 mg/kg/día, aproximadamente 3,2 mg/kg/día, aproximadamente 3,4 mg/kg/día, aproximadamente 3,6 mg/ kg/día, aproximadamente 3,8 mg/kg/día, aproximadamente 4 mg/kg/día, aproximadamente 4,5 mg/kg/día, aproximadamente 5 mg/kg/día. En una realización más preferida, el antagonista selectivo del receptor adrenérgico  $\beta_2$ , concretamente el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma, se administra a una dosis entre 0,7 mg/kg de cuerpo/día y 1 mg/kg de cuerpo/día. En una realización aún más preferida, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra a una dosis de 0,81 mg/kg cuerpo/día.

En otra realización particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra diariamente preferentemente 1 vez al día, 2 veces al día, 3 veces al día. En una realización más preferida, se administra 1 vez al día. En otra realización particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra durante 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más de 12 meses, preferiblemente durante 25 días.

La expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable” o “vehículo farmacéuticamente aceptable”, se refiere a cualquier compuesto o combinación de compuestos que es esencialmente no tóxico para el sujeto a la dosis y concentración empleadas, y es compatible con los otros componentes de una composición farmacéutica. Por lo tanto, un excipiente es una sustancia inactiva formulada junto con el ingrediente activo (es decir, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferentemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma) de una composición farmacéutica, con el propósito de composiciones de aumento de volumen que contienen dichos principios activos. El aumento permite una dispensación conveniente y precisa de una sustancia farmacológica cuando se produce una forma de dosificación. Los excipientes también pueden servir para diversos propósitos de potenciación terapéutica, tales como facilitar la absorción o solubilidad del compuesto (fármaco), u otras consideraciones farmacocinéticas. Los excipientes también pueden ser útiles en el procedimiento de fabricación, para ayudar en el manejo de la sustancia activa en cuestión, como facilitar la fluidez del polvo o las propiedades antiadherentes, además de ayudar a la estabilidad *in vitro* como la prevención de la desnaturalización durante la vida útil esperada. La selección de excipientes apropiados depende de la vía de administración y la forma de dosificación, así como el ingrediente activo y otros factores. Un excipiente puede ser un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo convencional. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de excipientes o vehículos incluyen agua, soluciones salinas (salina), alcohol, dextrosa, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, perfume aceite, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetiales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada, tal como, pero no limitado a vía parenteral, oral, tópica, nasal, rectal, intravítrea. En una realización particular, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intradérmica, por vía intramuscular o intravítrea. En una realización preferida, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra por vía oral o intravenosa o intravítrea. En una realización más preferida, el antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$  adrenérgico de la invención, a saber, el derivado de alcanolamina de fórmula I, preferiblemente el derivado de alcanolamina de fórmula II, o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, se administra por vía intraperitoneal.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos, que deben verse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

#### Ejemplos

#### Procedimientos

#### Cultivo celular

Las células HeLa 9XHRE se transfectaron de forma estable con un reportero HREluc que contenía nueve copias en tándem del elemento sensible a la hipoxia (HRE) seguido del gen de la luciferasa, y se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Gibco). Para inducir las condiciones hipóxicas, las células HeLa se cultivaron con desferrioxamina 100  $\mu\text{M}$  (DFO) (hipoxia química). Cuando fue necesario, las células HeLa se trataron con Propranolol (bloqueador beta no selectivo que se une a los receptores Beta 1 y Beta 2), ICI 118.551 (específico de Beta 2) y Atenolol (específico de Beta 1) (100  $\mu\text{M}$ ). Cultivos primarios de hemangioblastoma del SNC se obtuvieron según lo descrito previamente por Albiñana y col., Orphanet J Rare Diseases, 2015, 10: 118. Cuando fue necesario, los cultivos primarios de hemangioblastoma del SNC se trataron con propranolol e ICI (100  $\mu\text{M}$ ).

#### RT-PCR en tiempo Real

El ARN celular total se extrajo de células de hemangioblastoma utilizando un kit de ARN Nucleo Spin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Se transcribió inversamente un microgramo de ARN total en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  con

el First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Alemania) utilizando cebadores aleatorios. Se utilizó el sistema SYBR Green PCR (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.) para llevar a cabo la PCR en tiempo real con un sistema iQ5. Los cebadores utilizados para la qPCR fueron:

GENE	Directo	Inverso
<b>18S</b>	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC - 3'	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG - 3'
<b>BAX</b>	5'-CACTCCCGCCACAAAGAT-3'	5'-CAAGACCAGGGTGGTTGG - 3'
<b>CASP9</b>	5'-CCCAAGCTCTTTTCATCCA -3'	5'-TTACTGCCAGGGGACTCGT - 3'

5

Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR

### **Ensayo de viabilidad celular luminiscente**

10 La viabilidad del hemangioblastoma y las células HeLa 9X HRE se midió con un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Este es un procedimiento homogéneo para determinar el número de células viables en cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, que señala la presencia de células metabólicamente activas. Se sembraron un total de 10.000 células en placas de 96 pocillos y se cultivaron con propranolol/ICI118.551 en 100 µl de medio. Después del tratamiento, las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 min antes de la adición de 100 µl de reactivo Cell Titer-Glo (tampón de lisis, luciferasa recombinante Ultra-Glo, Luciferina y Mg<sup>2+</sup>). Se midió la luminiscencia usando un Sistema Glomax de Multideteción (Promega).

15

#### Ensayo de cicatrización de heridas y formación de tubos

20

Se crearon heridas por rasguños in vitro raspando monocapas de HUVEC-1 confluentes en pocillos de placa P-24 con puntas de pipeta desechables estériles. Las células restantes se lavaron con PBS y se incubaron con EGM-2 (Lonza) en ausencia o presencia de propranolol/ICI 118.551 100 µM durante un máximo de 6-8 h. Para los ensayos de formación de tubos, las HUVEC se sembraron como antes pero en una placa Matrigel ((BD Biosciences, Bedford, MA, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C, sin y con tratamiento con propranolol/ICI 118.551 (100 µM). La formación de tubos se controló durante hasta 8 horas.

25

#### Formación y cultivo de hemangioesferas

30 Se cultivaron células de hemangioblastoma derivadas de VHL en suspensión en medio DMEM:F-12 sin rojo fenol con GlutaMAX, suplementado con B27, 20 ng/ml de EGF, 20 ng/ml de bFGF y penicilina/estreptomina al 1 % a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub>. Se sembraron suspensiones de células individuales a una densidad de 50.000 células/ml en matraces de fijación ultrabaja de 75 cm<sup>2</sup> (Corning). Los cultivos no se trataron o se trataron con propranolol/ICI 118.551 a las concentraciones mostradas.

35

#### Medición de viabilidad celular

40 Las líneas celulares endoteliales (HUVEC y HMEC), la línea celular humana ccRCC *Vhl* -/- 786-0 y los cultivos primarios de hemangioblastomas de pacientes (Hb14 y 18) se sembraron por triplicado en una placa de 96 pocillos (2 x 10<sup>3</sup> por pocillo). Al día siguiente, las células se trataron con vehículo o concentraciones diversas de propranolol o ICI-118.551 durante 72 horas. La viabilidad celular (proliferación celular, contenido de ATP) se determinó usando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Reactivo Cell Titer-Glo (tampón de lisis, luciferasa recombinante Ultra-Glo, Luciferina y Mg<sup>2+</sup>). Se indujo la lisis celular en un agitador orbital durante 2 minutos, y luego se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 10 min para estabilizar la señal luminiscente. Se midió la luminiscencia usando un sistema GlomaxMultidetecion System (Promega), se normalizaron para control (100 %).

