

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241218**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431613**

(22) Data zgłoszenia: **25.10.2019**

(51) Int.Cl.

A61K 31/121 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

(54) **Związek do zastosowania w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób neurodegeneracyjnych
zależnych od stresu retikulum endoplazmatycznego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

04.05.2021 BUP 09/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.08.2022 WUP 34/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Łodzi,
Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**IRENEUSZ MAJSTEREK, Łódź, PL
WIOLETTA ROZPĘDEK, Łódź, PL
ANNA WALCZAK, Łódź, PL
JACEK KABZIŃSKI, Łódź, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 241218 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest związek do zastosowania w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób neurodegeneracyjnych zależnych od stresu retikulum endoplazmatycznego.

Choroby neurodegeneracyjne znane w medycynie od dawna wciąż znajdują się w centrum zainteresowania wielu badaczy, przyczyna – nie dysponujemy zadowalającymi metodami leczenia. Przykładem jest choroba Alzheimera, Parkinsona, czy jaskra, która ze względu na swój bezobjawowy w początkowej fazie, postępujący i nieodwracalny charakter określana jest podstępny „złodziejem wzroku”.

Jak wynika z raportu Alzheimer's Association w 2015 roku w samych Stanach Zjednoczonych dotkniętych chorobą Alzheimera było ponad 2 mln ludzi. Podobnie jak w przypadku choroby Alzheimera, jaskra rozwija się w wieku podeszłym i jest obecnie główną przyczyną utraty wzroku w starzejącym się społeczeństwie. Szacuje się, iż na całym świecie na jaskrę choruje około 70 mln osób, jak wynika z raportu badań przeprowadzonych w latach 1990–2020. Jaskra została zakwalifikowana do grupy chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, w krajach wysokorozwiniętych jest ona jedną z głównych przyczyn nieodwracalnej utraty wzroku. Mimo stale postępującego rozwoju medycyny, cały czas nie do końca znamy dokładne przyczyny jej powstawania. Nie dysponujemy również w pełni skutecznymi metodami leczenia tej choroby. Na podstawie wykonanych badań wnioskuje się, iż jednym z patomechanizmów zaangażowanych w neurodegenerację w procesie starzenia organizmu może być szlak UPR, dlatego specyficzne inhibitory kinazy PERK mogą posiadać potencjalne zastosowania jak substancja aktywna w procesie formułacji nowych leków (Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimer's & Dementia 2015; 11(3)332+; Flaxman SR. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis The Lancet 2017; (17) 30393–5).

Nagromadzenie nieprawidłowo syntetyzowanych białek wewnątrz retikulum endoplazmatycznego (ER) aktywuje mechanizm odpowiedzi komórki na błędnie sfaldowane białka (ang. unfolded protein response – UPR), na który składa się kaskada zdarzeń prowadzących do wyciszenia translacji, transaktywacji promotorów genów opiekuńczych ER i aktywacji układów degradujących białka. Skutkuje to zahamowaniem translacji większości białek w wyniku fosforylacji eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 2 (Eukaryotic Initiation Factor 2, eIF2 α) przez aktywną kinazę PERK (ang. protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase – PERK). Obok globalnego ograniczenia syntezy białek poprzez fosforylację eIF2 α , drugim efektem odpowiedzi zależnej od PERK jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego ATF4.

Przewlekły stres ER w wyniku aktywacji ATF4 przyczynia się do preferencyjnej translacji czynników uczestniczących w apoptotycznej śmierci komórek, w tym białka CHOP (ang. CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein, CHOP).

Potrzeba znalezienia nowych, skutecznych substancji o potencjalnym zastosowaniu w chorobach neurodegeneracyjnych skierowała tory poszukiwań na testowanie związków należących do grupy niskocząsteczkowych specyficznych inhibitorów transmembranowej kinazy retikulum endoplazmatycznego PERK.

Pierwszym testowanym niskocząsteczkowym inhibitorem w modelach chorób neurodegeneracyjnych był zsyntetyzowany przez firmę GlaxoSmithKline GSK2606414 charakteryzujący się wysoką selektywnością w stosunku do kinazy PERK. Badania przeprowadzone w Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine wykazały, że w mysim modelu choroby prionowej zahamowanie syntezy większości białek w komórkach było wywołane nadmierną aktywacją kinazy PERK w warunkach wewnątrzkomórkowego stresu ER (Jeffrey M. Axten, Stuart P. Romeril, Arthur Shu, Jeffrey Ralph, Jesús R. Medina, Yanhong Feng, William Hoi Hong Li, Seth W. Grant, Dirk A. Heering, Elisabeth Minthorn, Thomas Mencken, Nathan Gaul, Aaron Goetz, Thomas Stanley, Annie M. Hassell, Robert T. Gampe, Charity Atkins, and Rakesh Kumar Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development ACS Med. Chem. Lett. 2013, 4, 964–968). U myszy, którym podawano inhibitor GSK2606414 wykazano przejściowe przywrócenie syntezy białek w komórkach. Ponadto poziom fosforylowanych form kluczowych białek szlaku UPR, takich jak PERK oraz eIF2 α był zdecydowanie niższy w porównaniu z myszami, które nie otrzymywały inhibitora. Jednak GSK2606414 został wykluczony z dalszych badań pod kątem przyszłej strategii terapeutycznej, gdyż analizy wykonane również w Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine wykazały, iż GSK2606414 wywołuje cytotoksyczny efekt w stosunku do komórek trzustki u myszy. U zwierząt, które otrzymywały GSK2606414 stwierdzono znaczną utratę masy ciała oraz hiperglikemię (Heather P. Harding, Huiqing Zeng, Yuhong Zhang, Rivka Jungries, Peter Chung, Heidi Plesken, David D. Sabatini, and David Ron. Diabetes Mellitus and Exocrine Pancreatic Dysfunction in Perk/Mice Reveals a Role for Translational Control in Secretory Cell Survival. Molecular Cell 2001, 7, 1153–1163).

Inhibitor PERK drugiej generacji, zsyntetyzowany przez firmę GlaxoSmithKline, stanowi GSK2656157, charakteryzuje się lepszą farmakokinetyką oraz selektywnością w stosunku do kinazy PERK w porównaniu z GSK2606414. Eksperymenty badawcze przeprowadzone przez Charity Atkins i współpracowników wykazały, iż GSK2656157 wywołuje skuteczną inhibicję fosforylacji kinazy PERK oraz białka eIF2 α , jednak, podobnie jak GSK2606414, nie został włączony do badań klinicznych ze względu na jego nieselektywne działanie, również w stosunku do komórek trzustki (Charity Atkins, Qi Liu, Elisabeth Minthorn, Shu-Yun Zhang, David J. Figueroa, Katherine Moss, Thomas B. Stanley, Brent Sanders, Aaron Goetz, Nathan Gaul, Anthony E. Choudhry, Hasan Alsaied, Beat M. Jucker, Jeffrey M. Axten, and Rakesh Kumar. Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity. *Cancer Res.* 2013 73(6): 1993–2012).

Kolejnym związkiem testowanym w chorobach neurodegeneracyjnych, jako inhibitor szlaku UPR zależnego od kinazy PERK, był Salubrial, który został wyselekcjonowany przez Michaela Boyce i współpracowników do dalszych badań na podstawie wirtualnego screeningu bazy ok. 19 000 związków hamujących apoptozę wywołaną stresem ER w komórkach PC 12 (Michael Boyce, Kevin F. Bryant, Céline Jousse, Kai Long, Heather P. Harding, Donalyn Scheuner, Randal J. Kaufman, Dawei Ma, Donald M. Coen, David Ron, Junying Yuan. A Selective Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress. *Science* 2005. 307, 935).

