



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116419924 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 11

(21) 申请号 202180066598.2

(22) 申请日 2021.09.29

(30) 优先权数据

2015536.2 2020.09.30 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/076811 2021.09.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/069552 EN 2022.04.07

(71) 申请人 韦德里斯治疗股份公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D·皮卡德 P·赛恩特-梅扎尔德

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

专利代理师 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

C07D 498/04 (2006.01)

A61K 31/5383 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

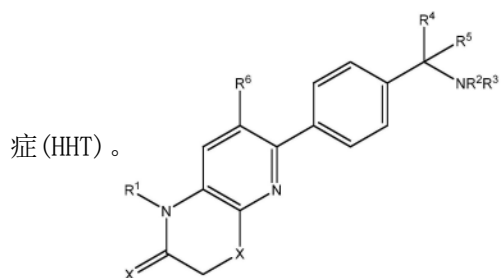
权利要求书4页 说明书28页 附图21页

(54) 发明名称

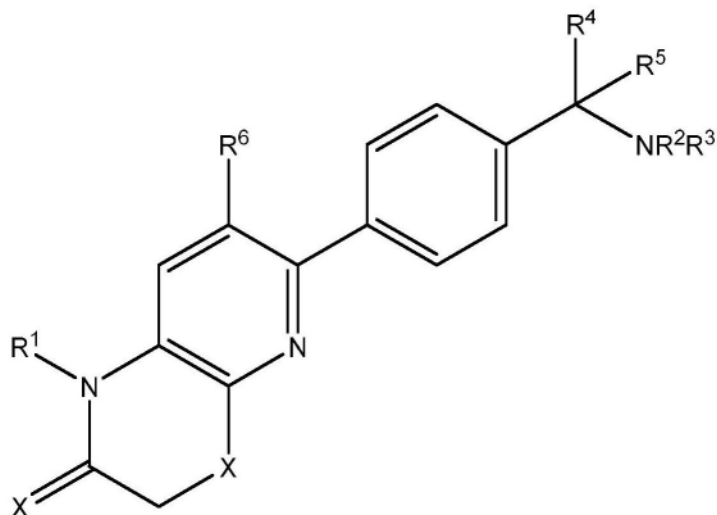
用于治疗遗传性出血性毛细血管扩张症的
变构AKT抑制剂

(57) 摘要

本发明提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗遗传性出血性毛细血管扩张



1. 一种式(I)化合物:



或其药学上可接受的盐,其用于治疗受试者的遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT),其中:

每个X独立地是O或S;

R¹选自氢和C₁-C₁₀烷基,其中每个C₁-C₁₀烷基任选地被一个或多个选自卤素、-CN、-OR⁷或3元至6元环烷基的取代基取代;

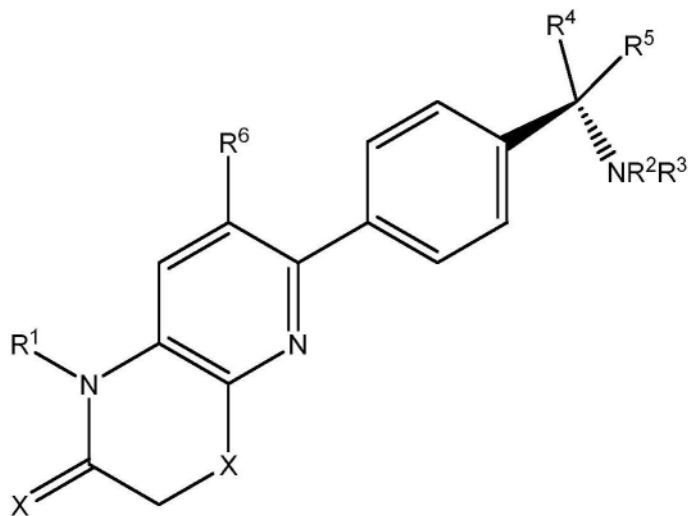
R²和R³各自独立地选自氢和C₁-C₁₀烷基;或者R²和R³与它们所连接的氮原子一起形成3元至6元杂环;

R⁴和R⁵各自独立地选自C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基;或者R⁴和R⁵与它们所连接的碳原子一起形成3元至6元环烷基环或3元至6元杂环,其任选地被一个或多个选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代;

R⁶是5元至7元芳基环或5元至7元杂芳基环,其任选地被一个或多个选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代;以及

每个R⁷独立地选自氢和C₁-C₁₀烷基。

2. 根据权利要求1所述之用途的化合物,其中所述式(I)化合物具有以下结构:



3. 根据权利要求1或2所述之用途的化合物,其中R⁶是未取代的苯基。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述之用途的化合物, 其中 R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成环丁基环。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述之用途的化合物, 其中每个X是O。

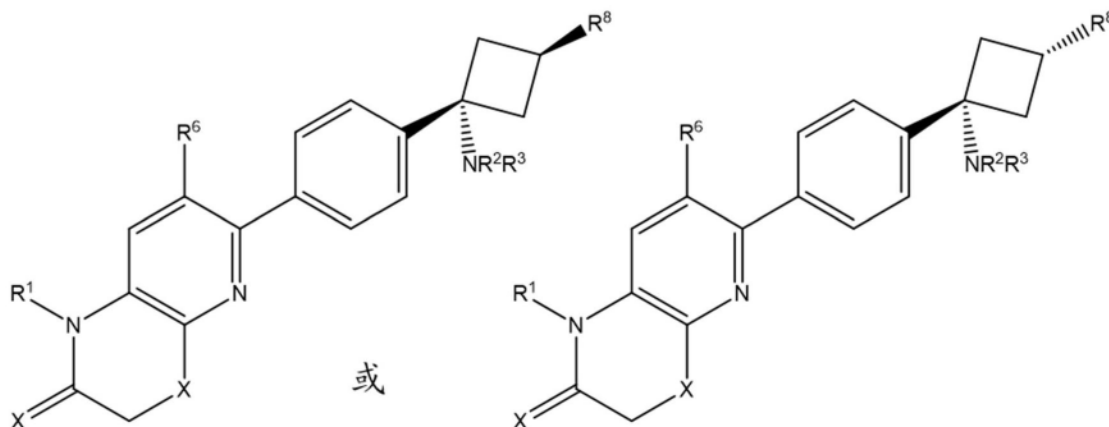
6. 根据权利要求1-5中任一项所述之用途的化合物, 其中 R^1 是 C_1 - C_6 烷基。

7. 根据权利要求6所述之用途的化合物, 其中 R^1 是甲基或乙基。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述之用途的化合物, 其中 R^1 是 $-(CH_2)_nCN$, 其中n是1、2、3、4或5。

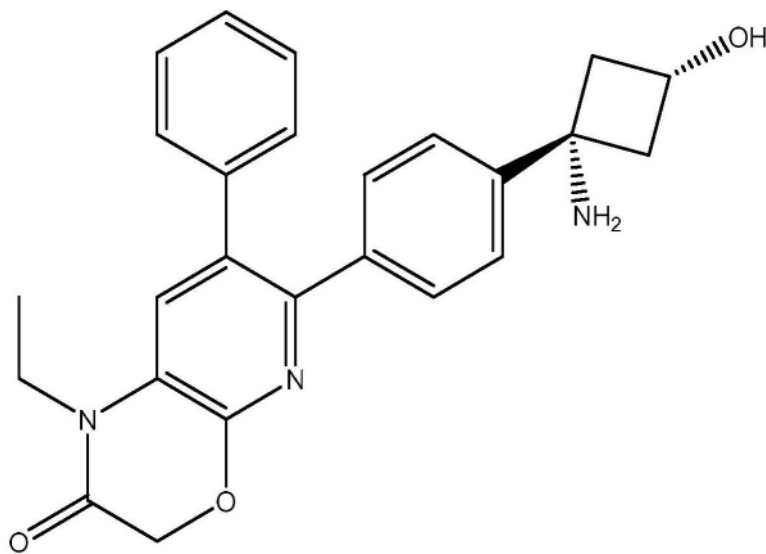
9. 根据权利要求1-8中任一项所述之用途的化合物, 其中 R^2 和 R^3 各自为氢。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述之用途的化合物, 其中所述式(I)化合物为:



或其药学上可接受的盐, 其中 R^8 选自 $-OH$ 、 $-CN$ 、卤素和 C_1 - C_6 烷基。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述之用途的化合物, 其中所述式(I)化合物为:



或其药学上可接受的盐。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述之用途的化合物, 其中所述药学上可接受的盐是酒石酸盐、甲磺酸盐或磷酸盐。

13. 根据权利要求12所述之用途的化合物, 其中所述药学上可接受的盐是酒石酸盐。

14. 根据权利要求13所述之用途的化合物, 其中所述酒石酸盐是L-酒石酸盐。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述之用途的化合物, 其中所述化合物配制用于口服施用于所述受试者。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述之用途的化合物,其中所述受试者是人。
17. 根据权利要求16所述之用途的化合物,其中所述受试者是成年人。
18. 根据权利要求17所述之用途的化合物,其中所述式(I)化合物以20mg至75mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。
19. 根据权利要求17所述之用途的化合物,其中所述式(I)化合物以10mg至50mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。
20. 根据权利要求19所述之用途的化合物,其中所述式(I)化合物以20mg至40mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。
21. 根据权利要求20所述之用途的化合物,其中所述式(I)化合物以20mg至30mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。
22. 根据权利要求1-21中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括降低与HHT相关的出血的频率、持续时间或强度。
23. 根据权利要求22所述之用途的化合物,其中所述与HHT相关的出血是胃肠(GI)出血。
24. 根据权利要求22所述之用途的化合物,其中所述与HHT相关的出血是鼻出血。
25. 根据权利要求1-24中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括增加所述受试者的血红蛋白水平。
26. 根据权利要求1-25中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的毛细血管扩张的数量。
27. 根据权利要求1-26中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减小所述受试者中的毛细血管扩张的大小。
28. 根据权利要求26或27所述之用途的化合物,其中所述毛细血管扩张是皮肤毛细血管扩张。
29. 根据权利要求26或27所述之用途的化合物,其中所述毛细血管扩张是鼻毛细血管扩张。
30. 根据权利要求26或27所述之用途的化合物,其中所述毛细血管扩张是口腔毛细血管扩张。
31. 根据权利要求26或27所述之用途的化合物,其中所述毛细血管扩张是胃肠毛细血管扩张。
32. 根据权利要求1-31中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的数量。
33. 根据权利要求1-32中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减小所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的大小。
34. 根据权利要求1-33中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括预防所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的形成。
35. 根据权利要求32-34中任一项所述之用途的化合物,其中所述动静脉畸形是肺AVM。
36. 根据权利要求32-34中任一项所述之用途的化合物,其中所述动静脉畸形是脑部(脑)AVM。
37. 根据权利要求32-34中任一项所述之用途的化合物,其中所述动静脉畸形是内脏

AVM。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减少心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括预防心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。

40. 根据权利要求1-29中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括预防所述受试者中由肺AVM诱发的右向左分流。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括降低所述受试者中由肺AVM诱发的右向左分流的程度。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减少所述受试者对铁补充的需要。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括减少所述受试者所需的输血次数。

44. 根据权利要求1-43中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括降低肝血流量。

45. 根据权利要求1-44中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗减少所述受试者对肝移植的需要。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述之用途的化合物,其中所述HHT的治疗包括降低HHT的额外症状的频率和/或严重程度。

47. 根据权利要求46所述之用途的化合物,其中所述额外症状是呼吸困难、偏头痛、疲劳、神经事件和/或栓塞事件。

用于治疗遗传性出血性毛细血管扩张症的变构AKT抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及变构AKT抑制剂及其在治疗遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)中的用途。

背景技术

[0002] 遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)是一种常染色体显性遗传病,全世界每5,000-8,000人中就有一人患病。临床症状包括肺、脑和肝的动静脉畸形(AVM),所述动静脉畸形由动脉和静脉之间的直接连接组成,而没有毛细血管的介入。如果不治疗,AVM会导致危及生命的并发症。HHT患者还会在鼻子、嘴和胃肠道中形成被称为毛细血管扩张症的小动静脉畸形。这些脆弱的血管容易破裂和出血,在严重和频繁的出血发作后导致复发性贫血(Dupuis-Girod et al., (2010), "Hereditary hemorrhagic telangiectasia: From molecular biology to patient care", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03860.x>; Iriarte et al., (2019), "PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Activation and Endothelial Cell Proliferation in Patients with Hemorrhagic Hereditary Telangiectasia Type 1", *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8090971>)。