45

#### Xenoinjertos de células ccRCC humanas 786-O en ratones

50 Se inyectaron ratones NOD scid gamma (NSG) de 7-8 semanas de edad en el flanco dorsal con una suspensión de células individuales de 10<sup>6</sup> células 786-O. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 100 mm<sup>3</sup> de volumen, los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, de 9/10 ratones cada uno. Dos grupos se trataron diariamente por vía intraperitoneal con el cuerpo de 10 mg/Kg propranolol o ICI-118.551, respectivamente, y se inyectó un tercer grupo con el disolvente. El tamaño del tumor se midió mediante un calibrador cada 2-3 días y los volúmenes se calcularon siguiendo la fórmula: más corto<sup>2</sup> x más largo x 0,52. Los ratones se sacrificaron cuando el promedio del volumen tumoral del grupo de control alcanzó un punto final establecido de acuerdo con los procedimientos éticos

55

#### Resultados

60 ICI 118.551 disminuye la viabilidad del hemangioblastoma e inhibe la formación de hemangioesfera de pacientes con VHL

Los resultados mostrados en los ejemplos demuestran que ICI 118.551, un bloqueador selectivo de beta 2, no solo refleja los resultados obtenidos con propranolol (bloqueador beta no selectivo que se une a los receptores beta 1 y beta 2) (véase Albinana y col., Orphanet J of rare diseases., 10:11 8 (2015) pero también muestra resultados superiores al propranolol. En particular, para el caso de células derivadas de tumores VHL, ICI 118.551 disminuye la viabilidad por un aumento en la apoptosis celular, inhibe la formación de hemangiosfera, que es una propiedad específica de los tumores que contienen células madre indiferenciadas, y es un agente antiangiogénico a través de la inhibición de HIF.-transcripción estimulada de sus genes diana.

El Propranolol e ICI 118.551 disminuyen la viabilidad de las células de hemangioblastoma de un cultivo primario derivado de un tumor VHL en al menos el 55-60 % en comparación con las mismas células no tratadas (Figura 1). En la mayoría de los casos, el efecto de ICI 118.551 es superior al propranolol, cuando ambos se usan a 100 µM, después de 72 horas de tratamiento. La disminución de la viabilidad varía de 60 a 40 % dependiendo de diferentes tumores, pacientes y tiempo de cultivo.

La Figura 2 presenta las células restantes en cultivos después de 72 horas de tratamiento con P (propranolol 100 µM) E ICI 118.551 50 µM (HB 18) y 100 µM en (HB 4), en comparación con el Control (células no tratadas de diferentes hemangioblastomas de 2 pacientes diferentes). Existe una reducción significativa en el número de células de hasta 30-40 % con respecto a las no tratadas. La disminución se debe a la apoptosis como se muestra para ICI 118.551 de la Figura 3. La Figura 3 muestra la cantidad de ARNm de dos genes proapoptóticos, *Bax* y el ejecutor proteasa *Caspasa 9*, que está significativamente regulada positivamente después del tratamiento celular con ICI 118.551 a 100 µM.

Una característica de las células tumorales en cultivo es la propiedad de formar esferas organizadas alrededor de un núcleo de células madre indiferenciadas, estas esferas tienen un borde bien definido rodeado por una interfaz ordenada con el medio. Los agentes antitumorales inhiben o interrumpen la formación de las esferas mediante la desagregación de las células. La figura 4 muestra cultivos de hemangiosfera de diferentes hemangioblastomas sin tratamiento y con tratamiento con 100 µM de propranolol o ICI 118.551 durante 7 días en estos casos particulares que se muestran en las figuras 4 y 5. Como se muestra en 5 cultivos tumorales diferentes, las hemangiosferas se encuentran alteradas por el tratamiento con betabloqueadores, siendo especialmente llamativo el caso del hemangioblastoma 4 (Fig. 4B) y 23 (Fig. 4C) tras 100 µM ICI 118.551.

La angiogénesis es propiedad que tienen las células endoteliales de formar vasos de los preexistentes. Para la angiogénesis, es necesario la migración de células endoteliales (que implican la interrupción en la matriz celular) y la tubulogénesis o la formación de nuevos tubos (vasos). Estas propiedades pueden estudiarse *in vitro* mediante la prueba de cicatrización de heridas (Figura 5) y tubulogénesis matrigel (Fig. 6).

Si las monocapas confluentes de células endoteliales se rompen al arañar su superficie, las células endoteliales tienden a migrar y rellenar la discontinuidad. Esta “así llamada” prueba de cicatrización de heridas puede seguirse con el tiempo para monitorizar la migración de las células. La Figura 5A muestra cómo ICI 118.551 y propranolol a 100 µM retrasan el cierre de la discontinuidad en comparación con las células no tratadas (control). La migración de células no tratadas es más rápida como se cuantifica en el gráfico de la Figura 5B, mientras que tanto ICI 118.551 como propranolol interfieren significativamente con el procedimiento de migración.

La Figura 6A muestra la red característica de los túbulos imitando la red capilar formada por células endoteliales en matrigel después de 3 horas. Sin embargo, si las células se pretratan con ICI 118.551 o Propranolol (100 µM), el número de estructuras cerradas disminuye drásticamente. La cuantificación promedio de células cerradas en cinco campos diferentes se muestra en la Figura 6B. Está claro que el propranolol e ICI 118.551 funcionan como inhibidores de la angiogénesis.

La angiogénesis depende en gran medida del programa de transcripción de HIF, desencadenado en presencia de condiciones hipóxicas, o como en el caso de las células de hemangioblastoma de Von Hippel Lindau, debido a la falta de proteína VHL a cargo de la proteína HIF para su procesamiento de proteasoma en condiciones normóxicas en células de tipo salvaje. Una peculiaridad especial de las células de hemangioblastoma y las células de carcinoma de riñón de células claras es que expresan constitutivamente la proteína HIF, que es activa y se transloca al núcleo donde puede unirse y activar sus dianas genéticas, tales como: VEGF, PDGF, EPO, endoglina, varias metaloproteasas, anhídrido carbónico, Glut-1, etc. Para probar que propranolol e ICI 118.551 son inhibidores de la actividad transcripcional de HIF, se usó un sistema de indicador de luciferasa bajo el control de nueve copias en tándem del elemento sensible a la hipoxia (HRE) seguido de luciferasa. Las células HeLa 9XHRE se transfectaron de manera estable con un indicador HREluc. Para inducir las condiciones hipóxicas, las células HeLa se cultivaron con desferrioxamina 100 µM (DFO) (hipoxia química). Estas células hipóxicas no se trataron o se trataron con 100 µM de Propranolol o ICI 118.551, y la actividad de luciferasa se midió mediante luminometría. La Figura 7 muestra cómo se desencadena la expresión de luciferasa en condiciones hipóxicas, y cómo esta regulación positiva está amortiguada por Propranolol y ICI 118.551. ICI 118.551 es claramente superior al Propranolol al abolir completamente la actividad de luciferasa inducida por hipoxia, por lo tanto ICI 118.551 se dirige a la actividad transcripcional del HIF, que se reduce prácticamente a “0”.

El Propranolol y el ICI 118.551 interfieren con la vía de hipoxia, principalmente a través del bloqueo de los receptores adrenérgicos beta 2

5 Cuando las células HeLa que albergan el indicador de hipoxia HRE-luciferasa se tratan con DFO (desoxixiamina), el HIF se transloca a los núcleos, y se une al HRE (elementos sensibles a hipoxia - Hypoxia Responsive Elements) fusionados al indicador de luciferasa, y la estimulación de la diana de hipoxia puede cuantificarse por luminiscencia. Sin embargo, la estimulación de hipoxia es extremadamente reducida en presencia de ICI118.551 y propranolol a 100  $\mu$ M. A medida que ambos son bloqueadores del receptor adrenérgico beta 2, también se usó atenolol, un  
10 bloqueador adrenérgico beta 1 específico. Como se muestra en la Figura 8, el atenolol apenas redujo la estimulación de hipoxia. Por consiguiente, parece que ICI118.551 está imitando el propranolol dirigido a la vía inducible por HIF, y la acción se lleva a cabo bloqueando el receptor de tipo beta 2. Los tumores derivados de VHL tienen una expresión constitutiva de HIF, por lo tanto, el efecto terapéutico de ICI118.551 de un bloqueador de beta 2 específico, para la enfermedad de von Hipel-Lindau se explica por una disminución de la estimulación del programa de genes de HIF.  
15 Por lo tanto, ICI 118.551 imita los efectos del propranolol que interfieren con la vía de hipoxia, principalmente a través del bloqueo de los receptores adrenérgicos beta 2.