Eksperymenty badawcze wykonane przez Julie A. Moreno i współpracowników wykazały, iż w myślim modelu choroby prionowej Salubrial nie przyniósł spodziewanego efektu, ponieważ wywołał on wzrost fosforylacji eIF2 α . Zwierzęta otrzymujące Salubrial umierały szybciej w porównaniu do zwierząt nie otrzymujących Salubrialu (Julie A. Moreno, Helois Radford, Diego Peretti, Joern R. Steinert, Nicholas Verity, Maria Guerra Martin, Mark Halliday, Jason Morgan, David Dinsdale, Catherine A. Ortori, David A. Barrett, Pavel Tsytler, Anne Bertolotti, Anne E. Willis, Martin Bushell, and Giovanna R. Mallucci. Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration *Nature* 2012. 485(7399): 507–511; Julie A. Moreno, Mark Halliday, Colin Molloy, Helois Radford, Nicholas Verity, Jeffrey M. Axten, Catharine A. Ortori, Anne E. Willis, Peter M. Fischer, David A. Barrett, Giovanna R. Mallucci. Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Science Translational Medicine* 2013, 5 (206): 1–10).

Kolejnym związkiem wyselekcjonowanym na University of California, San Francisco przez Carmelę Sidrauski i współpracowników wpływającym na przebieg szlaku UPR w modelu chorób nowotworowych był ISRIB charakteryzujący się dobrą przepuszczalnością bariery krew-mózg (Carmela Sidrauski, Diego Acosta-Alvear, Arkady Khoutorsky, Punitha Vedantham, Brian R. Hearn, Han Li, Karine Gamache, Ciara M. Gallagher, Kenny K.-H. Ang, Chris Wilson, Voytek Okreglak, Avi Ashkenazi, Byron Hann, Karim Nader, Michelle R. Arkin, Adam R. Renslo, Nahum Sonenberg, Peter Walter. Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory. *Cell biology | Neuroscience* 2013;2:1–22).

Prace opublikowane przez zespół Marka Halliday oraz zespół Heather L. Smith donoszą, iż ISRIB pomimo swego efektu neuroprotekcijnego oraz niskiej cytotoksyczności charakteryzował się słabą rozpuszczalnością, dlatego nie może on stanowić inhibitora szlaku UPR skutecznego w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Mark Halliday, Helois Radford, Karlijn A. M. Zents, Collin Molloy, Julie A. Moreno, Nicholas C. Verity, Ewan Smith, Catharine A. Ortori, David A. Barrett, Martin Bushell and Giovanna R. Mallucci. Repurposed drugs targeting eIF2 α -P-mediated translational repression prevent neurodegeneration in mice *BRAIN* 2017: 140; 1768–1783, Heather L. Smith and Giovanna R. Mallucci. The unfolded protein response: mechanisms and therapy of neurodegeneration. *BRAIN* 2016: 139; 2113–2121).

Powyższe przykłady wskazują, że dotychczas zidentyfikowane związki o potwierdzonych właściwościach inhibitora PERK nie mogą być stosowane w leczeniu ze względu na cytotoksyczność lub niską rozpuszczalność. Istnieje zatem potrzeba znalezienia skutecznego inhibitora PERK o niskiej i/lub znikomej cytotoksyczności, który mógłby znaleźć zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób neurodegeneracyjnych opartych na mechanizmie inhibicji PERK, w szczególności jaskry.

Znane związki niskocząsteczkowe zdeponowane są w szeregu baz i bibliotek, takich jak baza LDDN (ang. Laboratory for Drug Discovery in Neurodegeneration) czy amerykańska biblioteka związków niskocząsteczkowych NCI (ang. National Cancer Institute). Jednym ze wspomnianych znanych związków niskocząsteczkowych jest zdeponowany w bibliotece NCI związek nr 42233 o nazwie systematycznej: 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion.

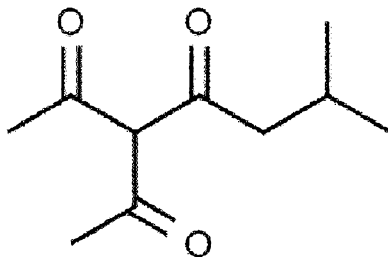
Ze stanu techniki znane jest zgłoszenie US2011230564 A1 ujawniające, że 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion posiada właściwości inhibitora translokazy 4 adeninowej nukleotydu 4 (ang. adenine nucleotide translocase 4 – ANT4) i może być stosowany w leczeniu osobnika cierpiącego lub podatnego

na zaburzenie lub chorobę związaną z proliferacją komórek, takich jak nowotwory. Ponadto dokument US2011230564 A1 ujawnia, że 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion może być przydatny we wspomaganiu metod antykoncepcji poprzez zmniejszanie lub eliminowanie męskich spermatocytów meiotycznych (bez uszkodzania innych typów komórek) u osobnika.

Celem wynalazku jest zapewnienie skutecznego związku, który można by stosować w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób neurodegeneracyjnych opartych na mechanizmie inhibicji PERK, w szczególności jaskry, jak również zastosowanie takiego związku do wytwarzania wyrobu medycznego oraz leku do zapobiegania i/lub leczenia tego rodzaju chorób.

Istotą wynalazku jest związek o wzorze 1:

Wzór 1



do zastosowania w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób zależnych od stresu retikulum endoplazmatycznego wybranych z grupy obejmującej jaskrę, chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona.

Korzystnie związek o wzorze 1 ma postać soli.

Przy czym, w rozumieniu wynalazku przez inhibitor kinazy PERK rozumie się związek hamujący działanie transmembranowej kinazy retikulum endoplazmatycznego PERK (z ang. protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase).

Niniejszy wynalazek dostarcza szeregu następujących korzyści:

- Zastrzegany związek stanowi selektywny, skuteczny inhibitor PARK;
- Zastrzegany związek nie jest cytotoksyczny;
- Synteza związku nie jest skomplikowana oraz nie wymaga użycia drogiej aparatury, co stanowi ogromną zaletę dla otrzymywania związku na skalę przemysłową.

Syntezę oraz wyniki badań własności związku (I) przedstawiono na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia syntezę 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu, gdzie (A) przedstawia powstanie 6-metyloheptano-2,4-dionu, a (B) przedstawia przekształcenie 6-metyloheptano-2,4-dionu do 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu; fig. 2 przedstawia wyniki dokowania molekularnego dla 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu; fig. 3 ilustruje analizę poziomu fosforylacji PERK i eIF2 α in vitro w obecności 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu oznaczonego jako 42233; fig. 4 przedstawia analizę aktywności 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu oznaczonego jako 42233 w astrocytach szczurzych DI TNC1; fig. 5 przedstawia analizę poziomu fosforylacji eIF2 α w odpowiedzi na działanie 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu oznaczonego jako 42233 w ludzkich komórkach embrionalnych nerki; fig. 6 przedstawia analizę poziomu fosforylacji eIF2 α w odpowiedzi na działanie 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu oznaczonego jako 42233 w fibroblastach mysich; fig. 7 przedstawia analizę poziomu fosforylacji PERK w odpowiedzi na 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion oznaczony jako 42233 w mysich komórkach neuronalnych CATH.a; fig. 8 przedstawia analizę poziomu białka CHOP oraz fosforylacji eIF2 α w odpowiedzi na działanie 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu oznaczonego jako 42233 w astrocytach szczurzych DI TNC1; fig. 9 przedstawia ocenę cytotoksyczności 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu w astrocytach szczurzych DI TNC1 poddanych inkubacji 3, 16, 24 oraz 48-godzinnej, gdzie cytotoksyczność oznaczono za pomocą testu XTT; fig. 10 przedstawia ocenę wpływu 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu na poziom apoptozy w astrocytach szczurzych DI TNC1 metodą cystometrii przepływowej; fig. 11 przedstawia analizę cyklu komórkowego w odpowiedzi na 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion w komórkach DI TNC1 po 24-godzinnej inkubacji.