[0003] 迄今为止发现的大多数突变存在于两个基因中。HHT1是由ENG(内皮糖蛋白, endoglin)基因突变引起的,而HHT2是由ACVRL1(激活素受体样激酶1, ALK1)突变引起的。两者都是主要在内皮细胞中表达的转化生长因子- β (TGF- β)/骨形态发生蛋白(BMP)的受体。突变代表了无效等位基因,表明单倍体不足是HHT的根本原因。对于ENG或ACVRL1 (ALK1)的突变是如何导致病理性血管生成仍知之甚少。

[0004] 致病基因突变的鉴定和动物模型的建立已经揭示了内皮细胞中的转化生长因子- β (TGF- β)/骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的减少和血管内皮生长因子(VEGF)信号传导活性的增加是HHT中血管畸形发展的原因。这些关键途径的扰动导致内皮细胞活化,造成壁细胞从内皮脱离(Galaris et al., (2019), "Pericytes in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia", *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16908-4_10)。这种初始不稳定状态导致血管在暴露于血管生成触发因素时反应不充分,造成血管过度生长并形成血管异常,从而容易出血。

[0005] 最近,一系列来自小鼠模型和体外实验的研究揭示了PI3K/AKT信号传导通路与在HHT中观察到的内皮细胞活化的增加之间的联系。内皮细胞中ALK1信号传导的丢失与PTEN减少所诱导的PI3K/AKT信号传导的增加同时发生(Jin et al., (2017), "Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling", *Nature Cell Biology*, 19(6), 639-652. <https://doi.org/10.1038/ncb3534>; Ola et al., (2016), "PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia", *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13650>;

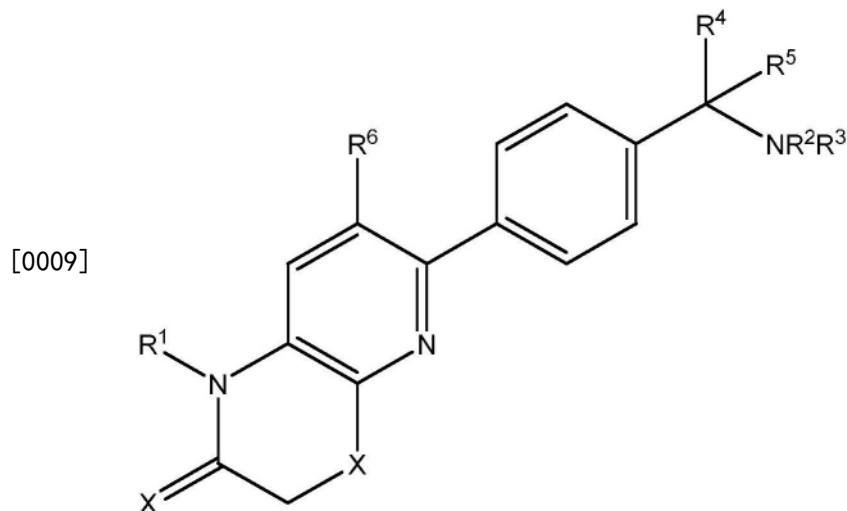
Ola et al. (2018), "SMAD4 Prevents Flow Induced Arteriovenous Malformations by Inhibiting Casein Kinase 2", *Circulation*, 138(21), 2379-2394。这一观察结果在HHT1和HHT2患者的皮肤毛细血管扩张活组织检查中得到证实,其中内皮细胞增殖的增加与PI3K/AKT途径下游基因的增加有关(Alsina-Sanchis et al., (2018), "ALK1 loss results in vascular hyperplasia in mice and humans through PI3K activation", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310760>)。

[0006] 靶向Pi3K/AKT/mTOR信号传导可为在HHT观察到的病理性血管生成的治疗提供了治疗策略。然而,安全有效的治疗剂仍然是未知的。例如,广泛使用的泛Pi3K抑制剂——渥曼青霉素(Wortmannin)能够抑制在ALK1或SMAD4 iKO的视网膜小鼠模型中的AVM形成(Ola et al., (2016), (2018), 同上),但不能抑制在内皮糖蛋白诱导敲除(Eng-iKO)模型中的AVM形成(Jin et al., (2017), 同上)。同样,典型的mTOR抑制剂——西罗莫司(sirolimus)不能阻断在Eng-iKO模型中的AVM形成(Ruiz et al., (2019), "Sirolimus plus nintedanib treats vascular pathology in HHT mouse models", *BioRxiv Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/739144>)。

[0007] 因此,需要提供有效且具有可接受的安全性的HHT治疗剂。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了式(I)化合物:



[0010] 或其药学上可接受的盐,其用于在受试者中的遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)的治疗,其中:

[0011] 每个X独立地是O或S;

[0012] R^1 选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基,其中每个 C_1 - C_{10} 烷基任选地被一个或多个选自卤素、-CN、-OR⁷或3元至6元环烷基的取代基取代;

[0013] R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基;或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的氮原子一起形成3元至6元杂环;

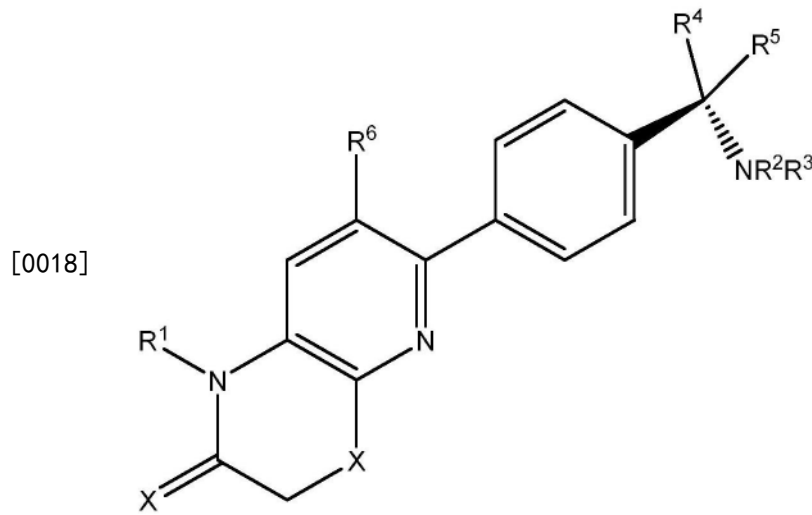
[0014] R^4 和 R^5 各自独立地选自 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基;或者 R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成3元至6元环烷基环或3元至6元杂环,其任选地被一个或多个选自 C_1 -

C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代；

[0015] R⁶是5元至7元芳基环或5元至7元杂芳基环，其任选地被一个或多个选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代；以及

[0016] 每个R⁷独立地选自氢和C₁-C₁₀烷基。

[0017] 在一些实施方案中，式(I)化合物具有以下结构：



[0019] 在一些实施方案中，R⁶是被一个或多个取代基取代的苯基，所述一个或多个取代基选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂。在一些实施方案中，所述一个或多个取代基选自C₁-C₆烷基、-CN、-OH和卤素。在其它实施方案中，R⁶是未取代的苯基。

[0020] 在一些实施方案中，R⁶是被一个或多个取代基取代的5元至7元杂芳基环，所述一个或多个取代基选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂。在一些实施方案中，所述一个或多个取代基选自C₁-C₆烷基、-CN、-OH和卤素。在其它实施方案中，R⁶是未取代的5元至7元杂芳基环。在某些实施方案中，所述杂芳基环是6元杂芳基环。在一些实施方案中，所述杂芳基环包含至少一个氮原子。在一些实施方案中，所述杂芳基环包含至少一个氧原子。在一些实施方案中，所述杂芳基环包含至少一个硫原子。例如，所述杂芳基环可以是吡啶、吡喃、噻喃、吡咯、呋喃或噻吩。

[0021] 在一些实施方案中，R⁴和R⁵与它们所连接的碳原子一起形成未取代的3元至6元环烷基环或杂环。在其它实施方案中，R⁴和R⁵与它们所连接的碳原子一起形成未取代的3元至6元环烷基环或杂环，其被一个或多个选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代。例如，所述环烷基环可以是环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环。在一些实施方案中，所述杂环包含至少一个氮原子。在一些实施方案中，所述杂环包含至少一个氧原子。在一些实施方案中，所述杂环包含至少一个硫原子。例如，所述杂环可以是哌啶、四氢吡喃、噻烷、吡咯烷、四氢呋喃或四氢噻吩。

[0022] 在一些实施方案中，R⁴和R⁵与它们所连接的碳原子一起形成未取代的环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环。在其它实施方案中，所述环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环被一个或多个取代基取代，所述一个或多个取代基选自C₁-C₁₀烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂。在一些实施方案中，所述一个或多个取代基选自C₁-C₆烷基、-CN、-OH和卤素。在一些实施方案中，R⁴和R⁵与它们所连接的碳原子一起形成未取代的环丁基环。在其它实施方案中，所述环丁基环被一个或多个取代基取代，所述一个或多个取代

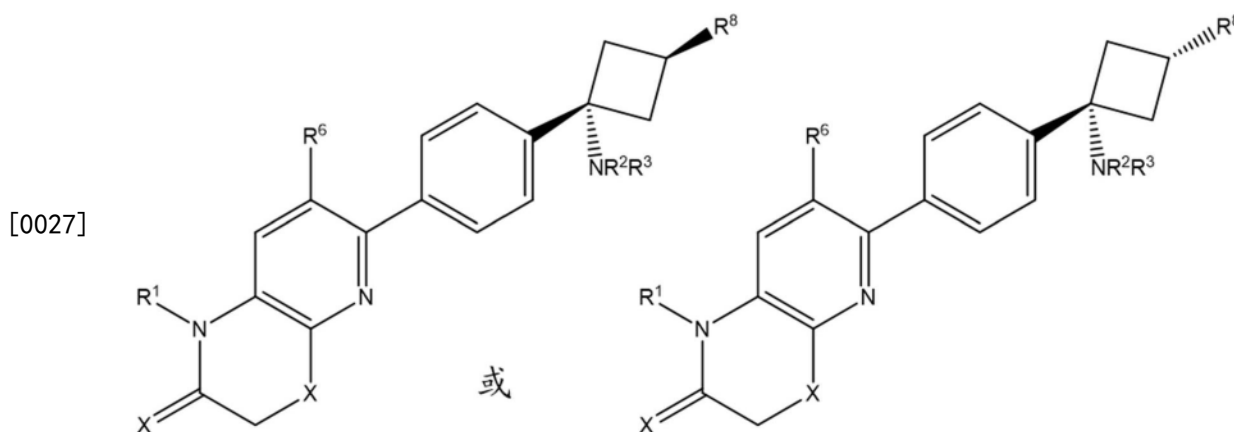
基选自 C_1 - C_{10} 烷基、 $-CN$ 、 $-OR^7$ 、卤素、 $-COR^7$ 、 CO_2R^7 、 $CONR^7_2$ 和 $-NR^7_2$ 。在一些实施方案中,所述一个或多个取代基选自 C_1 - C_6 烷基、 $-CN$ 、 $-OH$ 和卤素。

[0023] 在一些实施方案中,每个X是O。

[0024] 在一些实施方案中, R^1 是未取代的 C_1 - C_{10} 烷基、未取代的 C_1 - C_6 烷基、或未取代的 C_1 - C_4 烷基。在一些实施方案中, R^1 是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或己基。在一些实施方案中, R^1 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在一些实施方案中, R^1 是甲基或乙基。在一些实施方案中, R^1 是被一个或多个选自卤素、 $-CN$ 、 $-OH$ 或3元至6元环烷基的取代基取代的 C_1 - C_{10} 烷基、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_4 烷基。在一些实施方案中, R^1 是 $-(CH_2)_nCN$,其中n是1、2、3、4或5。