ICI 118.551 es preferentemente dirigido a células Vhl-/- tumorales, frente a células no tumorales como HUVEC y HMEC

20 Cuando las células Vhl-/-, los cultivos primarios de células de hemangioblastoma de pacientes con VHL, incluida la línea celular de carcinoma renal Vhl-/- 786-0, se tratan con diferentes dosis de 0 a 250  $\mu$ M de ICI 118.551, son más sensibles que las células no tumorales como HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) y HMEC (células endoteliales de microvasculatura humana). Mientras que LD50 para los hemangioblastomas VHL está entre 50 y 100  $\mu$ M ICI118,551, en 786-0 es de 100  $\mu$ M., en el caso de HUVEC y HMEC ronda los 150  $\mu$ M. Esto es muy importante para dirigir selectivamente las células Vhl-/- en una dosis de ICI118.551 por debajo del intervalo tóxico para células no Vhl-/. Véase la figura 9. Por lo tanto, ICI 118.551 es preferentemente dirigido a células Vhl-/- tumorales, frente a células no tumorales.

30 ICI 118.551 y propranolol actúan disminuyendo el crecimiento tumoral de un xenoinjerto Vhl-/- 76-0 ccRCC en ratones NSG, un modelo in vivo

Los ratones NSG tratados con propranolol o ICI118.551 (beta-bloqueadores) inhiben el crecimiento tumoral, como se muestra a partir de diferencias significativas encontradas entre el tamaño de los tumores, entre 50-60 días después de la inoculación celular (figura 10). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con propranolol e ICI118.551, mientras que estos tratamientos mostraron una disminución significativa alrededor del 30 % del tamaño del tumor frente a ratones tratados con el vehículo. No hubo efectos tóxicos o adversos observados durante el tiempo del tratamiento. Por lo tanto, ICI 118.551 actúa para disminuir el crecimiento tumoral de xenoinjertos ccRCC Vhl-/-786-0 en un modelo *in vivo* de ratones NSG.

40 ICI 118.551 afecta diferencialmente células Vhl-/- y células endoteliales normales HUVEC y HMEC.

Cultivo primario de Haemangioblastoma de VHL, HUVEC endoteliales primarias normales y la línea celular microendotelial no tumoral HMEC-1 se cultivaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ICI 118.551 (50-250  $\mu$ M) para medir la viabilidad. En concordancia a las curvas de viabilidad, las células de Haemangioblastoma (HB) muestran solo un 20 % de viabilidad a 100  $\mu$ M, mientras que células no tumorales HUVEC o HMEC-1 muestran un 80 % y un 55 % respectivamente de disminución en la viabilidad a 100  $\mu$ M en ambos cultivos,

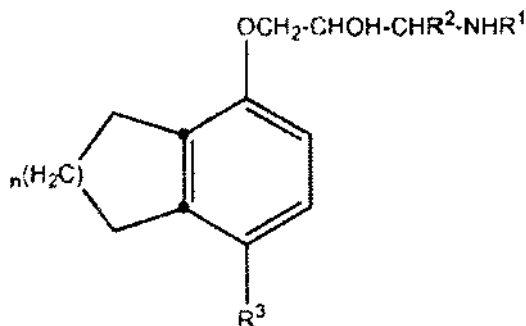
50 El Propranolol y el ICI 118.551 tienen una forma doble de acción: por un lado, promoviendo la apoptosis y de esta manera detiene el crecimiento y provoca la muerte celular de manera programada. Por otro lado, se anulan la activación transcripcional del programa inducible por HIF, disminuyendo de esta manera la expresión de genes diana tales como VEGF, EPO, endoglina, metaloproteasas y así sucesivamente.

## REIVINDICACIONES

1. Un antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de von Hippel-Lindau,

5

en donde el antagonista es un derivado de alcanolamina de fórmula



10 en donde  $R^1$  es un grupo alquilo de hasta 6 átomos de carbono que está ramificado en el átomo  $\alpha$ -carbono,

en donde  $R^2$  es un alquilo de hasta 3 átomos de carbono,

15

en donde  $R^3$  es hidrógeno, un halógeno o un alquilo de hasta tres átomos de carbono y

en donde n es 1 o 2,

o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 20 2. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad de VHL se produce con la aparición de uno o más tumores.

3. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tumor es un hemangioblastoma.

25

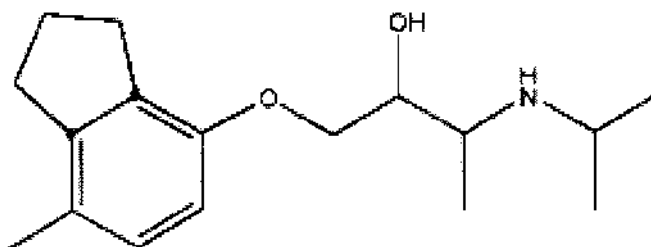
4. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según la reivindicación 3, en donde el hemangioblastoma es un hemangioblastoma retiniano o un hemangioblastoma del sistema nervioso central.

5. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde n es 1.

30

6. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde  $R^1$  es isopropilo,  $R^2$  es metilo y/o  $R^3$  es metilo.

- 35 7. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según la reivindicación 6, en donde el derivado de alcanolamina tiene la fórmula



- 40 8. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable es clorhidrato.

9. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el derivado de alcanolamina o la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis entre 0,2 mg/kg cuerpo/día y 5 mg/kg cuerpo/día.

45

10. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según la reivindicación 9, en donde el derivado de alcanolamina o sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis entre 0,5 mg/kg cuerpo/día y 1 mg/kg cuerpo/día.
- 5 11. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según la reivindicación 10, en donde el derivado de alcanolamina o sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis de 0,8 mg/kg cuerpo/día.
- 10 12. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el derivado de alcanolamina o la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por vía intraperitoneal.
- 15 13. El antagonista selectivo del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el derivado de alcanolamina o sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo se administra diariamente durante 25 días.