Wynalazek szczegółowo przedstawiono w poniższych przykładach wykonania, przy czym wszystkie opisane poniżej testy i procedury doświadczalne przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów testowych, odczynników i aparatury, postępując zgodnie z zaleceniami producentów stosowanych zestawów, odczynników i aparatury, o ile nie wskazano wyraźnie inaczej. Wszelkie

parametry testowe mierzono z zastosowaniem standardowych, powszechnie znanych metod stosowanych w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek.

Przykład 1

Synteza 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233)

3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion (związek 42233) można otrzymywać znanymi sposobami.

W tym przykładzie wykonania wióry magnezowe (26,7 g), absolutny etanol (135 ml) i tetrachlorek węgla (5 ml) umieszczono w okrągłodennej kolbie o pojemności 2 litrów i delikatnie ogrzewano do czasu ustąpienia wydzielania się wodoru. Suchy benzen (200 ml) dodano do mieszaniny i kontynuowano ogrzewanie, aż wydzielanie gazu ustało całkowicie (około 4 godzin). Eter dietylowy (500 ml) dodano do ochłodzonej mieszaniny, a następnie dodano octooctan tert-butyłu (161 g), z taką szybkością, aby utrzymać łagodny refluks. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia przez dodatkowe 30 minut. Mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i potraktowano chlorkiem izowalerylu (120,5 g) przez jego powolne dodawanie.

Po zakończeniu reakcji mieszaninę ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę i pozostawiono na noc. Roztwór ochłodzono w łaźni lodowej i potraktowano 5 M kwasem siarkowym (200 ml) i ilością wody wystarczającą do rozpuszczenia osadu. Warstwę organiczną oddzielono, a fazę wodną dalej ekstrahowano eterem (3 × 50 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto nasyconym roztworem chlorku sodu (3 × 200 ml) i wysuszono nad siarczanem sodu. Rozpuszczalniki usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały olej potraktowano kwasem p-toluenosulfonowym (1,2 g) i ogrzewano w 150°C aż do ustania wydzielania się dwutlenku węgla (około 2 godziny).

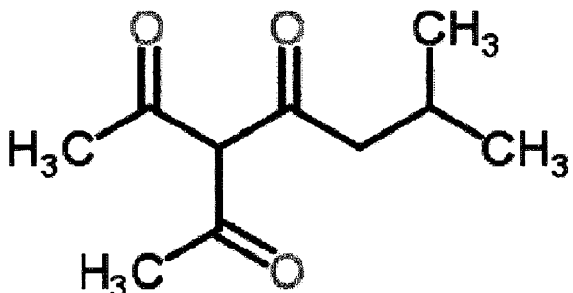
Produkt oczyszczono przez destylację i zebrano w postaci jasnożółtego oleju (78,9 g; wydajność reakcji wynosi 56%), temperatura wrzenia 178–188°C; IR (bez dodatków): ν 1615 cm^{-1} (s, sh, C = O).

Otrzymany w ten sposób 6-metyloheptano-2,4-dion potraktowano następnie etenonem, otrzymując 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion.

Bezwodny węglan potasu (95 g) dodano do mieszaniny 6-metylo-2,4-heptanodionu 25c (30,83 g) i etenonu (47,44 g) w acetonie czystości klasy odczynnikowej (140 ml). Mieszaninę energicznie mieszano pod chłodnicą zwrotną w 80°C przez noc. Ochłodzoną mieszaninę przesączono i stały węglan potasu przemyto obficie acetonem. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały olej oczyszczono przez destylację, otrzymując pożądaną diketon w postaci jasnożółtego oleju (25,59 g; 76%), temperatura wrzenia 150–152°C.

Syntezę związku 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu według przykładu wykonania zilustrowano na fig. 1, a podstawowe dane dotyczące tego związku przedstawiono poniżej w tabeli 1.

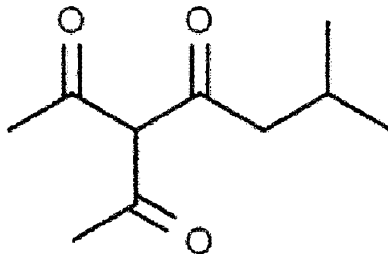
Tabela 1
Podstawowe dane dotyczące 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu

Nazwa produktu	3-acetylo-6-metyloheptano-2,4-dion
Formuła molekularna	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$
Waga molekularna	184,2322
InChI	InChI = 1 / C10H16O3 / c1-6 (2) 5-9 (13) 10 (7 (3) 11) 8 (4) 12 / h6,10H, 5H2,1-4H3
Numer rejestru CAS	6303-07-7
Struktura molekularna	

Przykład 2

Wstępne ustalenie mechanizmu działania za pomocą dokowania molekularnego

W celu wstępnego potwierdzenia mechanizmu działania 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) o wzorze 1:



Wzór 1

przeprowadzono wirtualny screening, polegający na komputerowym dokowaniu.

Strategia poszukiwania efektywnego inhibitora PERK zgodna była z metodologią komputerowo wspomaganego projektowania leków (computer-aided drug design, CADD). Badania obejmowały wirtualny screening (virtual screening, VS), który jest komputerową techniką automatycznego przeszukiwania i oceny potencjalnej aktywności biologicznej (rankingowania) dużych baz danych związków chemicznych przy użyciu narzędzi chemoinformatycznych, bioinformatycznych i modelowania molekularnego.

W tym przykładzie wykonania przeprowadzono przeszukiwanie i analizę potencjalnych niskocząsteczkowych związków o nieznanych właściwościach opartą o znaną i/lub przewidzianą strukturę receptora (structure-based virtual screening, SBVS), w toku dokowania komputerowego bazy >200 000 związków zawartych w bibliotece niskocząsteczkowych związków National Cancer Institute (NCI) oraz Laboratory for Drug Discovery in Neurodegeneration (LDDN). W tym celu posłużono się dostępną strukturą kinazy PERK (Homo sapiens, 4YJZS) z bazy danych Protein Data Bank (RCSB PDB): <http://www.rcsb.org/structure/4YJZS>.

Następnie, projektowanie inhibitorów przeprowadzono w oparciu o struktury znanych ligandów (ligand based design) i analizę właściwości przestrzennych pól – 3D QSAR (3D quantitative structure-activity relationship). W tym celu wykorzystano oprogramowanie Open3d qsar. Pozwoliło to na opracowanie 80 000 niskocząsteczkowych związków o potencjalnych właściwościach inhibicyjnych w stosunku do kinazy PERK.

Następnie analizowano in silico struktury pochodnych 80 000 pochodnych inhibitora kinazy PERK. Celem tej części etapu było wyselekcjonowanie związku o wysokich właściwościach inhibicyjnych względem kinazy PERK charakteryzującym się najniższym współczynnikiem Docking Score. Ponadto, oceniano właściwości fizykochemiczne potencjalnej substancji leczniczej, które decydują o szybkości rozpuszczania, jak i szybkości przenikania przez błony biologiczne, a w efekcie o prawdopodobieństwie osiągnięcia w miejscu działania stężenia uznanego za terapeutyczne.