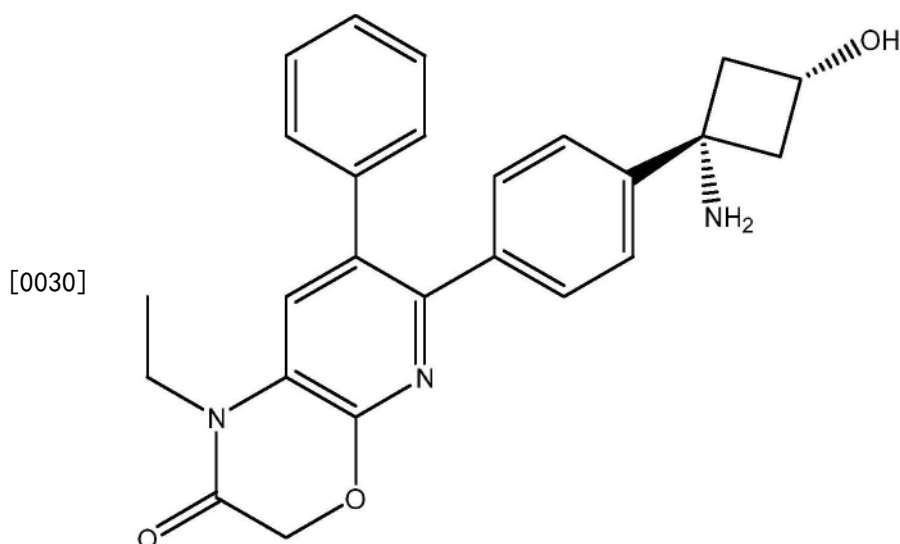
[0025] 在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1 - C_6 烷基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢、甲基和乙基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自为氢。

[0026] 在一些实施方案中,式(I)化合物为:



[0028] 或其药学上可接受的盐,其中 R^8 选自 $-OH$ 、 $-CN$ 、卤素和 C_1 - C_6 烷基。

[0029] 在一些实施方案中,式(I)化合物为:



[0031] 或其药学上可接受的盐。

[0032] 在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐是酒石酸盐、甲磺酸盐或磷酸盐。在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐是酒石酸盐。在一些这样的实施方案中,所述酒石酸

盐是L-酒石酸盐。

[0033] 在一些实施方案中,所述化合物配制用于口服施用于所述受试者。

[0034] 在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者是成年人。在一些这样的实施方案中,将式(I)化合物以20mg至75mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。在其它这样的实施方案中,将式(I)化合物以10mg至50mg Q.D.、20mg至40mg Q.D.或20mg至30mg Q.D.的剂量施用于所述受试者。

[0035] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低与HHT相关的出血的频率、持续时间或强度。在一些这样的实施方案中,所述与HHT相关的出血是胃肠(GI)出血。在一些实施方案中,所述与HHT相关的出血是鼻出血。

[0036] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括增加所述受试者的血红蛋白水平。

[0037] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的毛细血管扩张的数量。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减小所述受试者中的毛细血管扩张的大小。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是皮肤毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是鼻毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是口腔毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是胃肠毛细血管扩张。

[0038] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的数量和/或大小。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防所述受试者中的AVM的形成。在一些这样的实施方案中,所述动静脉畸形是肺AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是脑部(脑)AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是内脏AVM。

[0039] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。

[0040] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流的程度。

[0041] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者对铁补充的需要,例如减少所述受试者所需的铁输注次数。在一些实施方案中,HHT的治疗包括减少所述受试者所需的输血次数。

[0042] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低肝血流量。

[0043] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗减少了所述受试者对肝移植的需要。

[0044] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低HHT的额外症状的频率和/或严重程度。此类额外症状可包括呼吸困难、偏头痛、疲劳、神经事件和栓塞事件。

[0045] 本发明还提供了如上述任一实施方案所定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)的药物中的用途。

[0046] 本发明还提供了一种在有需要的受试者中治疗遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如上述任一实施方案中所定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐。

[0047] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致与HHT相关的出血的频率、持续时间或强度的降低。在一些这样的实施方案中,所述与HHT相关的出血是胃肠(GI)出血。在一些实施方案中,所述与HHT相关的出血是鼻出血。

- [0048] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者的血红蛋白水平的增加。
- [0049] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的毛细血管扩张的数量减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的毛细血管扩张的大小减小。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是皮肤毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是鼻毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是口腔毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是胃肠毛细血管扩张。
- [0050] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者的动静脉畸形(AVM)数量减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的大小减小。在一些实施方案中,所述方法预防所述受试者中AVM的形成。在一些这样的实施方案中,所述动静脉畸形是肺AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是脑AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是内脏AVM。
- [0051] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者生活质量得到改善。
- [0052] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致心功能不全和肺动脉高血压(PAH)的减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法预防了心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。
- [0053] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法预防所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的由肺AVM诱导的右向左分流的程度的降低。
- [0054] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者对铁补充的需要的减少,例如所述受试者所需的铁输注次数的减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者所需的输血次数的减少。
- [0055] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致肝血流量减少。
- [0056] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法减少了所述受试者对肝移植的需要。
- [0057] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致HHT的额外症状的频率和/或严重程度的降低。此类额外症状可包括呼吸困难、偏头痛、疲劳、神经事件和栓塞事件。
- [0058] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者生活质量的全面改善。

附图说明

- [0059] 图1A显示了化合物6与AKT2复合的整体结构。图1B显示了该复合物的结构,放大了变构袋并显示了氨基酸的相互作用。图1C是氨基酸相互作用的示意图。
- [0060] 图1D显示了与AKT2复合的VAD044的游离碱的结构(放大了变构袋并显示了氨基酸相互作用)。图1E是氨基酸相互作用的示意图。
- [0061] 图2A是显示了不同激酶的相对序列同源性的树形图(其中在同一分支上且位置靠近的激酶具有高水平的序列同源性;而位于不同分支上的那些激酶的序列同源性有很大差异)。如图2A所示,AKT1、AKT2和AKT3具有非常高水平的序列同源性。PDK1位于与AKT1/2/3相同的主分支(被标记为“AGC”)上,表明与AKT1/2/3具有相对高水平的序列同源性;而p38α位于完全不同的主分支上(被标记为“CMGC”),表明AKT1/2/3和p38α之间的序列同源性水平较低。图2B显示了VAD044 (6-(4-(1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮L-酒石酸盐)对这五种选定的激酶(AKT1, AKT2, AKT3, PDK1和p38α)的抑制百分比。

[0062] 图3显示了哌立福辛(Perifosine)的安全性和潜在毒性。图3(A)显示了幼鼠致死率,图3(B)显示出生后第4天(P4)和出生后第7天(P7)的动物体重差异。所有误差线均代表S.E.M。**** $p < 0.0001$ 是将每组的平均值与单独注射载体(vehicle)的对照组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0063] 图4显示了哌立福辛在小鼠中具有较差的抗血管生成特性。图4(A)显示了在P4对野生型小鼠单独用载体或用 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的哌立福辛进行腹腔内注射后,该野生型小鼠在P7时的视网膜血管中的同工凝集素-B4染色的内皮细胞。底部是更高放大倍数的血管网络。图4(B)显示了对径向扩张的定量。图2(C)显示了同工凝集素-B4阳性的表面积,以及图4(D)显示了每个视野的分枝点数。所有误差线均代表S.E.M。* $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$ 是将每组的平均值与仅用载体处理的对照组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0064] 图5显示了哌立福辛在Eng-iK0小鼠模型中预防AVM形成的有效性。图5(A)是哌立福辛的注射方案的图示。图5(B)显示了表明哌立福辛对用同工凝集素-B4染色以显示内皮细胞的Eng-iK0视网膜的作用的共聚焦图像。底部是更高放大倍数的血管网络。图5(C)显示了每只小鼠的AV分流数量。图5(D)显示了对径向扩张的定量,图5(E)显示了同工凝集素-B4阳性的区域,以及图5(F)显示了每个视野的分枝点数。所有误差线均代表S.E.M。* $p < 0.05$ 是将每组的平均值与Eng-iK0组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0065] 图6显示了Uprosertib的安全性和潜在毒性。图6(A)显示了幼鼠致死率,图6(B)显示了出生后第4天(P4)和出生后第7天(P7)的动物体重差异。所有误差线均代表S.E.M。* $p < 0.05$ 是将每组的平均值与单独注射载体的对照组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0066] 图7显示了Uprosertib在小鼠中的抗血管生成特性。图7(A)显示了在P4对野生型小鼠单独用载体或用 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的哌立福辛对P4的野生型小鼠进行腹腔内注射后,该野生型小鼠在P7时的视网膜血管中的同工凝集素-B4染色的内皮细胞。底部是更高放大倍数的血管网络。图7(B)显示了对径向扩张的定量,图7(C)显示了同工凝集素-B4阳性表面积,图7(D)显示了每个视野的分枝点数。所有误差线均表示S.E.M。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 和**** $p < 0.0001$ 是将每组的平均值与单独用载体处理的对照组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0067] 图8(A)是Uprosertib的注射方案的图示,图8(B)显示了幼鼠的致死率。用他莫昔芬(tamoxifen, $50\mu\text{g}$)对P2的EngFlox/flox;cdh5-CreERT2动物进行注射,以在新生小鼠中诱导几乎完全的基因敲除,随后用 $0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的Uprosertib在P3和P5时对各小鼠各进行一次IP注射。注射了相同体积的载体作为对照动物。

[0068] 图9(A) VAD044的注射方案的图示,图9(B)显示了幼鼠的致死率。用他莫昔芬($50\mu\text{g}$)对P2的EngFlox/flox;cdh5-CreERT2动物进行注射以在新生小鼠中诱导几乎完全的基因敲除,随后用 $0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重的VAD044在P3和P5时对各小鼠各进行一次IP注射。注射相同体积的载体作为对照动物。然后在P7时处死小鼠,并如所述对视网膜进行免疫荧光染色处理(Lebrin et al., 2010)。

[0069] 图10显示了VAD044在Eng-iK0小鼠模型中预防AVM形成的有效性。图10(A)显示了

表明VAD044对用同工凝集素-B4染色以显示内皮细胞的Eng-iK0视网膜的作用的共聚焦图像。图10(B)显示了每只小鼠的AV分流数量。图10(C)显示了对径向扩张的定量,图10(D)显示了同工凝集素-B4阳性的区域,图10(E)显示了每个视野的分支点数量。所有误差线均代表S.E.M。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 是将每组的平均值与Eng-iK0组进行比较的单因素方差分析和Dunnet事后检验的结果。“ns”=非显著的。

[0070] 图11显示了用于从Eng-iK0小鼠肺中分离和表征原代小鼠内皮细胞以及Cre重组酶的腺病毒感染以诱导细胞中的Eng基因的缺失(以及随后的Eng蛋白的缺失)的方法。

[0071] 图12显示了正常内皮细胞(EC)和Eng缺失的内皮细胞中的AKT和SMAD的信号传导。

[0072] 图13A显示了Cre腺病毒感染对正常EC和Eng-iK0 EC中内皮糖蛋白表达的影响。图13B显示了VAD-044在Eng表达水平正常的小鼠肺内皮细胞中的IC50,以及在Eng表达完全丧失的小鼠肺内皮细胞中的IC50。图13C显示了p42/p44磷酸化,其作为选择性对照进行分析。

具体实施方式

[0073] 如上所述,靶向Pi3K/AKT/mTOR信号传导途径可以为HHT的治疗提供治疗策略。然而,安全有效的治疗药物仍然是未知的。

[0074] AKT是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有三种亚型:AKT1、AKT2和AKT3。AKT1通过调节重要的下游效应子(例如eNOS、Ang2和FOXO)在内皮细胞中发挥重要作用,这些效应子促进血管生成信号传导的几个方面,例如芽伸长和血管重塑(Lee et al., (2014), "Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408472111>)。若干项研究已经表明,持续的内皮AKT激活导致了血管尺寸增加和慢性血管通透性引起的全身性水肿(Phung et al., (2006), "Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin", Cancer Cell. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.07.003>)。类似地,内皮细胞中不受控制的AKT1的激活诱导了体内血管畸形(Perry et al., (2007), "AKT1 overexpression in endothelial cells leads to the development of cutaneous vascular malformations in vivo", Archives of Dermatology. <https://doi.org/10.1001/archderm.143.4.50>)。因此AKT可能是控制在HHT观察到的病理性血管生成和血管畸形的关键分子靶点。