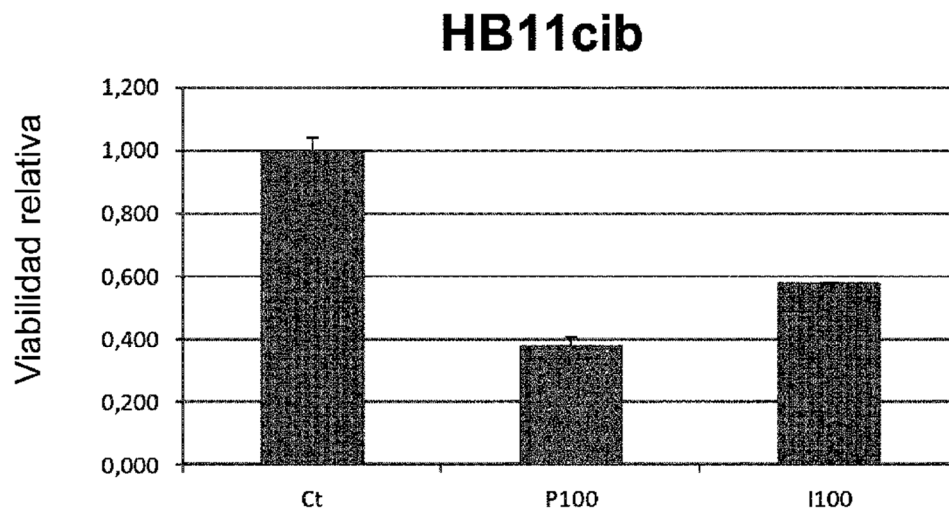


Fig. 1

**A**



**B**

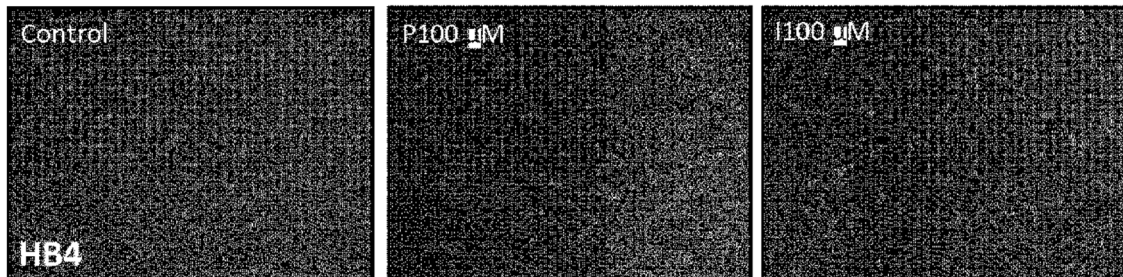


Fig. 2

A

HB26

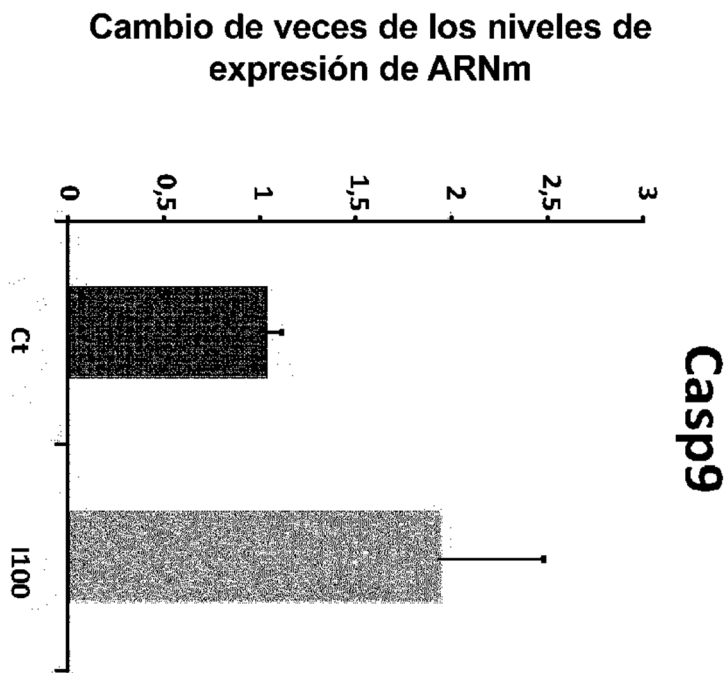
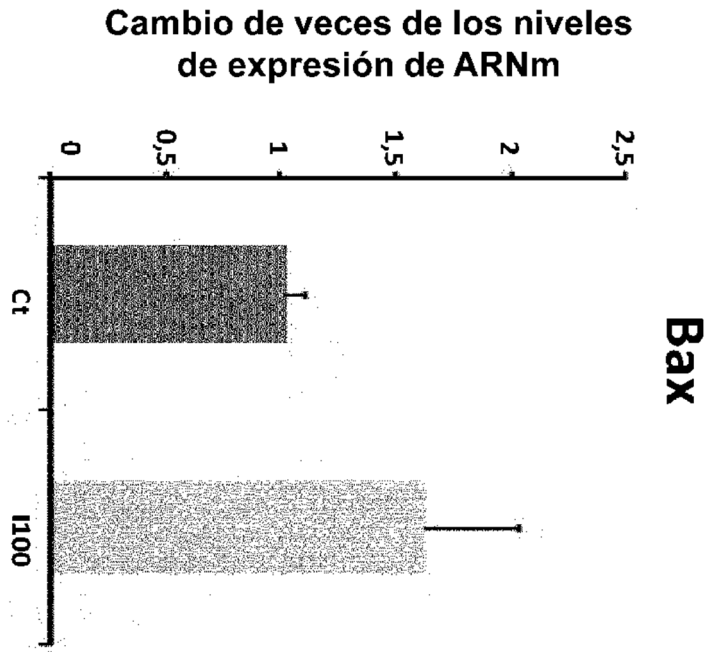


Fig. 3

**B**

**HB11cib**

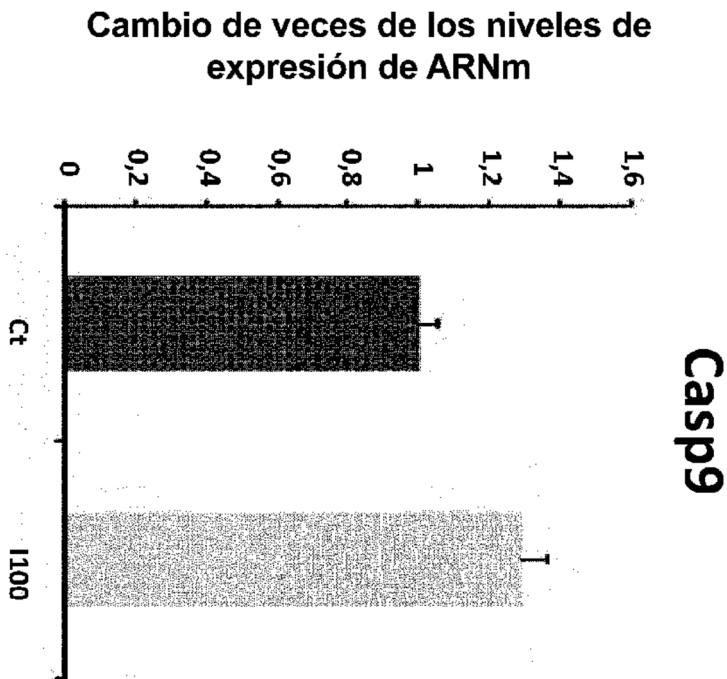
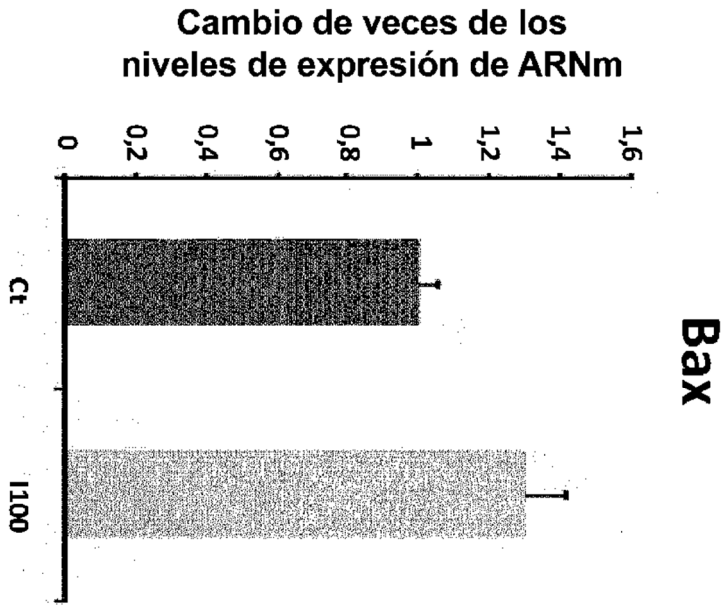


Fig. 3 (CONT.)