Modyfikacje przeprowadzono z zastosowaniem teorii Bioizosteryzmu. Bioizostery to podstawniki lub grupy wykazujące podobieństwo właściwości fizycznych i na ogół biologicznych. Bioizosteryzm można wykorzystać do modyfikacji struktury wiodącej, co okazało się skutecznym sposobem zmniejszania toksyczności czy zmian aktywności struktury wiodącej. Teorię opracował w 1925 roku Grimm, który sformułował prawo zastąpienia wodorku. Wszystkie modyfikacje struktury o przeprowadzone były zgodnie z regułami zaproponowanymi przez Lipińskiego i wsp., które posłużyły do stworzenia tak zwanej reguły 5. Reguła ta głosi, że potencjalny związek leczniczy powinien charakteryzować się masą molową <500 MW, współczynnikiem podziału pomiędzy dwie niemieszające się wzajemnie fazy (n-oktanol/woda) $\log P < 5$, liczbą donorów wiązania wodorowego (liczbą heteroatomów połączonych z co najmniej jednym atomem H) HBD <5 oraz liczbą akceptorów wiązania wodorowego (sumaryczną liczbą heteroatomów) HBA <10.

Uzyskane wartości docking score (fig. 2) dla badanego związku potwierdzają, że posiada on dobre parametry wiązania ligand-receptor.

Przedmiotem dalszych analiz było potwierdzenie aktywności badanego związku w teście kinazowym in vitro z zastosowaniem izotopu P32 (fig. 3).

W toku kolejnych badań przesiewowych, opartych na (a) teście radiometrycznym teście kinazowym oraz (b) teście TRF-FRET został wyłoniony związek o najsilniejszych właściwościach inhibicyjnych aktywności kinazy PERK oraz jej głównego substratu eIF2 α , który został poddany dalszym analizom.

(a) Radiometryczna reakcja kinazowa (Radiometrie Kinase Reaction)

Aby scharakteryzować kinetykę enzymu i ustalić optymalne warunki testu, został zastosowany test radiometryczny. W wyniku optymalizacji reakcji ustanowiono następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM HEPES (pH 7,2), 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl i 0,01% Tween 20 i 1 μ M ATP/1 μ Ci [γ -33P] ATP, 1 μ M eIF2 α z 8 nM PERK.

Reakcję prowadzono przez 90 minut w temperaturze pokojowej i zatrzymywana za pomocą 75 mM kwasu fosforowego. Mieszaniny reakcyjne przenoszono na płytki do filtracji PH Multiscreen (Merck), po czym przeprowadzano intensywne płukanie. Płytki filtracyjne suszono, a formulacja była oznaczona ilościowo za pomocą licznika scyntylicyjnego. Tło (kontrola negatywna) dla formulacji produktu było badane w takiej samej mieszaninie reakcyjnej bez obecności białka PERK. Optymalne stężenie enzymu określano przy wartości, dla której wykres postępu reakcji tworzenia fosfo-eIF2 α był liniowy przez co najmniej 60 minut.

(b) TR-FRET oraz HTS (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Base Assay and HTS)

W celu screeningu biblioteki związków małowymagających wykorzystano test TR-FRET ($Z > 0,7\%$ współczynnik zmienności [CV] kontroli negatywnej i pozytywnej $< 10\%$ i sygnał / poziom tła [S/B] wynoszący 2,45) wykonywany na płytkach 384-dołkowych. Test ten umożliwia pomiar bezpośredniej fosforylacji eIF2 α – specyficznego substratu dla kinazy PERK z użyciem fosfo-specyficznego przeciwciała skoniugowanego z fluorescencyjnym donorem kryptatu Europem (Eu3+). Test kinazy TR-FRET przeprowadzono w buforze zawierającym 20 mM HEPES (pH 7,2), 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl i 0,01% Tween 20. Wszystkie odczynniki reakcji kinazowej, takie jak PERK, eIF2 α i ATP, przygotowano w tym samym buforze. Enzym PERK (w końcowym stężeniu określonym przy pomocy radiometrycznego testu kinazowego) preinkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej z badanymi potencjalnymi inhibitorami (stężenie końcowe 10 μ M) w objętości 2 μ l. Po wstępnej inkubacji dodawano 1 μ l mieszaniny eIF2 α /ATP w celu zainicjowania reakcji kinazy (stężenie końcowe 1 μ M substratu eIF2 α oraz 1 μ M ATP) i prowadzono inkubację przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Analizę przeprowadzano z wykorzystaniem eIF2 α i ATP w stężeniu równym K_m , co umożliwia identyfikację inhibitorów zarówno kompetycyjnych, jak i niekompetycyjnych. Reakcja enzymatyczna była następnie zatrzymywana za pomocą przeciwciał p-eIF2 α (S51) -Eu3+ oraz Flag-d2, które rozpuszczone były w homogenicznym buforze HTRF Transcreeper buffer (Cisbio) zawierającym 60 mM EDTA i inkubowane 60 min (końcowa objętość 6 μ l). Zastosowana metoda wykrywania opiera się na fosfospecyficznych przeciwciałach skierowanych przeciwko eIF2 α wyznakowanych fluorescencyjnym dawcą kryptatu europu (Eu3+) o przedłużonej trwałości i przeciwciałach antyflagowych znakowanych HTRF-akceptorowym fluoroforem d2. Do pomiaru sygnału FRET stosowano czytnik płytek Synergy HT (BioTek).

Analiza danych: Wartość K_m dla ATP była obliczona na podstawie równania Michaelisa-Mentena. Wartość K_m dla eIF2 α była analizowana za pomocą równania Hill. Dane opracowano za pomocą oprogramowania SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA) lub GraphPad Prism (oprogramowanie GraphPad, La Jolla, CA).

Przykład 3

Analiza poziomu fosforylacji PERK oraz eIF2 α w komórkach ssaczych w odpowiedzi na obecność 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu

Do oceny aktywności biologicznej 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) w komórkach wyselekcjonowano 5 linii komórkowych dobranych w taki sposób, by możliwie najlepiej reprezentowały zarówno tkanki uwikłane w procesy neurodegeneracyjne oraz działanie szlaku PERK/eIF2 α :

- SH-SY5Y linia morfologicznie uznawana za neuronalną, używana powszechnie w badaniach nad Chorobą Alzheimera oraz Parkinsona;
- CATH.a wyprowadzone z mózgu, komórki neuronalne mysie;
- DI TNC1 wyprowadzone z mózgu szczurzego astrocyty;
- NHA – astrocyty ludzkie;
- 293T – ludzkie komórki embrionalne nerek;
- 3T3T – fibroblasty mysie.

Początkowo na badanych liniach komórkowych 3T3T, SHY5Y, CATH.a oraz DI TNC1) przeprowadzono test cytotoxyczności 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) stosowanego przez 2 h w następujących stężeniach: 0,4 μ M, 0,8 μ M, 1,6 μ M, 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M oraz 50 μ M. Jako grupę odniesienia wykorzystano komórki nietraktowane inhibitorem ani tapsygarginą i ich żywotność oznaczono jako 100%. Analiza statystyczna nie wykazała istotnego spadku żywotności badanych komórek nawet w najwyższych stężeniach.

Następnie przeprowadzono analizę aktywności związku 42233 w następujących stężeniach:

- 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M, 25 μ M oraz 50 μ M – dla linii DI TNC1 oraz CATH;
- 10 μ M oraz 50 μ M – dla linii 293T oraz 3T3T.

Dobór kontroli do doświadczenia:

- Kontrola doświadczenia – to komórki nietraktowane inhibitorem ani tapsygarginą;
- Kontrolny znany inhibitor o znanym działaniu – to tapsygargina w stężeniu 500 nM;
- Białko kontrolne – to β -aktyna.