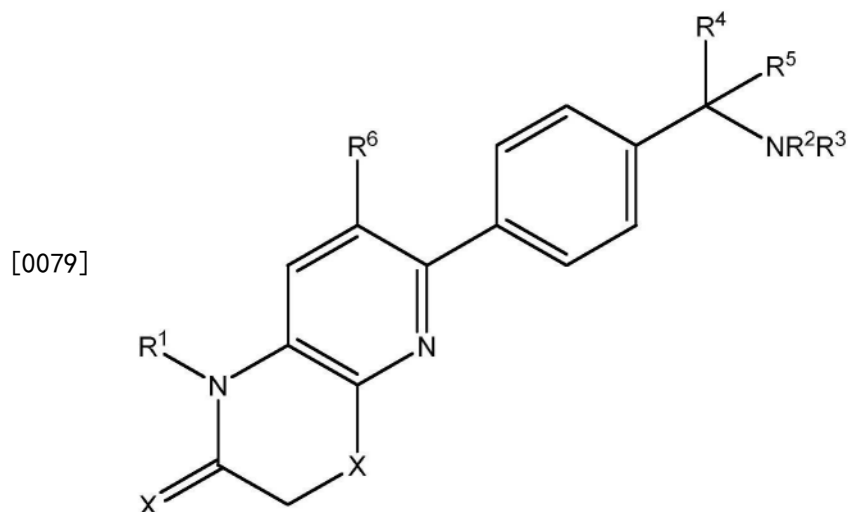
[0075] 本发明人测试了不同类型的AKT抑制剂,并评估了它们的毒性特征、它们对正常血管生成的作用以及它们在HHT小鼠模型中预防血管畸形发展的能力。在下面的实施例中详细讨论了结果。

[0076] 总之,本发明人惊奇地发现,具有下式(I)的特定变构AKT抑制剂能够预防1型HHT(HHT1)的Eng-iK0小鼠模型中的血管畸形的发展。如下文实施例中更详细讨论的,获得了该化合物(和两种其他对比AKT抑制剂)的安全性/毒性特征,并且使用新生视网膜血管生成模型确定了每种化合物在出生后第7天(P7)的C57BL/6J野生型小鼠中抑制血管生成的最小有效剂量。还确定了每种化合物在Eng-iK0小鼠中预防动静脉畸形(AVM)发展的最小有效剂量。

[0077] 本发明人意外地发现,式(I)的变构AKT抑制剂能够以令人惊讶的低剂量(比肿瘤

学中通常使用的剂量低约10倍) 治疗和/或预防与HHT相关的血管畸形,同时表现出可接受的安全性。

[0078] 因此,在第一方面,本发明提供了式(I)化合物:



[0080] 或其药学上可接受的盐,其用于在受试者中治疗HHT,其中:

[0081] 每个X独立地是O或S;

[0082] R^1 选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基,其中每个 C_1 - C_{10} 烷基任选地被一个或多个选自卤素、-CN、-OR⁷或3元至6元环烷基的取代基取代;

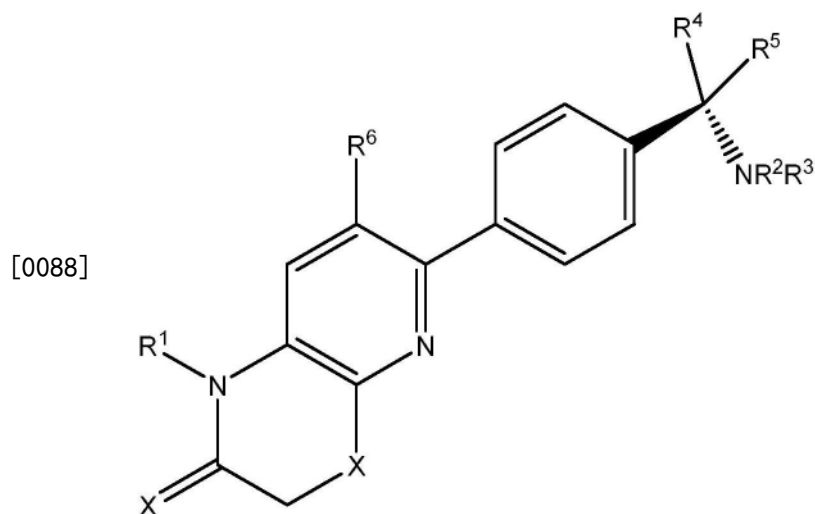
[0083] R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基;或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的氮原子一起形成3元至6元杂环;

[0084] R^4 和 R^5 各自独立地选自 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基;或者 R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成3元至6元环烷基环或3元至6元杂环,其任选地被一个或多个选自 C_1 - C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代;

[0085] R^6 是5元至7元芳基环或5元至7元杂芳基环,其任选地被一个或多个选自 C_1 - C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂和-NR⁷₂的取代基取代;以及

[0086] 每个R⁷独立地选自氢和 C_1 - C_{10} 烷基。

[0087] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有以下结构:



[0089] 在一些实施方案中, R^6 是被一个或多个取代基取代的苯基, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂ 和 -NR⁷₂。在一些实施方案中, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_6 烷基、-CN、-OH 和卤素。在其它实施方案中, R^6 是未取代的苯基。

[0090] 在一些实施方案中, R^6 是被一个或多个取代基取代的5元至7元杂芳基环, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂ 和 -NR⁷₂。在一些实施方案中, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_6 烷基、-CN、-OH 和卤素。在其它实施方案中, R^6 是未取代的5元至7元杂芳基环。在某些实施方案中, 所述杂芳基环是6元杂芳基环。在一些实施方案中, 所述杂芳基环包含至少一个氮原子。在一些实施方案中, 所述杂芳基环包含至少一个氧原子。在一些实施方案中, 所述杂芳基环包含至少一个硫原子。例如, 所述杂芳基环可以是吡啶、吡喃、噻喃、吡咯、呋喃或噻吩。

[0091] 在一些实施方案中, R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成未取代的3元至6元环烷基环或杂环。在其它实施方案中, R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成未取代的3元至6元环烷基环或杂环, 其被一个或多个选自 C_1-C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂ 和 -NR⁷₂ 的取代基取代。例如, 所述环烷基环可以是环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环。在一些实施方案中, 所述杂环包含至少一个氮原子。在一些实施方案中, 所述杂环包含至少一个氧原子。在一些实施方案中, 所述杂环环包含至少一个硫原子。例如, 所述杂环环可以是哌啶、四氢吡喃、噻烷、吡咯烷、四氢呋喃或四氢噻吩。

[0092] 在一些实施方案中, R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成未取代的环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环。在其它实施方案中, 所述环丙基环、环丁基环、环戊基环或环己基环被一个或多个取代基取代, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂ 和 -NR⁷₂。在一些实施方案中, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_6 烷基、-CN、-OH 和卤素。在一些实施方案中, R^4 和 R^5 与它们所连接的碳原子一起形成未取代的环丁基环。在其它实施方案中, 所述环丁基环被一个或多个取代基取代, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_{10} 烷基、-CN、-OR⁷、卤素、-COR⁷、CO₂R⁷、CONR⁷₂ 和 -NR⁷₂。在一些实施方案中, 所述一个或多个取代基选自 C_1-C_6 烷基、-CN、-OH 和卤素。

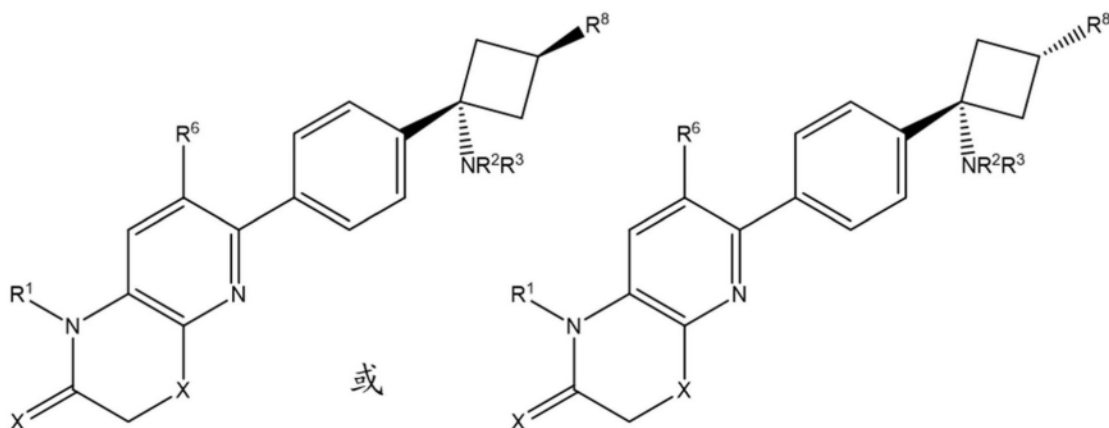
[0093] 在一些实施方案中, 每个X是O。

[0094] 在一些实施方案中, R^1 是未取代的 C_1-C_{10} 烷基、未取代的 C_1-C_6 烷基、或未取代的 C_1-C_4 烷基。在一些实施方案中, R^1 是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基或己基。在一些实施方案中, R^1 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基或叔丁基。在一些实施方案中, R^1 是甲基或乙基。在一些实施方案中, R^1 是被一个或多个选自卤素、-CN、-OH 或3元至6元环烷基的取代基取代的 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_6 烷基或 C_1-C_4 烷基。在一些实施方案中, R^1 是 $-(CH_2)_nCN$, 其中n是1、2、3、4或5。

[0095] 在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1-C_{10} 烷基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢和 C_1-C_6 烷基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自独立地选自氢、甲基和乙基。在一些实施方案中, R^2 和 R^3 各自为氢。

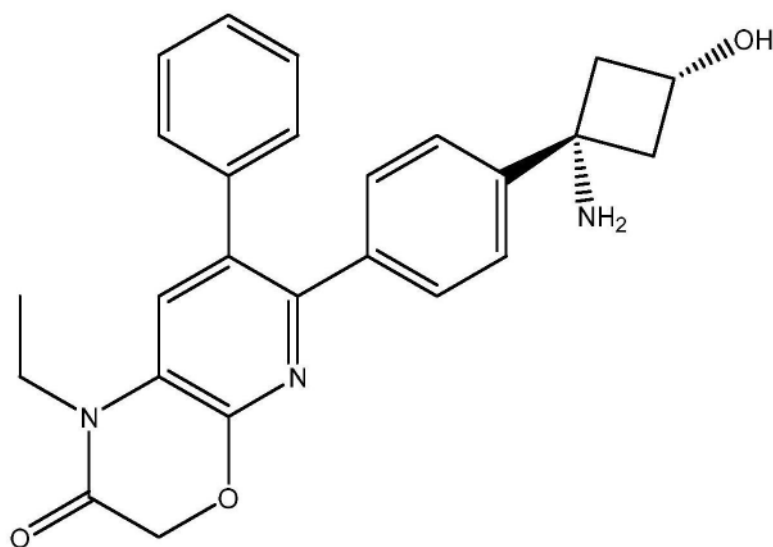
[0096] 在一些实施方案中, 式(I)化合物为:

[0097]

[0098] 或其药学上可接受的盐,其中R⁸选自-OH、-CN、卤素和C₁-C₆烷基。

[0099] 在一些实施方案中,式(I)化合物为:

[0100]



[0101] 或其药学上可接受的盐。

[0102] 在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐是酒石酸盐、甲磺酸盐或磷酸盐。在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐是酒石酸盐。在一些这样的实施方案中,所述酒石酸盐是L-酒石酸盐。

[0103] 在一些实施方案中,所述化合物配制用于口服施用于所述受试者。

[0104] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低与HHT相关的出血的频率、持续时间或强度。在一些这样的实施方案中,所述与HHT相关的出血是胃肠(GI)出血。在一些实施方案中,所述与HHT相关的出血是鼻出血。

[0105] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括增加所述受试者的血红蛋白水平。

[0106] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的毛细血管扩张的数量。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减小所述受试者中的毛细血管扩张的大小。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是皮肤毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是鼻毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是口腔毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是胃肠毛细血管扩张。

[0107] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的数量。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减小所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的大

小。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防所述受试者中的AVM的形成。在一些这样的实施方案中,所述动静脉畸形是肺AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是脑部(脑)AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是内脏AVM。

[0108] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。

[0109] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括预防所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流。在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流的程度。

[0110] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括减少所述受试者对铁补充的需要,例如减少所述受试者所需的铁输注次数。在一些实施方案中,HHT的治疗包括减少所述受试者所需的输血次数。