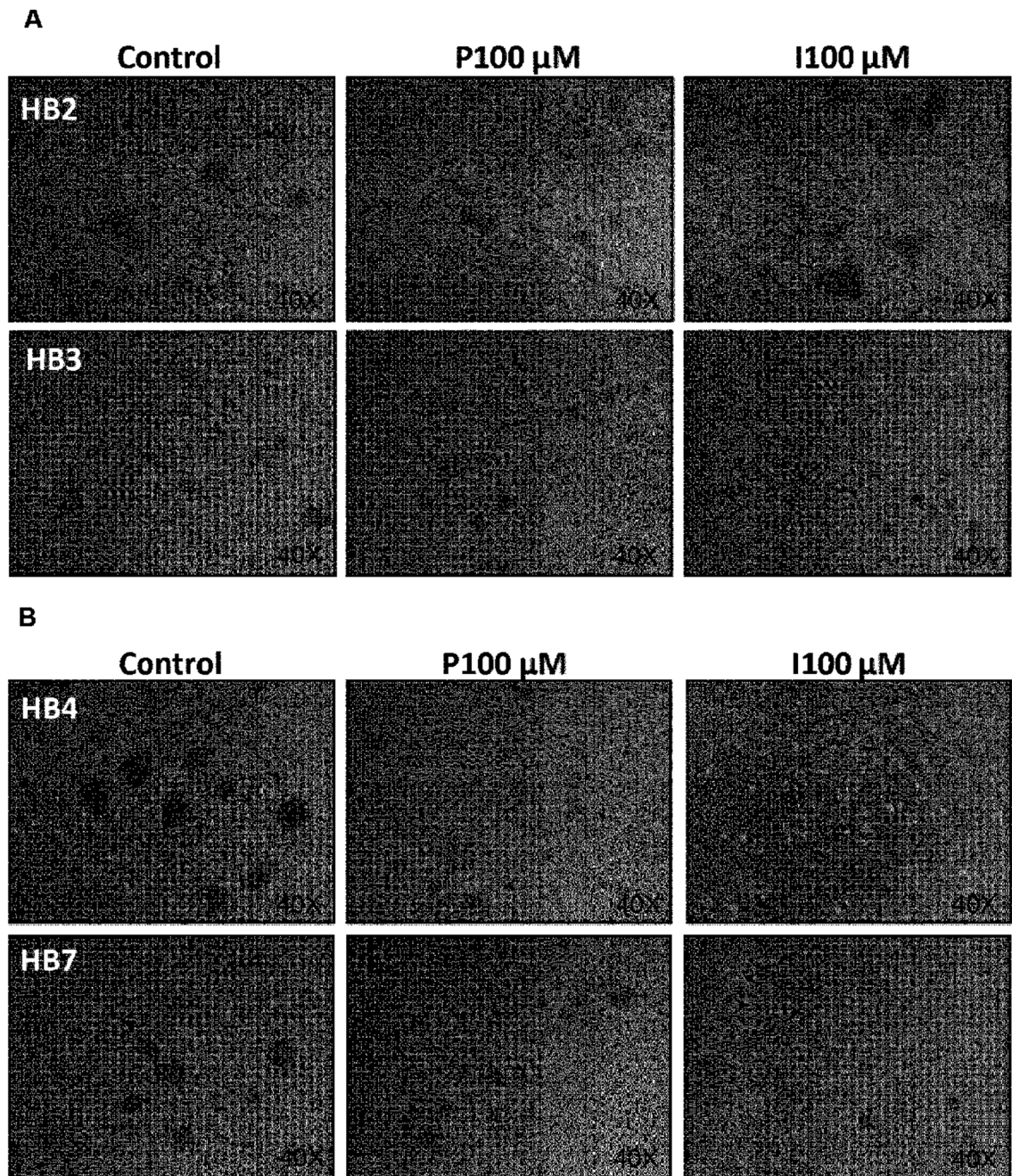
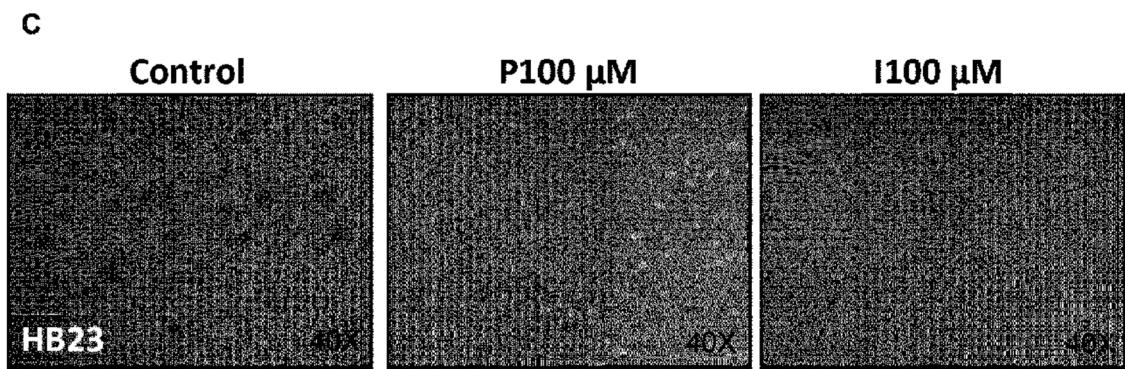


Fig. 4



**Fig. 4 (CONT.)**

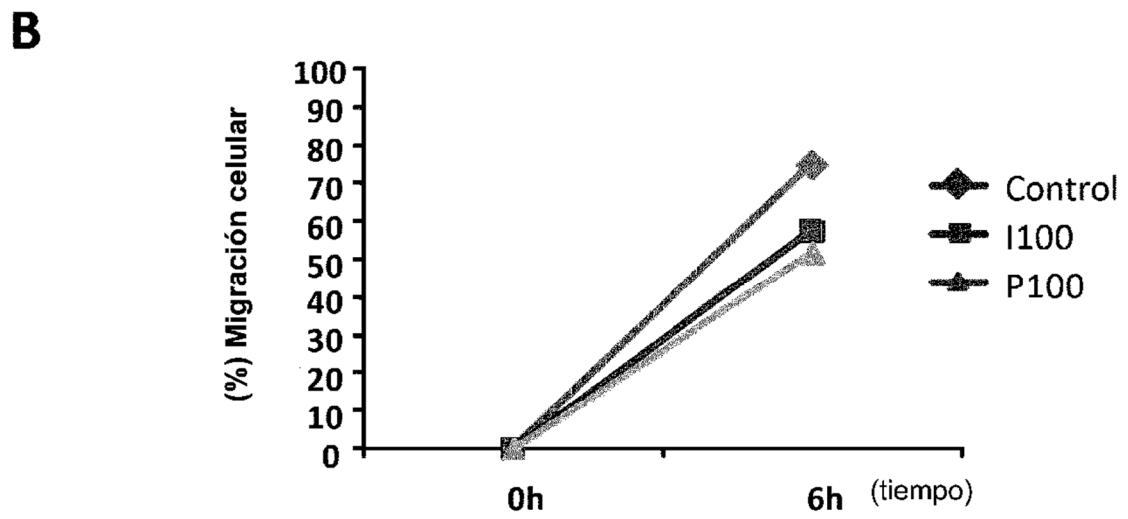
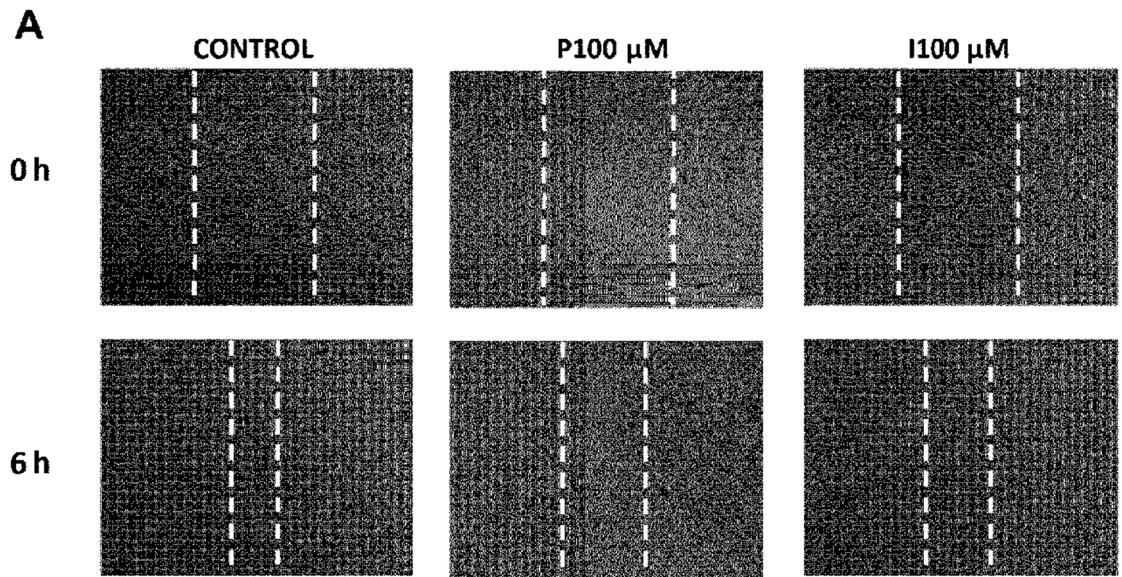