Badanie inhibicji kinazy PERK z zastosowaniem linii komórkowych *in vitro* (eIF2 α) przebiegało następująco. Komórki zostały poddane 1-godzinnej preinkubacji z testowanym inhibitorem PERK, w szeregu stężeń 3 μ M – 50 μ M, a następnie w celu aktywacji wewnątrzkomórkowego stresu Retikulum Endoplazmatycznego były traktowane tapsygarginą w stężeniu 500 nM i inkubowane przez 2 godziny. Do przeprowadzonych doświadczeń kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane wyłącznie tapsygarginą (500 nM), natomiast kontrolę ujemną komórki nie traktowane żadnym ze związków. W celu przygotowania analizowanych próbek komórki zbierano, a następnie poddawano lizie przy użyciu buforu EBC (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40) suplementowanego koktajlem inhibitora proteazy i fosfatazy. Homogenat zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Pomiaru stężenia ogólnej ilości białka w analizowanych próbach dokonano metodą Bradforda. Aby wyznaczyć stężenie białka w badanych próbach, wykonano krzywą kalibracyjną (wzorcową) przy użyciu szeregu rozcieńczeń surowiczej albuminy bydlęcej. Analizowane próby zostały rozcieńczone buforem EBC, a następnie zmieszane w stosunku 1 : 1 z buforem denaturującym 2 $\times$ Laemmli zawierającym 2-merkaptoetanol. Następnie próby zostały poddane denaturacji w temperaturze 95°C przez 10 minut. Próby zawierające 80 μ g całkowitego białka zostały poddane rozdzielowi elektroforetycznemu w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w aparacie do elektroforezy pionowej. Po rozdzielu elektroforetycznym białka zostały przeniesione na aktywowaną w metanolu membranę PVDF. Po transferze membrana z białkami została wybarwiona 0,1% roztworem Ponceau-S w celu uwidoczniania frakcji białek. Barwnik został usunięty w wyniku trzykrotnego płukania w roztworze TBST zawierającego 0,05% Tween 20. W celu uwidocznienia wszystkich analizowanych białek membrana została przecięta na odpowiednich wysokościach. Następnie membrany blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w 5% roztworze odtłuszczonego mleka krowiego sporządzonego w roztworze TBST zawierającego 0,05% Tween 20. W kolejnym etapie membrany inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 4°C ze specyficznymi I-rzędowymi przeciwciałami: p-eIF2 α , eIF2 α , β -aktyna, a następnie przez 1 godzinę z II-rzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową. Detekcja kompleksów immunologicznych została przeprowadzona przy użyciu zestawu chemiluminescencyjnego ECL. Wyniki zostały zwizualizowane na niebieskoczułych kliszach rentgenowskich. Pomiar densytometryczny prążków został wykonany przy użyciu oprogramowania Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK). Ilość białka normalizowano względem sygnału otrzymanego dla β -aktyny stanowiącej białko referencyjne.

W przypadku analizy na astrocytach szczurzych wykazano ponad 50% inhibicję fosforylacji eIF2 α dla stężeń 25 μ M oraz 50 μ M (fig. 4). Podobne rezultaty uzyskano w fibroblastach mysich oraz ludzkich komórkach embrionalnych nerek (fig. 5 oraz fig. 6). W przypadku mysich komórek neuronalnych wykazano pełną inhibicję PERK dla wszystkich użytych stężeń (fig. 7). Ostatecznie, analiza densytometryczna poziomu fosforylacji eIF2 α w odpowiedzi na 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion (związek 42233) dla wybranych linii: mysich komórek neuronalnych CATH.a, astrocytów szczurzych DI TNC1 oraz astrocytów ludzkich NHA wykazała znaczący spadek poziomu fosforylacji tego białka, a tym samym skuteczność hamowania aktywności kinazy PERK dla analizowanych stężeń inhibitora od 3 μ M do 50 μ M, w zakresie 15–49% w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych tylko tapsygarginą.

Przykład 4

Wpływ 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) na poziom CHOP w komórkach nerwowych

Obok globalnego ograniczenia syntezy białek poprzez fosforylację eIF2 α , drugim efektem odpowiedzi zależnej od PERK jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego ATF4, który aktywuje szereg genów w tym pro-apoptotyczny CHOP. Inhibicja PERK może zatem nieść podwójną korzyść, dodatkowo zapobiegając degeneracji tkanki nerwowej na drodze apoptozy.

W celu oceny wpływu 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (oznaczonego jako związek 42233) na poziom CHOP w komórkach nerwowych zaprojektowano następujące doświadczenie. Komórki zostały poddane 1-godzinnej preinkubacji z testowanym inhibitorem PERK, w szeregu stężeń 3 μ M – 50 μ M, a następnie w celu aktywacji wewnątrzkomórkowego stresu Retikulum Endoplazmatycznego były traktowane tapsygarginą w stężeniu 500 nM i inkubowane przez 2 godziny. Do przeprowadzonych doświadczeń kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane wyłącznie tapsygarginą (500 nM), natomiast kontrolę negatywną komórki nie traktowane żadnym ze związków. W celu przygotowania analizowanych próbek komórki zbierano, a następnie poddawano bzie przy użyciu buforu EBC (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40) suplementowanego koktajlem inhibitora proteazy i fosfatazy. Homogenat zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Pomiaru stężenia ogólnej ilości białka w analizowanych próbkach dokonano metodą Bradforda. Aby wyznaczyć stężenie białka w badanych próbkach, wykonano krzywą kalibracyjną (wzorcową) przy użyciu szeregu rozcieńczeń surowiczej albuminy bydlęcej. Analizowane próby zostały rozcieńczone buforem EBC, a następnie zmieszane w stosunku 1 : 1 z buforem denaturującym 2 $\times$ Laemmli zawierającym 2-merkaptioetanol. Następnie próby zostały poddane denaturacji w temperaturze 95°C przez 10 minut. Próby zawierające 80 μ g całkowitego białka zostały poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w aparacie do elektroforezy pionowej. Po rozdzielaniu elektroforetycznym białka zostały przeniesione na aktywowaną w metanolu membranę PVDF. Po transferze membrana z białkami została wybarwiona 0,1% roztworem Ponceau-S w celu uwidocznienia frakcji białek. Barwnik został usunięty w wyniku trzykrotnego płukania w roztworze TBST zawierającego 0,05% Tween 20. W celu uwidocznienia wszystkich analizowanych białek membrana została przecięta na odpowiednich wysokościach. Następnie membrany blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w 5% roztworze odtłuszczonego mleka krowiego sporządzonego w roztworze TBST zawierającego 0,05% Tween 20. W kolejnym etapie membrany inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 4°C ze specyficznymi I-rzędowymi przeciwciałami: p-eIF2 α , eIF2 α , CHOP, β -aktyna, a następnie przez 1 godzinę z II-rzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową. Detekcja kompleksów immunologicznych została przeprowadzona przy użyciu zestawu chemiluminescencyjnego ECL. Wyniki zostały zwizualizowane na niebieskoczułych kliszach rentgenowskich. Pomiar densytometryczny prążków został wykonany przy użyciu oprogramowania Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK). Ilość białka normalizowano względem sygnału otrzymanego dla β -aktyny stanowiącej białko referencyjne.

Wykazano, iż w astrocytach szczurzych 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion (oznaczony na fig. 8 jako związek 42233) powodował spadek poziomu CHOP o 15, 30, 45, 50 oraz 70% kolejno dla stężeń 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M, 25 μ M, 50 μ M.

Przykład 5

Ocena niepożądanego wpływu 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu na komórki ssacze

Kolejną podejmowaną kwestią było określenie, czy analizowany inhibitor jako efekt uboczny może działać w sposób niepożądany na komórkę. Aby odpowiedzieć na stawiane pytanie, przeprowadzono szereg eksperymentów pod kątem pomiaru cytotoksyczności, przebiegu cyklu komórkowego oraz możliwości indukcji programowanej śmierci komórki na drodze apoptozy.