[0111] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低肝血流量。

[0112] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗减少了所述受试者对肝移植的需要。

[0113] 在一些实施方案中,所述HHT的治疗包括降低HHT的额外症状的频率和/或严重程度。此类额外症状可包括呼吸困难、偏头痛、疲劳、神经事件和栓塞事件。

[0114] 本发明还提供了一种在有需要的受试者中治疗遗传性出血性毛细血管扩张症(HHT)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如上述任一实施方案中所定义的式(I)化合物或其药学上可接受的盐。

[0115] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致与HHT相关的出血的频率、持续时间或强度的降低。在一些这样的实施方案中,所述与HHT相关的出血是胃肠(GI)出血。在一些实施方案中,所述与HHT相关的出血是鼻出血。

[0116] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者的血红蛋白水平的增加。

[0117] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的毛细血管扩张的数量的减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的毛细血管扩张的大小的减小。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是皮肤毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是鼻毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是口腔毛细血管扩张。在一些实施方案中,所述毛细血管扩张是胃肠毛细血管扩张。

[0118] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者的动静脉畸形(AVM)数量减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的动静脉畸形(AVM)的大小减小。在一些实施方案中,所述方法预防所述受试者中AVM的形成。在一些这样的实施方案中,所述动静脉畸形是肺AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是脑AVM。在一些实施方案中,所述动静脉畸形是内脏AVM。

[0119] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者生活质量得到改善。

[0120] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致心功能不全和肺动脉高血压(PAH)的减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法预防了心功能不全和肺动脉高血压(PAH)。

[0121] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法预防所述受试者中由肺AVM诱导的右向左分流。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者中的由肺AVM诱导的右向左分流的程度的降低。

[0122] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者对铁补充的需要的减少,

例如所述受试者所需的铁输注次数的减少。在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者所需的输血次数的减少。

[0123] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致肝血流量减少。

[0124] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法减少了所述受试者对肝移植的需要。

[0125] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致HHT的额外症状的频率和/或严重程度的降低。此类额外症状可包括呼吸困难、偏头痛、疲劳、神经事件和栓塞事件。

[0126] 在一些实施方案中,所述治疗HHT的方法导致所述受试者生活质量的全面改善。

[0127] 定义和缩略语

[0128] 如本文所用,术语“变构AKT抑制剂”是指通过在酶活性位点以外的位点与AKT结合来抑制AKT活性的物质。

[0129] 如本文所用,术语“卤素”指-F、-Cl、-Br和-I

[0130] 缩略语:

[0131]

HHT	遗传性出血性毛细血管扩张
AVM	动静脉畸形
AV	动静脉的
Eng-iKO	内皮糖蛋白-诱导敲除
ALK1 (也被称为 ACVRL1)	激活素受体样激酶 1
BMP	骨形态发生蛋白
TGF- β	转化生长因子- β
VEGF	血管内皮生长因子
PI3K	磷酸肌醇 3-激酶
AKT	蛋白激酶 B (也被称为 PKB)
PTEN	磷酸酶和张力蛋白同源物
mTOR	哺乳动物雷帕霉素靶标
eNOS	内皮型一氧化氮合酶
Ang2	血管生成素 2
FOXOs	叉头盒蛋白质 (O 类)
iKO	诱导敲除
IP injection	腹腔内注射

[0132]

PFA	多聚甲醛
PBS	磷酸盐缓冲盐水
BSA	牛血清白蛋白
α -SMA	α 平滑肌肌动蛋白
FITC	异硫氰酸荧光素
ANOVA	方差分析
SEM	平均值的标准差
ATP	三磷酸腺苷
PKA	蛋白激酶 A
PKC	蛋白激酶 C
PKG	蛋白激酶 G
PRKACA	蛋白激酶催化亚基 α
PRKACB	蛋白激酶催化亚基 β
cGMP	环鸟苷酸
PRKG1	蛋白激酶 CGMP 依赖性 1
ROCK	Rho 相关蛋白激酶
Px	出生后第 x 天
Q.D.	每日一次 (即每天一次)

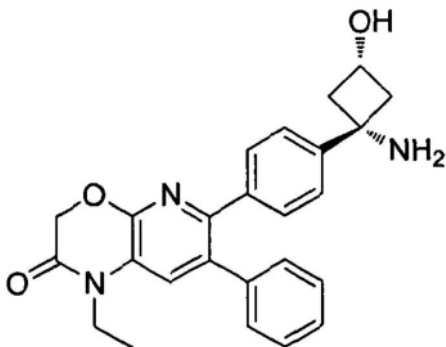
[0133] 表1:缩略语实施例

[0134] 实施例1:6-(4-(1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮的合成

[0135] 根据W02011077098中所述的方案(具体参见实施例97、113和139(复制在下文中))合成6-(4-(1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮(在本文中被称作“VAD044游离碱”):

[0136] 6-(4-((1s,3s)-1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮的合成:来自W02011077098实施例139:

[0137]



[0138] 步骤1:((1s,3s)-1-(4-(1-乙基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1H-吡啶并[2,3-b]

[1,4]噁嗪-6-基)苯基)-3-羟基环丁基)氨基甲酸叔丁酯

[0139] 在15mL反应管中加入在1,4-二噁烷(2.3ml)和水(0.8ml)的混合物中的碳酸铯(204mg,0.625mmol)、6-溴-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮*(50mg,0.150mmol)、((1s,3s)-3-羟基-1-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯基)环丁基)氨基甲酸叔丁酯** (49mg,0.125mmol)以得到无色溶液。通过氮气通气15分钟来脱气,随后加入[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)二氯甲烷加合物(20mg,0.025mmol)并再脱气5分钟。将反应混合物在氮气气氛下加热至50℃保持一小时,然后让其冷却至室温,用水(5ml)稀释并萃取至乙酸乙酯(3×5ml)中。用Na₂SO₄干燥合并的有机相,过滤并减压浓缩至干燥。通过Biotage色谱纯化(环己烷:乙酸乙酯,从90:10至0:100进行梯度洗脱)残余物以得到为米白色固体的目标产物(45mg,70%产率)。¹H-NMR(500MHz,CDCl₃) δ 7.29-7.35(5H,m),7.28(1H,s),7.18-7.24(4H,m),4.96(1H,br s),4.88(2H,s),4.05(1H,br s),4.01(2H,q),2.98(2H,br s),2.75(2H,br s),1.20-1.51(9H,br m),1.32(3H,t)。LCMS(方法D)RT=1.25分钟,M+H⁺=516.20。

[0140] 步骤2:6-(4-((1s,3s)-1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮

[0141] 将((1s,3s)-1-(4-(1-乙基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-6-基)苯基)-3-羟基环丁基)氨基甲酸叔丁酯(45mg,0.087mmol)溶解在TFA(1mL)中并搅拌30秒。立即将该溶液减压浓缩至干燥。将残余物溶解在乙醚(~3mL)中并减压浓缩至干燥,重复三次。然后将残余物在乙醚(3mL)中制成浆液并在沉降后通过移液管去除上层溶剂。该过程重复了三次。通过冷冻干燥过夜去除剩余的溶剂,得到为米白色固体的目标化合物(33mg,71%产率)。¹H-NMR(500MHz,MeOD) δ 7.55(1H,s),7.39-7.42(4H,m),7.27-7.31(3H,m),7.20-7.24(2H,m),4.93(2H,s),4.01-4.11(3H,m),3.03-3.11(2H,m),2.42-2.50(2H,m),1.28(3H,t)。LCMS(方法D)RT=0.74分钟,M+H⁺=416.20。

[0142] *6-溴-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮的合成:来自W02011077098的实施例113(步骤1-4)和第222页(步骤5):

[0143] 步骤1:2-((5-溴-3-硝基吡啶-2-基)氧基)乙酸乙酯

[0144] 在30分钟内向在1,4-二噁烷(250ml)中的氢化钠(5.31g,133mmol)的悬浮液中滴加乙醇酸乙酯(12.56ml,133mmol),确保温度保持在30℃以下。将所得浓稠悬浮液在室温搅拌15分钟。在另一个11圆底烧瓶中加入在1,4-二噁烷(150ml)中的5-溴-2-氯-3-硝基吡啶(21g,88mmol),得到棕色溶液。在30分钟内于0℃逐滴加入氢化钠和乙醇酸乙酯的悬浮液。将所得反应混合物加热至80℃过夜。

[0145] 将反应混合物减压浓缩,并通过Biotage硅胶色谱(梯度为0%至10%的正己烷溶液中的乙酸乙酯)纯化粗残余物以得到标题化合物(1.8g,44%)。¹H-NMR(500MHz,CDCl₃) δ 8.48(1H,s),8.42(1H,s),5.07(2H,s),4.28-4.24(2H,q),1.31-1.28(3H,t)。

[0146] 步骤2:2-((3-硝基-5-苯基吡啶-2-基)氧基)乙酸乙酯

[0147] 在11圆底烧瓶中加入1,2-二甲氧基乙烷(300ml)中的氟化铯(45.6g,300mmol)、2-(5-溴-3-硝基吡啶-2-基氧基)乙酸乙酯(18.33g,60.1mmol)、苯基硼酸(10.99g,90mmol)、

三苯基膦(4.73g,18.02mmol),得到黄色溶液。通过氮气通气30分钟将该反应混合物脱气。加入乙酸钯(II)(2.023g,9.01mmol)并将该混合物在氮气气氛下加热至75℃过夜。将该反应混合物冷却至室温,减压浓缩至干燥,得到棕色固体。将其重新溶解在二氯甲烷中,过滤并减压浓缩至干燥,得到棕色固体。通过Biotage色谱纯化(梯度为5%至60%的正己烷溶液中的乙酸乙酯)粗残余物,得到标题化合物(6.9g,38%)。¹H NMR(500MHz,CDCl₃) δ8.58(1H,s),8.56(1H,s),7.59-7.52(2H,m),7.48-7.46(2H,m),7.45-7.43(1H,m),5.13(2H,s),4.30-4.26(2H,q),1.33-1.30(3H,t)。

[0148] 步骤3:7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮

[0149] 在500ml圆底烧瓶中加入37%盐酸(40mL)中的2-(3-硝基-5-苯基吡啶-2-基氧基)乙酸乙酯(4.6g,15.22mmol),得到黄色悬浮液。将该混合物冷却至0℃至5℃,然后分批加入锡粉(9.94g,84mmol)。已经证实该添加过程是放热的。添加时应小心。然后将该混合物在室温再搅拌30分钟,直到所有起泡停止。将反应混合物在氮气气氛下加热至80℃,持续3小时。将反应混合物冷却至室温,并用水(800ml)稀释。通过过滤分离出白色沉淀,用水(100ml)洗涤并吸干,得到白色固体。将固体与甲苯(3×30ml)共沸,得到白色固体,即标题化合物(2.6g,77%)。¹H NMR(500MHz,(CD₃)₂SO) δ10.41(1H,s),8.10(1H,s),7.59(2H,d),7.49-7.42(2H,t),7.39-7.38(1H,d),4.83(2H,s)。

[0150] 步骤4:6-溴-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮

[0151] 在10ml微波小瓶中的是二甲基甲酰胺(1ml)中的N-溴代琥珀酰亚胺(78.6mg,0.441mmol)和7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮(50mg,0.221mmol)。将反应混合物在微波辐照下加热至80℃,持续30分钟。将反应混合物冷却至室温,并用乙酸乙酯(10ml)稀释。用水(2×10ml)和盐水(2×10ml)洗涤有机溶液。将有机相用无水Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩。通过Biotage色谱(梯度为0%至5%的二氯甲烷溶液中的甲醇)纯化粗残余物,得到为黄色固体的标题化合物(61mg,90%)。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ7.48-7.32(5H,m),7.12(1H,s),4.82(2H,s)。

[0152] 步骤5:6-溴-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮

[0153] 在15mL反应管中加入无水N,N-二甲基甲酰胺(1mL)中的碳酸钾(408mg,2.95mmol)、6-溴-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮(300mg,0.983mmol)和碘乙烷(0.095mL,1.180mmol),得到棕色悬浮液。在50℃和氮气气氛下搅拌60分钟。将该反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液(5mL)稀释,并用乙酸乙酯(3×5mL)萃取。将合并的有机相用50:50的水:盐水(3×5mL)洗涤,用Na₂SO₄干燥,过滤并减压浓缩至干燥,得到棕色固体。通过Biotage色谱(25g硅胶柱,环己烷:乙酸乙酯,从90:10至20:80进行梯度洗脱)纯化,得到为米色固体标题化合物(160mg,48.8%产率)。¹H NMR(500MHz,CDCl₃) δ7.58-7.37(5H,m),7.21(1H,s),4.86(2H,s),3.96(2H,q),1.27(3H,t)。LCMS(方法D)RT 1.293分钟,M+1=334。