Fig. 5

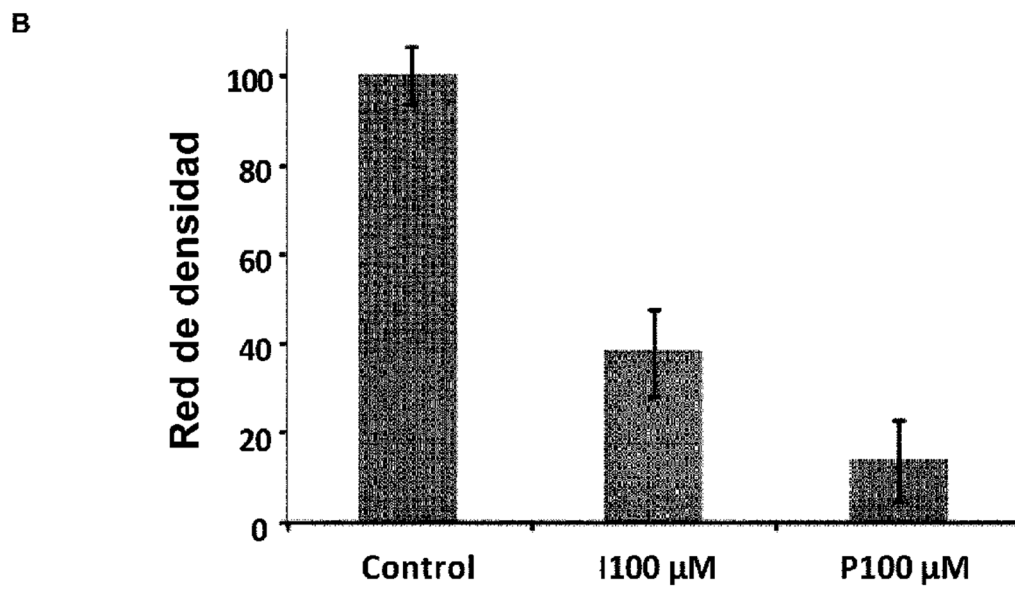
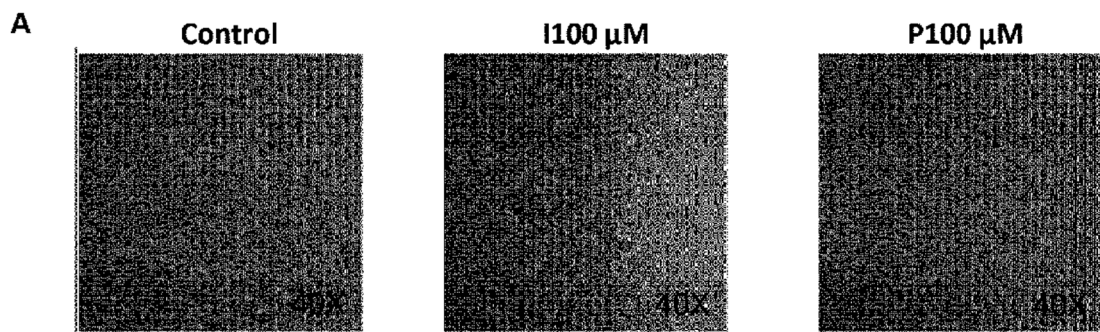