(a) Ocena żywotności komórek pod wpływem 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu – analiza XTT

W pierwszej kolejności dokonano ponownej analizy cytotoksyczności 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) za pomocą kolorymetrycznego testu XTT opartego na redukcji soli tetrazolowej do formazanu w warunkach długotrwałej ekspozycji na inhibitor po 3, 16, 24, oraz 48 godzinach przy w zakresie stężeń od 0,75 μ M do skrajnie wysokiego 0,5 mM. Doświadczenie przebiegało następująco. Komórki zostały zasiane na 96-dołkowej płytce do hodowli komórkowych w odpowiedniej pożywce hodowlanej w stężeniu 8×10^6 komórek. Następnie komórki traktowano inhibitorem PERK w szeregu stężeń 0,75 μ M – 50 μ M oraz 0,5 mM. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki nie traktowane analizowanym inhibitorem PERK, natomiast kontrolę negatywną komórki traktowane 100% DMSO.

W celu oceny cytotoksyczności rozpuszczalnika dla testowanego inhibitora komórki poddano inkubacji z 0,01% DMSO. Każda z analizowanych prób została wykonana w trzech powtórzeniach. Komórki inkubowano w czasie 3, 16, 24 oraz 48 godzin. Następnie do każdej próby dodano po 25 μ L mieszaniny XTT/PMS. Komórki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności. Absorbancja została zmierzona przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika płytek Synergy HT (BioTek).

Uzyskane wyniki wykazały brak istotnego statystycznie spadku żywotności (fig. 9), a zatem należy stwierdzić, że badany związek nie jest toksyczny dla komórek linii DI TNC1.

(b) Ocena indukcji apoptozy przez 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodion

Analiza poziomu apoptozy w komórkach traktowanych inhibitorem PERK (tj. związkiem 42233) została dokonana za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu podwójnego barwienia Aneksyną V (Ann-V) oraz jodkiem propidyny (PI).

Dobór kontroli do doświadczenia:

- Kontrola doświadczenia – komórki traktowane DMSO, stanowiącego rozpuszczalnik dla 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (tj. związku 42233);
- Staurosporyna – jako znany inhibitor kinaz białkowych oraz znany czynnik proapoptyczny.

Komórki poddano 1-godzinnej preinkubacji z inhibitorem PERK (tj. związkiem 42233) w stężeniach 6 μ M oraz 50 μ M, a następnie traktowano tapsygarginą, jako aktywatorem stresu Retikulum Endoplazmatycznego w stężeniu 500 nM. Następnie komórki zostały poddane 24 godzinnej inkubacji. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane 1 μ M staurosporyną, jako induktorem apoptozy, a następnie inkubowane w czasie 16 godzin, natomiast kontrolę negatywną stanowiły komórki nie traktowane żadnym ze związków i inkubowane w czasie 24 godzin. Dodatkową kontrolę stanowiły komórki poddane 24 godzin inkubacji z 0,01% DMSO, stanowiącego rozpuszczalnik dla testowanego inhibitora PERK. Następnie, komórki zostały zebrane oraz przepłukane w 1 $\times$ DPBS, a następnie w stężeniu 1 $\times$ 10⁶ /mL zawieszone w 1 $\times$ buforze Binding Buffer. 1 $\times$ 10⁵ komórek przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf, a następnie wybarwiono 5 μ L Ann-V oraz 5 μ L PI. Po 15 min inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej próby rozcieńczano 400 μ L 1 $\times$ buforu Binding Buffer oraz poddano analizie cytometrycznej z zastosowaniem Cytometru przepływowego FACS Canto II (Becton Dickinson).

W wyniku przeprowadzonych badań nie zaobserwowano wpływu badanego inhibitora (związku 42233) na wzrost poziomu apoptozy w komórkach linii DI TNC1 (fig. 10) zarówno dla niskiego stężenia 6 μ M, jak i górnej granicy stosowanego w testach inhibicji stężenia 50 μ M, które wykazują porównywalne działanie do DMSO (kontroli rozpuszczalnika). Badany związek nie działa również nekrotycznie na komórki nerwowe. Wyniki analizy zostały przedstawione na fig. 10.

(c) Ocena wpływu 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu (związku 42233) na cykl komórkowy

Na ostatnim etapie przeprowadzono analizę wpływu badanego inhibitora PERK na progresję cyklu komórkowego, która została dokonana za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu barwienia jodkiem propidyny. W tym przykładzie wykonania do przeprowadzanych analiz, jako reprezentacyjne stężenia związku 42233, wybrano niskie stężenie 6 μ M, jak i górną granicę stosowaną w testach inhibicji, tj. stężenie 50 μ M.

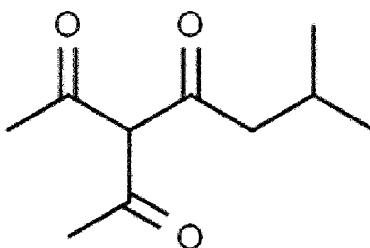
Dobór kontroli do doświadczenia:

- Kontrola doświadczenia – to komórki nietraktowane związkiem 42233 aninokodazolem;
- Nokodazol – kontrolny związek o znanym wpływie na cykl komórkowy.

Komórki na 10 cm szalkach hodowlanych traktowano inhibitorem PERK w stężeniach 6 μ M oraz 50 μ M, a następnie inkubowano przez 24 godziny. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane 1 μ M nokodazolem i inkubowane przez 18 godzin, natomiast kontrolę negatywną komórki nie traktowane żadnym ze związków. Komórki zostały zebrane i przepłukane dwa razy 1 $\times$ DPBS, a następnie utrwalone w 70% etanolu. Komórki wybarwiono mieszaniną zawierającą 50 μ g/mL PI, 0,1 mg/mL RNazy A oraz 0,6% buforu NP-40. Po 30 min inkubacji w 4°C próby badane poddano analizie cytometrycznej z zastosowaniem Cytometru przepływowego FACS Canto II (Becton Dickinson). Uzyskane dane eksperymentalne wykazały brak wpływu 3-acetylo-6-metylo-2,4-heptanodionu na przebieg cyklu komórkowego badanych komórek linii DI TNC1 (fig. 11).

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze 1:



- do zastosowania w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób zależnych od stresu retikulum endoplazmatycznego wybranych z grupy obejmującej jaskrę, chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona.
2. Związek do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że związek o wzorze 1 ma postać soli.