[0154] **((1s,3s)-3-羟基-1-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯基)环丁基)氨基甲酸叔丁酯的合成(来自W02011077098的实施例97):

[0155] 在40mL反应管中加入无水四氢呋喃(14mL)中的(1s,3s)-1-(4-溴苯基)-3-羟基环丁基氨基甲酸叔丁酯*** (0.25g,0.731mmol),得到无色溶液。通过氮气通气20分钟使其脱气,随后加入[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)二氯甲烷加合物(60mg,

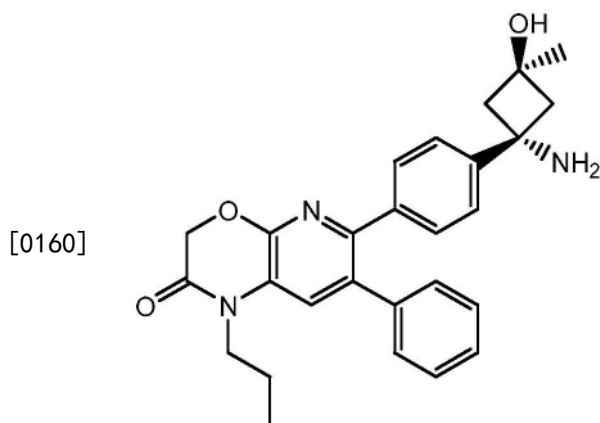
0.073mmol)。再用氮气通气15分钟后,加入乙酸钾(143mg,1.461mmol)和双(频哪醇合)二硼(223mg,0.877mmol)。将反应混合物加热至回流过夜,然后减压浓缩至干燥,并通过Biotage色谱纯化(环己烷:乙酸乙酯,从88:12至0:100进行梯度洗脱),得到为无色油(其在静置后固化)的目标产物(240mg,84%产率)。¹H-NMR (500MHz,CDCl₃) δ 7.71 (2H,d), 7.44 (2H,d), 4.15 (1H,br s), 2.87-2.98 (2H,m), 2.27-2.44 (2H,m), 1.22-1.49 (21H,br m)。

[0156] (**W02009148887和W02009148916中描述的合成)

[0157] 实施例2:体外药效学

[0158] 在生化激酶分析中,6-(4-(1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮L-酒石酸盐(VAD044)被发现能有效且选择性地抑制全长AKT1和AKT2的活性,其IC₅₀值分别为125nM和95nM(与针对AKT3的>500nM相比)。然而,所有三种含有无活性的普列克底物蛋白(pleckstrin)同源(PH)结构域的AKT亚型的突变形式均不被VAD044抑制。此外,与在ATP的K_m进行的实验相比,用增加浓度的ATP孵育VAD044对IC₅₀值没有影响。这证实了VAD044的结合模式是变构的,并且不依赖于ATP浓度。

[0159] 通过用VAD044游离碱的近似类似物(化合物6,如下)与AKT2复合(见图1A)获得的高分辨率(2.32 Å)共晶结构验证了假设的VAD044变构结合模式。



化合物 6

[0161] 如图1B所示,化合物6结合在距离PH结构域和激酶结构域的N-叶和C-叶的界面的铰链区约10 Å的变构结合袋中。

[0162] 实施例3:激酶选择性,以及受体和离子通道概况

[0163] VAD044是有效的AKT1和AKT2的变构抑制剂。测试了VAD044对目标无关蛋白激酶、G蛋白偶联受体和离子通道的选择性窗口。良好的选择性窗口表明在预期对患者有效的药理学浓度下具有良好的安全性。

[0164] 激酶选择性

[0165] 当对450种激酶的套组进行测试时,VAD044在10μM时显示出了对AKT1和AKT2的高度选择性(实现了89%的AKT1的抑制和95%的AKT2的抑制,如图2B所示)。值得注意的是,仅对另外两种激酶:p38α和PDK1,实现了超过75%的抑制(分别为84%和77%的抑制,也如图2B所示)。仅实现了72%的AKT3的抑制(见图2B)。

[0166] 通过10点滴定曲线的进一步分析证实了p38α和PDK1的IC₅₀大于10μM。

[0167] 此外,VAD044对于AKT1和AKT2的IC₅₀值(分别为IC₅₀=125nM和IC₅₀=95nM)被发现

远低于其对于AKT3亚型的IC₅₀值 (VAD044对AKT3亚型的EC₅₀值大于500nM)。

[0168] 因此,上述结果表明,VAD044是有效且选择性的AKT1和AKT2的抑制剂。

[0169] 受体和离子通道概况

[0170] 当以10μM进行测试时,VAD044不会抑制心脏离子通道Nav1.5、Cav1.2、Kv4.3、KChIP2、Kv1.5、KCNQ1、minK、Kir2.1和HCN4低于其活性的25%,并且在76个受体和离子通道的套组 (Millipore药物研发安全性和责任套组) 中显示出了优异的选择性。值得注意的是,在10μM时,只有三种G蛋白偶联受体 (GPCR) 表现出了超过50%的抑制作用,即LPA1、胃动素和P2Y1受体 (显示的平均抑制百分比值分别为57.4%、50.0%和50.6%),并且只有一种GPCR表现出了GPCR活性增加超过20%的激动活性 (即GPR14,在10μM时观察到了29.5%的增加)。这些结果显示在下表2中:

[0171]	GPCR 靶标	激动剂	拮抗剂	GPCR 靶标	激动剂	拮抗剂
		活性增加的平均百分比	平均抑制百分比		活性增加的平均百分比	平均抑制百分比

[0172]

5-HT1A	2.1	30.6
5-HT2A	1.3	-0.7
5-HT2B	3.7	7.6
5-HT2C	0.8	21.9
A1	0	7.7
A2A	2.3	12.5
A3	0.2	28.5
ADRA1A	-0.7	9.9
ADRA1D (DELTA2-79)	-0.1	7
ADRA2A	-0.2	11.8
ADRB1	-0.1	4.2
ADRB2	0.8	6.1
AT1	-0.1	5.4
BB2	-0.9	0.9
BDKR2	-0.4	14.6
BLT1	-0.2	5.6
C5aR	-1.2	1.5
CB1	-0.5	-4.1
CB2	-0.9	10.6
CCK2	-0.2	8.3
CCR1	0.2	9.5
CCR2B	-0.1	9.1
CGRP1	-0.1	-7.9
CRF1	0	2.3
CX3CR1	0	0.6
CXCR1	-0.3	3.7
CysLT1	-0.8	1.5
D1	1.5	18.7

	比	
GnRH	-0.6	4
GPR109A	-0.7	3.1
GPR14	29.5	52.9
H1	-0.2	3.8
H2	-0.2	-1.8
H3	-0.6	3.5
IP1	1.1	-2.6
LPA1	-1.3	57.4
LPA3	-0.7	-0.2
M1	-0.7	-3.4
M2	0	20.6
M3	-0.5	5.3
MC5	-0.2	8.4
胃动素	-0.3	50
NK1	-1.4	2.4
NK3	-0.4	16.9
NMU1	-3.1	5.5
NTR1	-0.6	6.1
OPRD1	-0.9	2.8
OPRM1	-2	2.4
OT	-1.2	29.5
OX1	-1.8	-3.8
P2Y1	1	50.6
PAC1	-0.6	1.1
PAF	-0.9	21
PK1	0	-2.1
PRP	-0.5	23.2
PTH1	-1.1	-2.5

[0173]	D2	-1.1	-0.2	S1P3	-0.4	-0.6
	D5	-0.8	35.4	SST4	-0.8	16.5
	DP	-1.7	5.8	凝血酶激活 PARs	0	-1.2
	EP2	-1	-0.5	TP	-0.5	0
	EP3	-0.1	9.2	TSH	-0.1	-0.5
	ETA	-0.4	10.5	V1A	-1.5	2.5
	ETB	-1.1	2.9	V2	-1.5	22.8
	FP	-0.7	13.6	VPAC1	-0.7	8.5
	FPR1	-0.1	13.3	VPAC2	0	6.2
	GAL1	0.3	3.4	Y2	-2.2	-5.7

[0174] 表2:Millipore药物研发安全性和责任套组的结果上述结果表明VAD044不干扰所测试的受体和离子通道。

[0175] 因此,VAD044的体外酶概况可总结如下:

[0176] -VAD044有效且选择性地抑制了AKT1和AKT2 ($IC_{50}=125nM$ 和 $95nM$),其窗口至少是AKT3亚型 ($IC_{50}>500nM$) 的5倍

[0177] -VAD044不干扰所测试的激酶、受体和离子通道的广泛套组。

[0178] 实施例4:三种AKT抑制剂化合物在Eng-iKO小鼠中的安全性/毒性;抗血管生成特性;和预防AVM形成的能力的研究

[0179] 材料/方法

[0180] 小鼠

[0181] C57Bl/6J怀孕雌鼠是由Janvier实验室提供的。EngFlox/flox小鼠 (Mahmoud et al., (2010), "Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin", Circulation Research. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211037>) 与Cdh5 (PAC) -CreERT2 (12) 杂交以产生内皮特异性诱导的Eng敲除。动物房和程序均符合荷兰政府指南和欧洲议会2010/63/EU指令。所有的努力都是为了尽量减少使用动物数量和它们的痛苦。莱顿大学医学中心动物福利机构委员会(项目编号AVD1160020171628)批准了所有方案。雄性小鼠和雌性小鼠在出生后第一周被用于研究视网膜血管生成。

[0182] 体内AKT抑制

[0183] 安全性/毒性特征和抑制血管生成的最小有效剂量的确定:

[0184] 在P4用每kg体重5mg、10mg、25mg、50mg或100mg的哌立福辛或每kg体重0mg、2.5mg、5mg、10mg、25mg或50mg的Uprosertib或每kg体重2.5mg、5mg和10mg的VAD044对野生型C57Bl/6J幼鼠进行一次注射,然后在P7处死该幼鼠。如上所述对视网膜进行免疫荧光染色处理 (Lebrin et al., (2010), "Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia", Nature Medicine. <https://doi.org/10.1038/nm.2131>)。

[0185] 预防Eng-iKO小鼠AVM的形成的最小有效剂量的确定:

[0186] 用他莫昔芬(50 μ g)对P2的EngFlox/flox;cdh5-CreERT2进行注射以在新生小鼠中诱导几乎完全的基因敲除,随后用每kg体重0mg、25mg或50mg的哌立福辛在P3和P5时各进行一次IP注射,或用每kg体重10mg的哌立福辛在P3、P4、P5和P6时各进行一次IP注射。注射相同体积的载体的小鼠作为对照动物。然后在P7时对小鼠实施安乐死,并如上所述对视网膜进行免疫荧光染色处理(Lebrin et al.,同上)。

[0187] 用他莫昔芬(50mg)对P2的EngFlox/flox;cdh5-CreERT2进行注射以在新生小鼠中诱导几乎完全的基因敲除,随后用每kg体重0、1mg、2.5mg或5mg的Uprosertib在P3时进行一次IP注射。注射相同体积的载体的小鼠作为对照动物。然后在P7时对小鼠实施安乐死,并如上所述对视网膜进行免疫荧光染色处理(Lebrin et al.,同上)。

[0188] 用他莫昔芬(50mg)对P2的EngFlox/flox;cdh5-CreERT2进行注射以在新生小鼠中诱导几乎完全的基因敲除,随后用每kg体重0、2.5mg、5mg或10mg的VAD044在P3和P5时各进行一次IP注射。注射相同体积的载体的小鼠作为对照动物。然后在P7时对小鼠实施安乐死,并如上所述对视网膜进行免疫荧光染色处理(Lebrin et al.,同上)。