Fig. 6

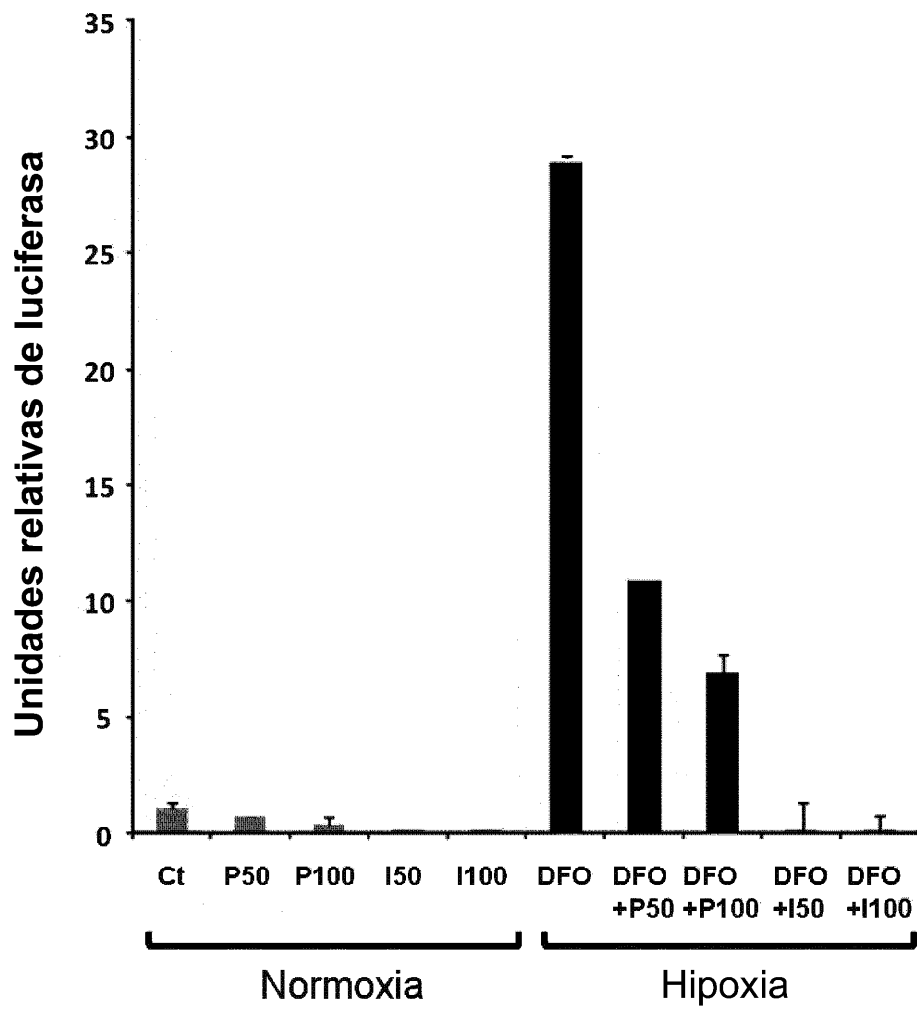


Fig. 7

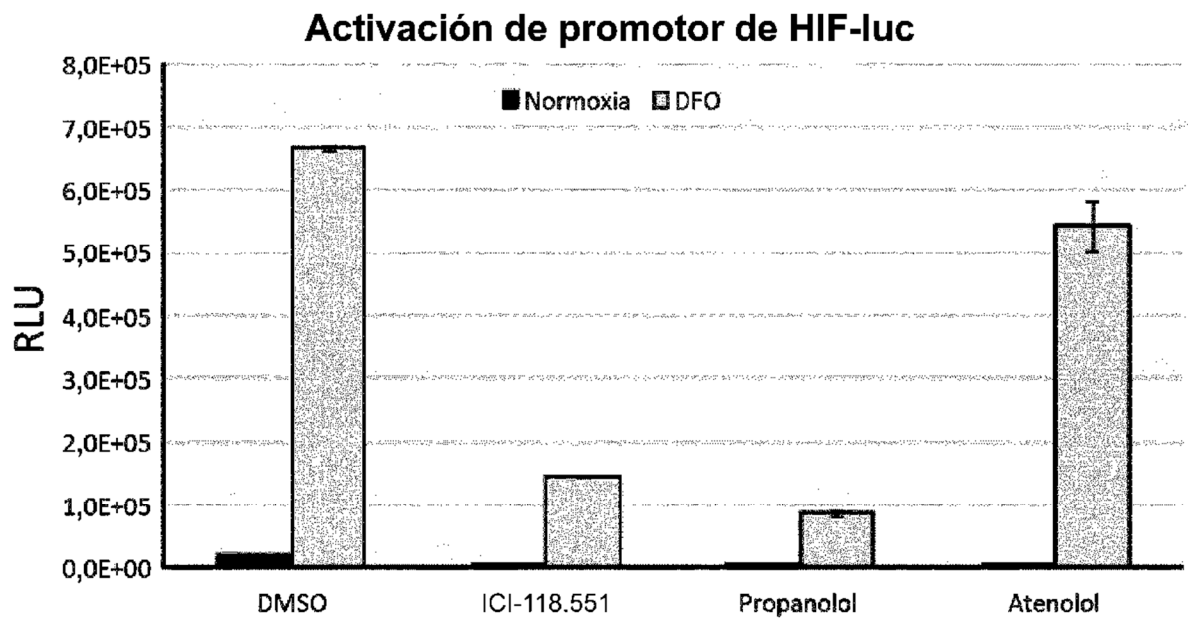


Fig. 8

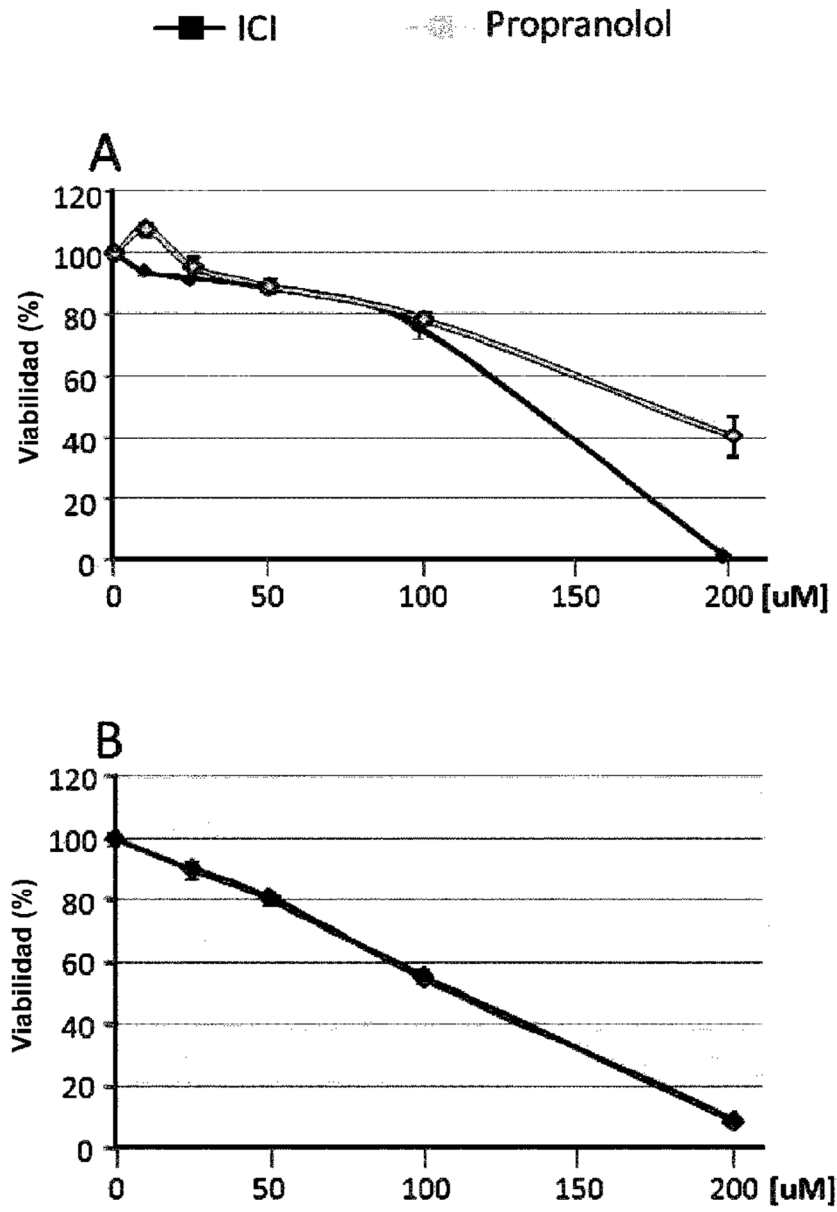


Fig. 9

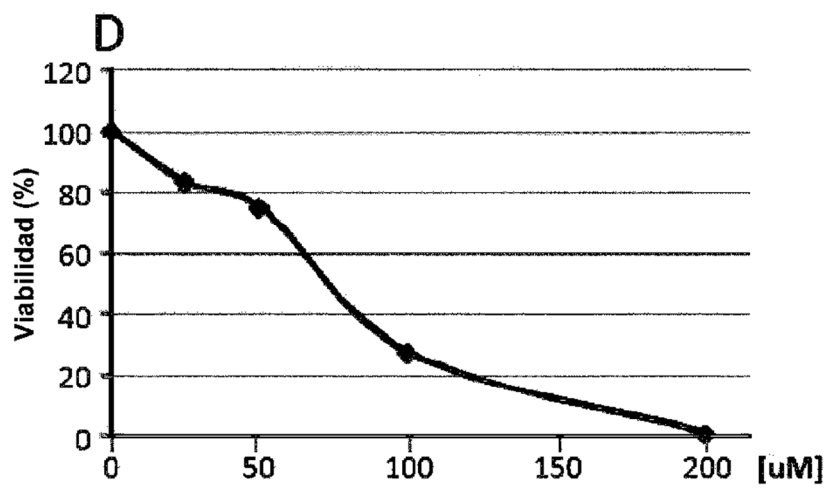
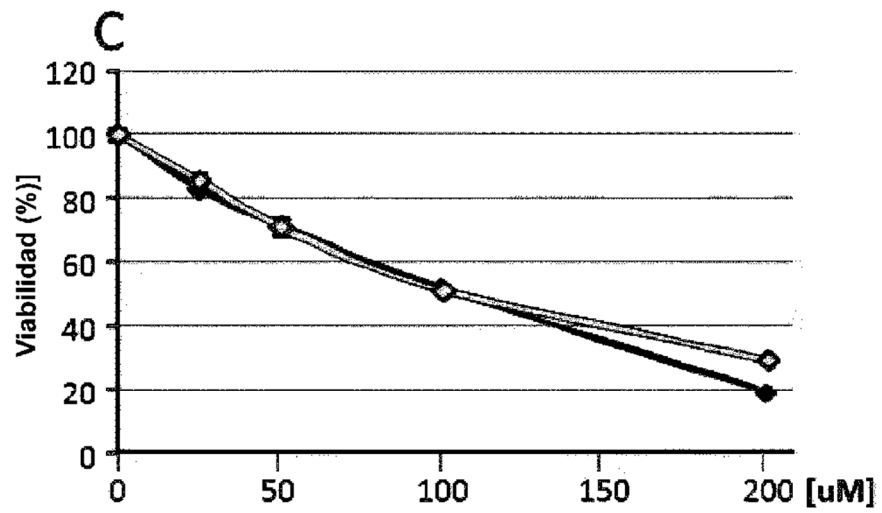


Fig. 9 (cont.)