Rysunki

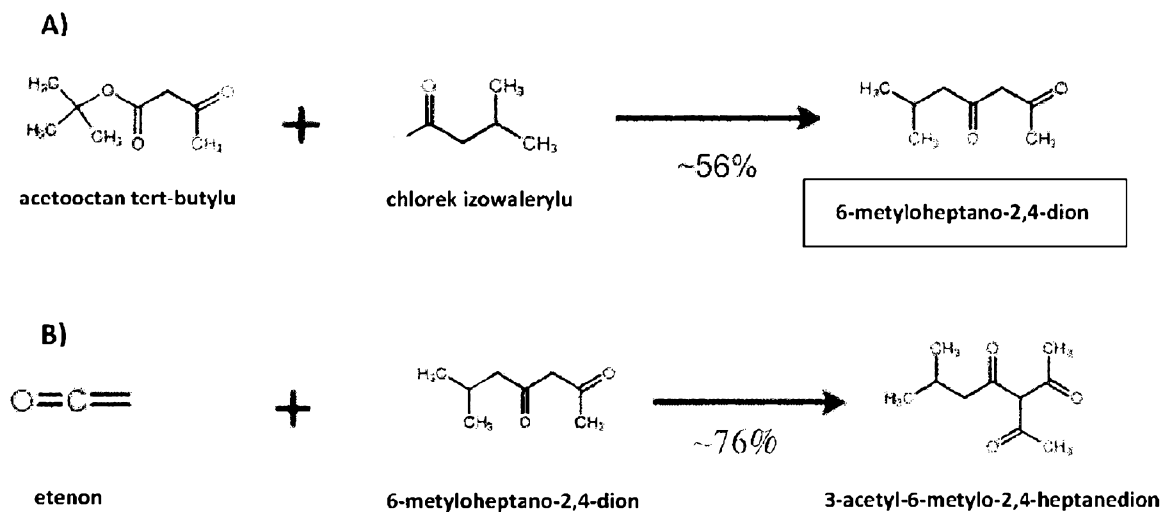


Fig. 1

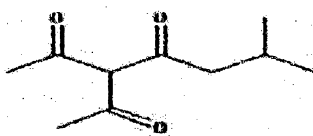
1. Docking Info:		
<u>ZINC01675057</u>		
Score:	-59,5797	MW
VDW:	-2,67043	184,2346
ES:	-56,9093	Formula
NCI:	42215	C10H16O3
CID:	<u>238068</u>	HDonors
		0
		HAcceptors
		3
		LogP
		2,41
		Available?
		Yes
		Composition
		C 65.19% H 8.75% O 26.05%