[0189] 视网膜血管网络分析

[0190] 对于视网膜血管网络,每只小鼠AV分流数量的定量是人工完成的。通过Image J软件(美国国立卫生研究院)对每个视网膜的至少4个视野的视神经的径向扩张、血管长度和分支点进行分析,如Lebrin et al., (2010), “Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia”, Nature Med, 16(4), 420-8; Gkatzis et al., (2016), “Interaction Between ALK1 Signaling and Connexin40 in the Development of Arteriovenous Malformations”, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 36(4), 707-17; and Thalgott et al., (2018), “Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Contributes to the Pathogenesis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2”, Circulation, 138(23), 2698-2712所述。自己实验室定制的宏允许使用相同的处理和量化参数来自动处理图像。简而言之,通过修改像素极值来增强图像的亮度,这取决于具体的图像直方图内容。应用高斯滤波器来降低同质强度。滤波器阶数取决于图像分辨率。接下来,基于全局阈值技术例如Otsu的方法或Li的方法,计算阈值步长,产生二值图像。然后应用中值滤波器来消除潜在的可能导致错误分支点检测的局部不规则性。从二值图像中量化血管密度(计算为与血管相关的像素除以图像中的像素总数的比率)。对于其他参数,首先使用ImageJ计算图像的骨架,然后使用ImageJ的Measure Skeleton Length插件来量化总血管长度。分支点的数量是从ImageJ的Analyze Skeleton插件中提取的。将所有结果转移到Microsoft Office Excel软件中,并使用实验室定制的程序自动重新排列。由于在每个处理步骤中生成的所有图像都已保存,因此进行了可视化管理以确保没有异常结果。

[0191] 用Prism 7软件(GraphPad)进行统计分析。对于大多数实验,将单因素方差分析用于多重比较。结果以平均值 $\pm$ SEM表示。对于事后两两比较,使用Dunnett检验。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 或 $****P<0.0001$ 的值表示统计学显著性。发明人先前已经观察到与血管结构变化相关的参数中的约15%的组内变化,因此预期对照小鼠和突变小鼠之间的差异约为20%至30%。因此,预计每个条件下的一组8只小鼠将显示出统计学差异。

[0192] 小鼠内皮细胞的分离、培养和刺激

[0193] 手术切除Engflox/flox幼鼠的肺,在冰冷的DMEM中冲洗,并分离内皮细胞,如Galaris et al., (2021) “In vitro Three-Dimensional Sprouting Assay of Angiogenesis using Mouse Embryonic Stem Cells for Vascular Disease Modeling and Drug Testing” J Vis Exp(171)中所述。总之,将组织用剪刀剪碎,在DMEM-3mg.ml⁻¹胶原酶A(10103586001,Roche)中于37℃消化15分钟,然后通过70-μm过滤器过滤。将细胞悬浮液以200g离心5分钟,并使用大鼠抗小鼠CD45抗体(550539,BD Pharmigen)包被的Dynabeads绵羊抗大鼠IgG(11035,Invitrogen)去除CD45⁺细胞。根据制造商的说明,使用大鼠抗小鼠PECAM1抗体(550274,BD Pharmigen)包被的Dynabeads绵羊抗大鼠IgG(11035,Invitrogen)来分选内皮细胞。用DMEM-0.1% BSA洗涤5次后,将细胞接种在6孔板中。将肺和肝的EC在补充有胎牛血清、人表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、人血管内皮生长因子-165、抗坏血酸、肝素和氢化可的松(C-39211,SupplementPack EC GM2,PromoCell)的内皮细胞生长培养基2(C-22011,PromoCell)中维持2至3代。

[0194] 将EC接种在六孔板中,使其生长至90%汇合。然后将细胞用PBS洗涤,血清饥饿6小时。将细胞在内皮细胞生长培养基2(C-22011,PromoCell)中用0.05mM、0.1mM、0.25mM、0.5mM、1.0mM、5.0mM或10.0mM的VAD044处理1小时,然后用VEGF-A(25ng.ml⁻¹)刺激30分钟。将细胞用冷PBS洗涤,然后在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(PPC1010,Sigma-Aldrich)的RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、1mM乙二胺四乙酸(EDTA)、1% Triton X-100、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5%脱氧胆酸盐)中裂解。

[0195] 腺病毒感染

[0196] 用表达Cre重组酶的腺病毒(SL100707,SignaGen Laboratories)感染肺或肝的EC,感染复数(m.o.i)为500,持续6小时,用PBS洗涤,然后在使用前在内皮细胞生长培养基2中培养12至60小时。

[0197] 免疫荧光染色

[0198] 将眼睛在PBS中的4%多聚甲醛(PFA)中在室温固定10分钟,解剖出视网膜,在PBS中的4% PFA中在4℃随后固定过夜,然后进行免疫染色。将视网膜在PBS、1% BSA和0.5% Triton X-100中于4℃渗透化过夜,在PBS中漂洗,在PBlec(PBS,pH 6.8、1% Triton-X-100、0.1mM CaCl₂、0.1mM MgCl₂、0.1mM MnCl₂)中洗涤两次,然后在PBlec中的生物素化的Griffonia simplicifolia凝集素(同工凝集素B4)(B-1205,Vector Laboratories,1:50)中在4℃孵育过夜。在PBS中洗涤5次后,将样本与用PBS、0.5% BSA和0.25% X-100稀释的链霉亲和素Cy-3(PA43001,Sigma-Aldrich,1:100)和缀合有FITC的α-SMA(克隆1A4)(F3777,Sigma-Aldrich)在4℃孵育2小时。洗涤后,将平坦的全铺片视网膜(whole-mount retina)铺在Dako培养基(S3023,DAKO)中。使用激光扫描显微镜SP5或SP8(Leica)获得全铺片视网膜的高分辨率的三维渲染。

[0199] 蛋白质印迹和定量

[0200] 将样本煮沸10分钟,并将蛋白质在10%丙烯酰胺凝胶上分离并转移到硝酸纤维素膜上,然后用5% BSA或5%奶粉/Tris缓冲盐水/Tween 20进行封闭,并与以下的一抗一起孵育:兔抗磷酸化Akt1(Ser473)(44-621G,Invitrogen)、兔抗Akt1(2938S,Cell Signaling)、兔抗磷酸化Smad1/5(Ser463/465)(9516S,Cell Signaling)、兔抗Smad 1

(6944S, Cell Signaling)、小鼠抗磷酸化p44/42MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) (9106S, Cell signaling)、兔p44/42MAPK (Erk1/2) (9102S, Cell Signaling)、山羊抗内皮糖蛋白 (AF1097, R&D systems) 和小鼠抗 β -肌动蛋白 (A5441, Sigma-Aldrich)。使用HRP抗兔IgG或HRP抗小鼠IgG (分别为W4011或W4021, Promega) 或HRP抗山羊IgG (HAF017, R&D systems) 进行检测, 然后在BIO-RAD ChemiDoc成像仪上扫描。在线性范围内获取图像, 使用ImageJ软件测量蛋白质和蛋白质磷酸化水平。对于所有印迹, 减去背景并将结果归一化, 如图所示。

[0201] VAD044在新生小鼠中的药代动力学(PK)特性

[0202] 在无菌PBS中配制VAD044, 并通过腹膜内(i.p.)途径以2.5mg/kg的剂量浓度和10 μ l/g的剂量体积施用于P3和P5的新生小鼠。从在异氟烷麻醉下的每只小鼠中收集注射后24小时和48小时的终末血样, 用于血浆的制备。在研究中, 每个时间点使用4只新生小鼠。将血液收集到EDTA涂层的微试管(microvettes, Sartsted)中用于血浆的制备。将血液以2700 $\times$ g离心10分钟, 并取出约30 μ l至40 μ l血浆, 并等分到聚丙烯管中(每只动物两等份)。将血浆样本储存在-80 $^{\circ}$ C, 直至进行生物分析。通过LC-MS/MS测定血浆样本中的VAD044化合物水平。24小时和48小时的VAD044血浆浓度允许使用以下公式计算Cavg: AUC0-inf/(48小时的间隔数)。

[0203] 人体剂量模拟

[0204] 使用合格安装了MONOLIX (版本2019R1) 的非线性混合效应建模方法进行人体剂量模拟分析。R (版本3.5.3) 用于数据和模型输出的预处理和后处理的分析。用于建立模型的小鼠、大鼠和犬类物种中产生的所有PK原始数据总结在表3中, 表3给出了总体分析中纳入的动物数量和样本数量的概述。

[0205] 表3 VAD044的可用浓度观测值汇总

	数据	N 动物	N 样本	N 纳入分析样本
	小鼠	15	90	90 (100%)
[0206]	大鼠	161	861	861 (100%)
	犬类	38	448	448 (100%)
	总计	214	1399	1399 (100%)

[0207] 人体模型的PK参数是基于清除率和容积参数随体重的异速缩放来确定的。对于生物利用度和吸收率, 必须做出假设。吸收速率kabs是使用指数为-0.25的体重的异速缩放从犬类的值中得出的。该指数之前在与kabs, 1/时间相同的物理单位相关的其他参数中被观察到, 参见Dawson TH. Allometric relations and scaling laws for the cardiovascular system of mammals. Systems. 2014 Jun; 2(2):168-85。当前分析中的数据无法告知人体的生物利用度值。因此, 必须做出合理的假设, 50%的人体生物利用度被认为是足够保守的估计。

[0208] 如下所述, 通过LC/MS/MS生物分析测定的剂量为2.5mg.kg⁻¹的VAD044游离碱在新生小鼠血浆中的血液暴露对应于48小时给药间隔内22.9ng/ml (或55.1nM) 的Cavg。根据PK模型, 预计人类在单次固定剂量Q.D. 为20mg至40mg (VAD044游离碱) 时可达到这种暴露。这一剂量是针对体重为70公斤的成年人计算的, 且预计VAD044的生物利用度为50%至75%。

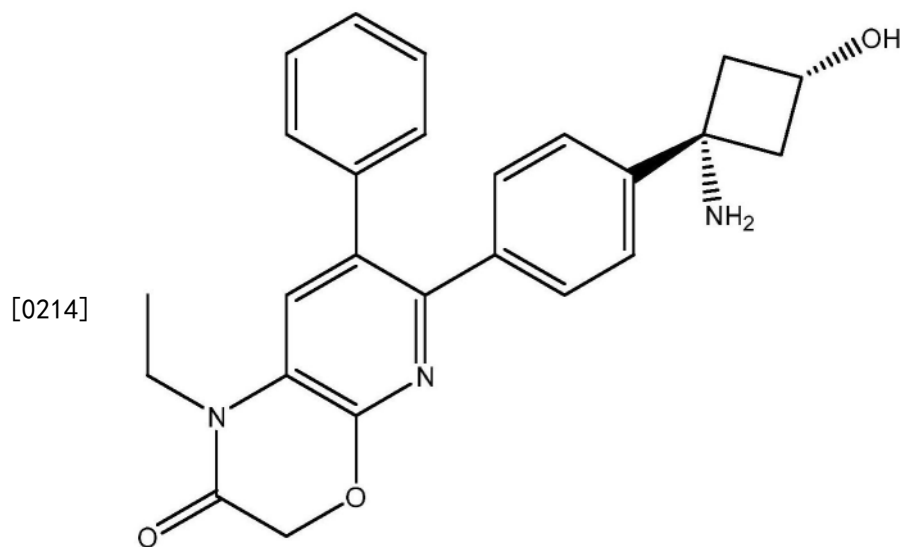
[0209] 评估的化合物

[0210] 测试了三种具有不同AKT激酶抑制特性的化合物:

[0211] (i) 哌立福辛(对比化合物): 一种烷基磷脂类的AKT抑制剂。与ATP结合激酶抑制剂不同, 哌立福辛靶向AKT的普列克底物蛋白同源(PH)结构域, 从而防止其转位至质膜(Gradziel et al., (2014), "Cytotoxic amphiphiles and phosphoinositides bind to two discrete sites on the Akt1 PH domain", Biochemistry, <https://doi.org/10.1021/bi401720v>; Kondapaka et al., (2003), "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation", Molecular Cancer Therapeutics; Ríos-Marco et al., (2017), "Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance", In Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.016>))

[0212] (ii) Uprosertib(对比化合物): AKT1、AKT2和AKT3的ATP竞争性抑制剂。它还可能抑制PKC家族成员, 包括PRKACA、PRKACB以及cGMP依赖性蛋白激酶PRKG1和ROCK激酶(Dumble et al., (2014), "Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor", PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100880>)

[0213] (iii) VAD044(本发明的化合物): 一种新型AKT1/2变构抑制剂, 对其他激酶具有优异选择性。如上所述, VAD044是如下所示化合物的L-酒石酸盐(被称为“VAD044游离碱”):