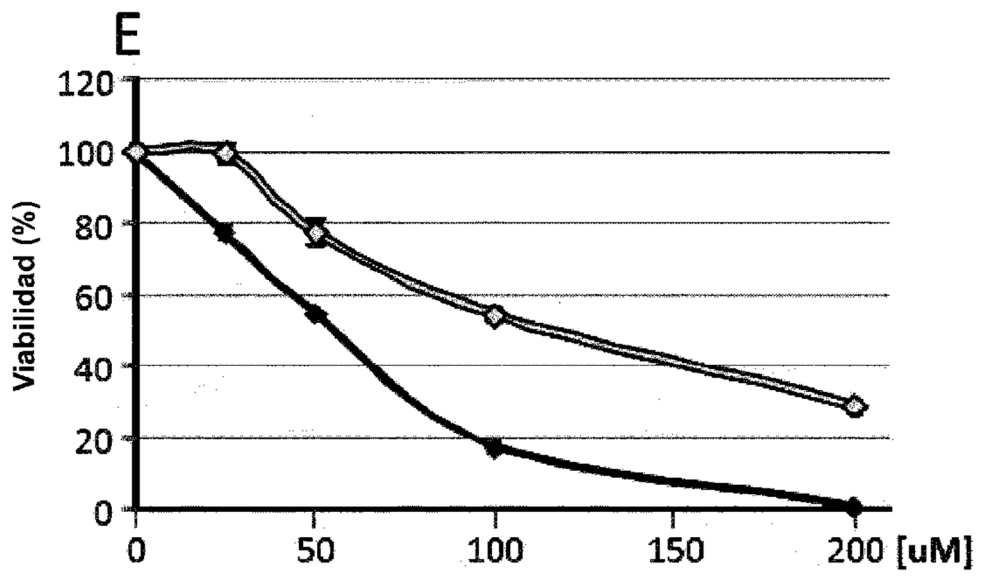


Fig. 9 (cont)

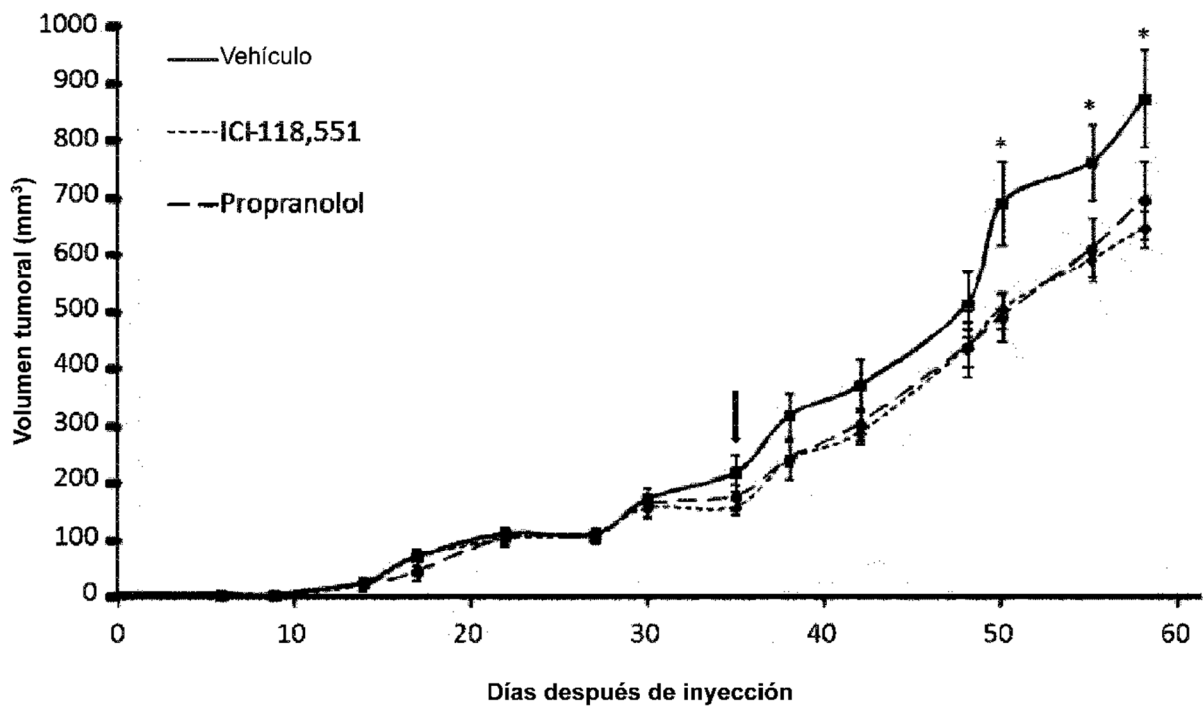


Fig. 10

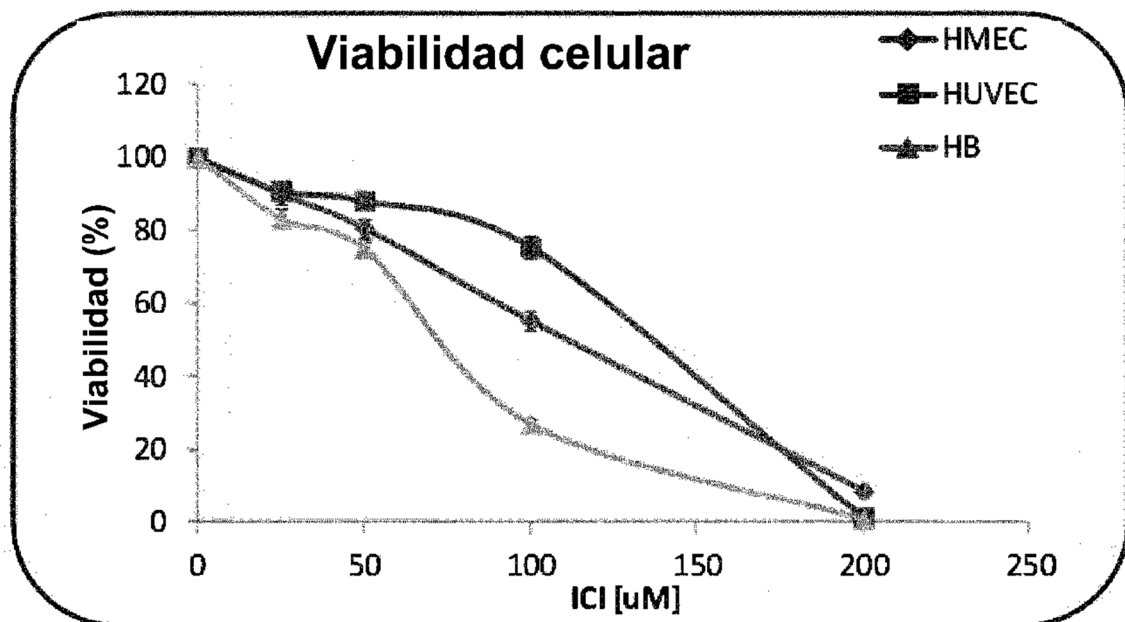


Fig. 11