Fig. 2

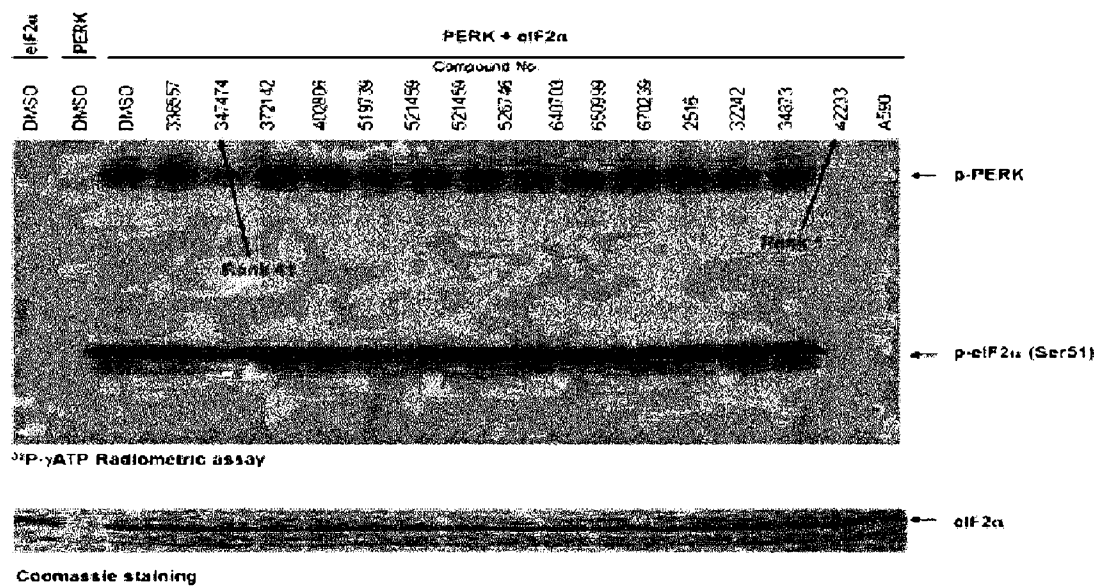


Fig. 3

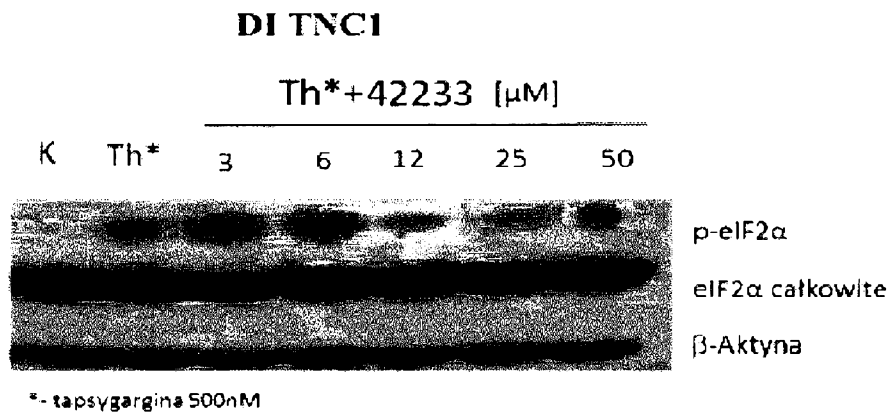


Fig. 4

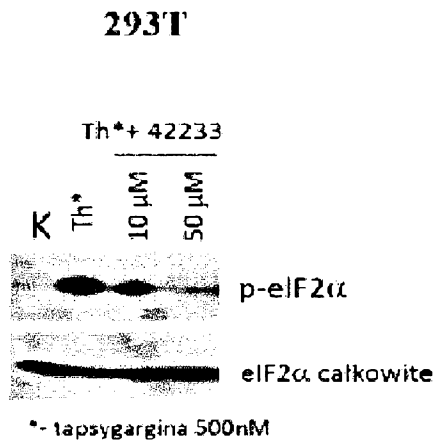


Fig. 5

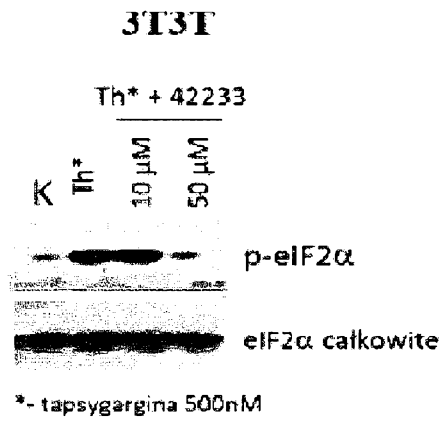


Fig. 6

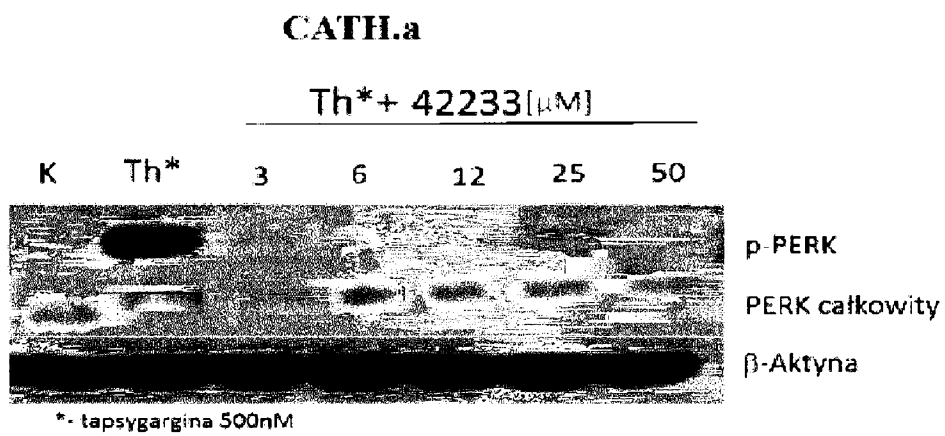


Fig. 7

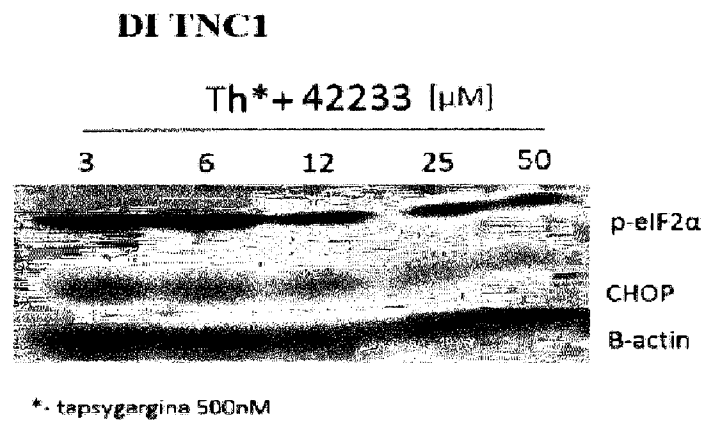


Fig. 8

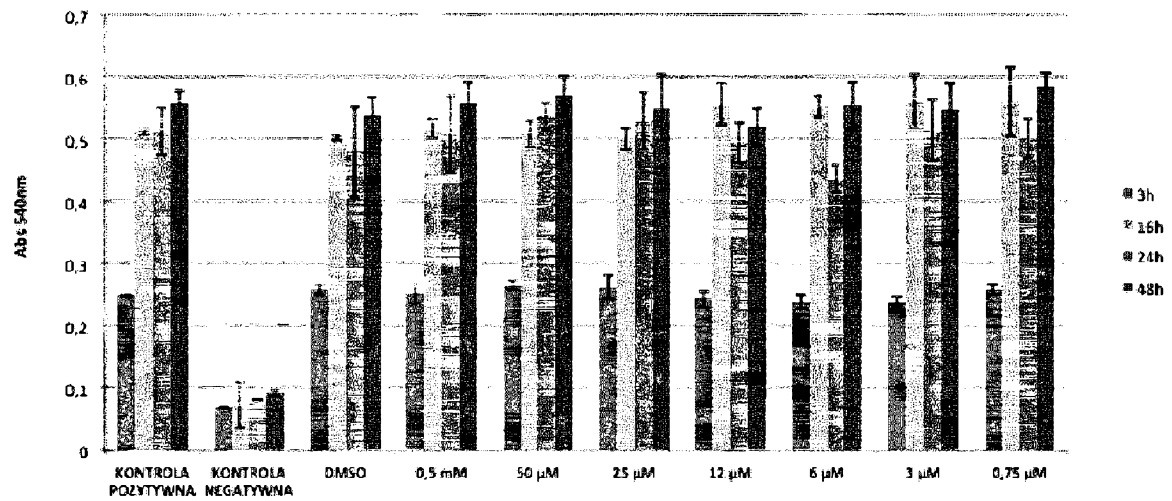


Fig. 9

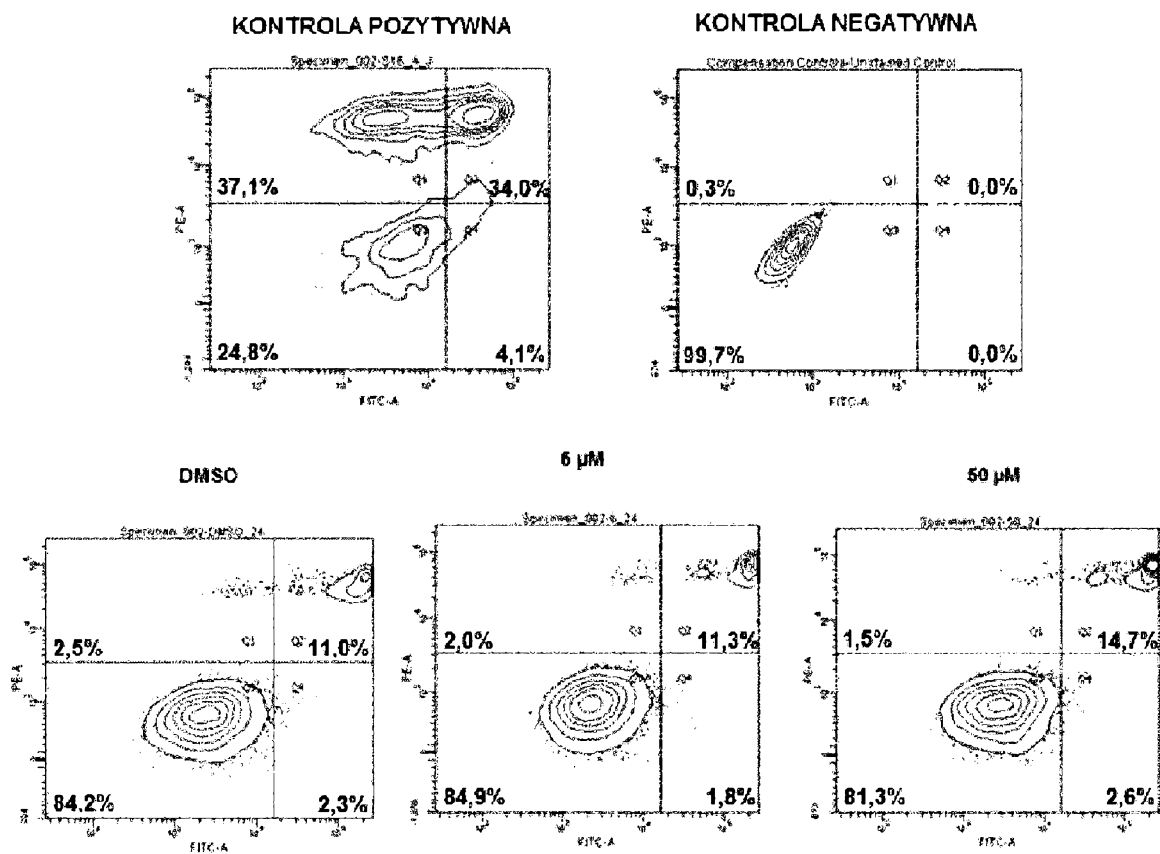


Fig. 10

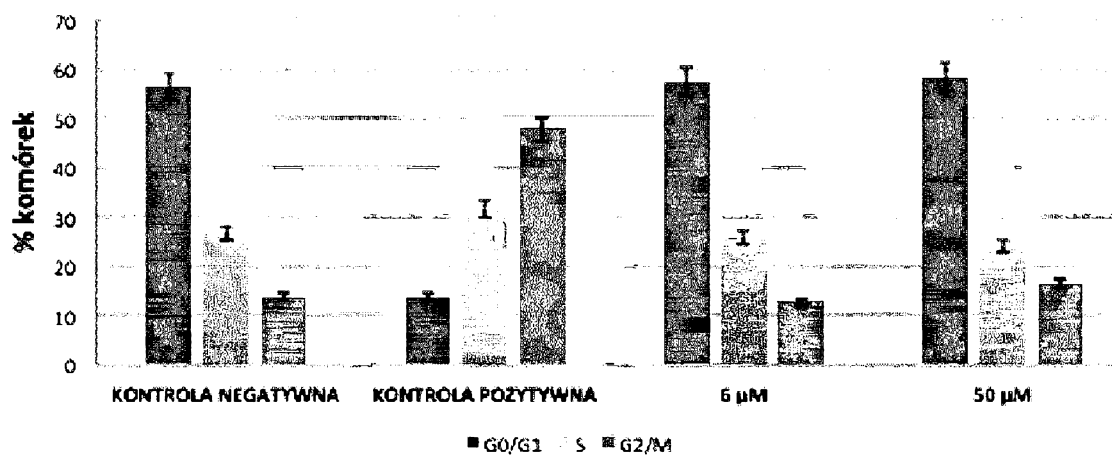


Fig. 11