VAD044 游离碱

[0215] IUPAC名称: 6-(4-(1-氨基-3-羟基环丁基)苯基)-1-乙基-7-苯基-1H-吡啶并[2,3-b][1,4]噁嗪-2(3H)-酮

[0216] 哌立福辛概况

[0217] 毒性

[0218] 在P4时对新生小鼠注射一次剂量为5mg.kg⁻¹至25mg.kg⁻¹的哌立福辛, 未观察到不良反应。施用50mg.kg⁻¹的哌立福辛延迟了体重增加, 而施用100mg.kg⁻¹的哌立福辛诱导了重要的幼鼠死亡率(参见图3)。因此, 当与诸如沙利度胺(Thalidomide)等药物相比时, 哌立福辛的安全性是令人满意的, 沙利度胺之前已经在新生小鼠中进行了测试, 并且据报道可以降低HHT患者流鼻血的严重程度和频率(Lebrin et al., 同上)。

[0219] 在C57B1/6J小鼠中的抗血管生成特性

[0220] 在P4时注射一次低剂量的哌立福辛(剂量范围为 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 至 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)没有影响血管生成(参见图4A-4D)。只有范围为 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 至 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的高剂量的哌立福辛导致了视网膜血管床的轻微变化,分支点的数量和血管面积略有减少(参见图4A-4D)。 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的哌立福辛还导致了血管径向扩张减少,显示出轻微的内皮细胞抗迁移特性(参见图4A-B)。总之,哌立福辛显示出了弱的抗血管生成特性。

[0221] 在Eng-iK0小鼠中预防AVM形成的能力

[0222] 对P2的Eng-iK0小鼠注射 $50\mu\text{g}$ 他莫昔芬。然后在P3和P5时(每kg体重 25mg 或 50mg , i.p) (图5A)或从P3到P6的每天(每kg体重 10mg , i.p)对小鼠腹腔内施用哌立福辛。在P7时对视网膜进行分析(图5A)。将单独注射载体或单独注射他莫昔芬和载体的同窝幼鼠用作对照。正如预期的那样,在P2的Eng条件性缺失导致了视网膜AVM形成(图5B)和适度减少的血管生长(图3D)。在所测试的剂量和注射方案(图5A-5F)下,哌立福辛不能预防Eng-iK0小鼠中的AVM的形成(图5C),并且不能抑制血管生成(图5D-E)。此外,每日腹腔内施用 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的哌立福辛导致了幼鼠死亡(数据未显示)。

[0223] Uprosertib概况

[0224] 毒性

[0225] 在P4单次注射Uprosertib(浓度范围为每kg体重 10mg 至 50mg)后,在P4至P7观察到的野生型小鼠的幼鼠存活率和体重证明了Uprosertib具有高毒性,参见图6A-6B。发现对Eng-iK0小鼠施用每kg体重 1mg 至 5mg 的剂量会导致大多数幼鼠死亡。

[0226] 在C57B1/6J小鼠中的抗血管生成特性

[0227] 即使在P4以低剂量($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 至 $25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p)施用一次,Uprosertib也能抑制血管生成,并伴随着径向扩张略有下降(图7B);以及血管面积(图7C)和分支点数量(图7D)的显著减少,表明了内皮细胞抗增殖作用。这些结果表明Uprosertib是小鼠视网膜中的血管生成的有效抑制剂。

[0228] 在Eng-iK0小鼠中预防AVM形成的能力

[0229] 对Eng-iK0小鼠在P3和P5注射两次Uprosertib(图8A)。然而,发现注射两次Uprosertib会导致大多数幼鼠死亡(图8B),从而阻碍了进一步研究Uprosertib在测试剂量下在小鼠中预防AVM形成的能力。

[0230] VAD044概况

[0231] 在之前的肿瘤异种移植模型的临床前研究中,化合物VAD044已被证明具有良好的安全性,因此未进行额外的安全性/毒性研究。

[0232] 在Eng-iK0小鼠中预防AVM形成的能力

[0233] 所测试的浓度与Uprosertib的使用浓度相当(图9A)。在这些浓度下,当用药物浓度范围为每kg体重 1.25mg 至 10mg 的VAD044对新生Eng-iK0小鼠进行两次注射(在P3和P5)时,没有观察到不良反应(图9B)。在 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及以上的浓度下,VAD044有效地阻止了Eng-iK0小鼠中的AV分流的形成(图10A-10B)。 $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量被发现不能有效预防AV分流的形成(图10A-10B)。VAD044还能够使Eng-iK0小鼠的视网膜血管网络的密度正常化(图10D),同时对血管生成的影响较小,略微减少了Eng-iK0血管网络的径向扩张(图10C)和分支点的数量(图10E)。通过LC/MS/MS生物分析测定的剂量为 $2.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的VAD044游离碱在

新生小鼠血浆中的血液暴露对应于48小时给药间隔内22.9ng/ml (或55.1nM) 的Cavg。

[0234] 原代小鼠内皮细胞内皮糖蛋白的蛋白缺失优先诱导AKT激活

[0235] 在出生后第7天 (P7), 使用基于胶原酶I的酶消化从Engflox/flox幼鼠的肺中分离出原代内皮细胞, 随后用PECAM1包被的微珠进行细胞分选 (图11A)。CD45包被的微珠用于消耗CD45+/PECAM1+免疫细胞群 (图11A)。分离的CD45-/PECAM1+细胞群类似于内皮细胞群, 并且至少可以培养三代。血小板内皮细胞粘附分子1 (PECAM1) 和血管内皮钙粘蛋白 (VE-cadherin) 染色证实了内皮细胞的身份 (图11B)。

[0236] 利用Cre-Lox系统, 用编码Cre重组酶的重组腺病毒感染原代内皮细胞培养物, 以切除Eng基因。腺病毒感染是高效的, 并且对细胞活力没有影响。在最初10小时内, 几乎所有细胞都经历了基因重组, 由于内皮糖蛋白是一种相对稳定的蛋白, 其半衰期估计为约17小时, 因此在感染后的最初60小时内获得了同质的内皮细胞培养物, 随着内皮糖蛋白水平从正常和降低一半到完全丧失, 如染色和蛋白质印迹分析所示 (图11C-11D)。

[0237] 然后研究了Eng蛋白表达缺失的肺内皮细胞中的Akt和Smad1信号传导途径的激活。在对应于不同的内皮糖蛋白表达水平的感染后的不同时间, 将细胞用VEGF、TGF- β 1和BMP9处理30分钟。如Jakobsson实验室之前所发表的 (Jin et al., 2017-同上), 我们能够证实内皮糖蛋白的蛋白表达减少与Akt磷酸化的增加有关 (图12A)。最有趣的是, AKT磷酸化对Eng蛋白减少更敏感, 因为与表达正常水平的内皮糖蛋白的内皮细胞相比, Eng蛋白的减少50%诱导了AKT磷酸化的增加 (图12A), 而Smad1磷酸化没有变化 (图12B)。该结果表明, 内皮糖蛋白表达减半诱导了VEGF反应增加和AKT信号传导增加 (增加了增殖和迁移, 并导致血管畸形), 而经典的BMP/SMAD信号传导保持正常。

[0238] 在对照和Eng-iKO小鼠内皮细胞中的VAD044 IC50的测量

[0239] 随后测试了VAD044对从Eng-iKO小鼠分离的原代肺内皮细胞的作用。正如所预期的, Cre腺病毒感染导致在60小时后的内皮糖蛋白表达的完全丧失 (图13A)。来自Eng表达水平正常的对照组的EC对VAD044是高度敏感的, 测得的IC50为55nM, 而在表现出Eng表达完全丧失的肺小鼠内皮细胞中VAD044的IC50为93nM (图13B)。当Eng蛋白被完全敲除时, AKT激活的增加 (约2至4倍) 可以解释这种约2倍的IC50位移 (图12A)。与此同时, 分析p42/p44磷酸化作为选择性的对照, 并且证实了VAD044对MAPK途径没有影响 (图13C)。

[0240] 结果/讨论

[0241] Uprosertib是一种竞争性AKT抑制剂, 其与AKT1、AKT2和AKT3亚型的ATP激酶结合袋结合。这种化合物是一种典型的低分子量支架, 具有有效的泛ATP激酶袋抑制作用 (Dumble et al., 2014)。然而, 在AKT和蛋白激酶A (PKA)、蛋白激酶C (PKC) 或蛋白激酶G (PKG) 之间的ATP结合袋存在高度同源性。因此Uprosertib对PKA、PKG、PKC以及ROCK激酶均表现出强烈的抑制作用。这种“脱靶”激酶活性通常与副作用增加有关 (Rodon et al., (2013), "Development of PI3K inhibitors: Lessons learned from early clinical trials", Nature Reviews Clinical Oncology, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.10>)。

[0242] 相比之下, 变构抑制剂似乎对AKT有更高的特异性。例如, VAD044是一种新的AKT变构抑制剂, 其在此类抑制剂中提供了最大的选择性, 具有对AKT1和AKT2的强效力 (US9221838B2)。哌立福辛是一种不寻常的变构抑制剂, 其作用于AKT的普列克底物蛋白同

源结构域,从而阻止其转运至激活所需的质膜。

[0243] VAD044对AKT激酶抑制的生化效力和细胞效力与Uprosertib相当。例如,基于类似的生化激酶活性分析,Uprosertib和VAD044对AKT1的 IC_{50} 分别为180nM和125nM(参见Pachl, et al (2013).“Characterization of a chemical affinity probe targeting Akt kinases”,*Journal of Proteome Research*,<https://doi.org/10.1021/pr400455j>;和上述VAD044的实施例3)。类似地,两种分子在Pi3K α 或PTEN突变细胞系(例如MCF7、BT474或LnCAP)中显示出相当的AKT激酶抑制 IC_{50} 范围,Uprosertib为34nM至143nM,VAD044为50nM至130nM。相比之下,哌立福辛的效力弱于VAD044和Uprosertib,对类似细胞系的AKT的细胞抑制活性在 μ M范围内(Gradziel et al.,2014;Kondapaka et al.,2003;Ríos-Marco et al.,2017——同上)。

[0244] 上述结果表明,不可能确定同时具有可接受的安全性和所需抑制效力的哌立福辛和Uprosertib的治疗剂量窗口。对于哌立福辛,即使在预期完全抑制AKT激酶的高剂量下,其对正常血管生成和AVM分流的影响也只是适度的。在可耐受的最高剂量(25mg.kg⁻¹和50mg.kg⁻¹)下,在HHT1小鼠模型中未观察到对分流形成的显著影响。当每天注射10mg.kg⁻¹时,观察到了疗效趋势,但并未达到统计学显著性。相比之下,在P3注射一次后,Uprosertib显示出了强大的抗血管生成特性。5mg.kg⁻¹的剂量具有良好的耐受性,并被选择用于疗效研究。然而,当在P3和P6注射两次时,5mg.kg⁻¹的剂量导致了高水平的幼鼠致死率,因此排除了对于其在预防AVM分流形成的功效的任何进一步评估。这可能是由于Uprosertib对PKA、PKG和ROCK激酶的脱靶抑制作用,这些激酶可能参与了P3至P7的幼鼠发育(Shi et al., (2011),“Rho-kinase in development and heart failure:Insights from genetic models”,*Pediatric Cardiology*.<https://doi.org/10.1007/s00246-011-9920-0>)。

[0245] 在类似于5mg.kg⁻¹的剂量下,两次注射VAD044的耐受性良好,未观察到致死性。在2.5mg.kg⁻¹的剂量下,VAD044能够完全预防AVM分流的形成。令人惊讶的是,该剂量对正常的血管生成几乎没有影响,同时完全有效地预防了分流的形成。

[0246] 该结果表明VAD044可能能够通过抑制AKT途径的机制来治疗在HHT观察到的血管缺陷。这也表明抑制部分途径可足以治疗在HHT观察到的血管缺陷。首先,上述结果证实内皮细胞中的Eng缺失优先过度激活AKT信号传导(2至4倍),而SMAD信号传导保持正常。上述结果中所确定的2.5mg.kg⁻¹的最小有效剂量对应于22.9ng/ml(或55.1nM)的VAD044游离碱Cavg的血液暴露量。该浓度较低,相当于VAD044在正常内皮细胞中抑制AKT的 IC_{50} ,并且相当于VAD044在Eng蛋白缺失的内皮细胞中抑制AKT的 IC_{30} - IC_{40} 。令人惊讶的是,HHT模型中VAD044的最小有效剂量远低于在肿瘤适应症中的。尽管VAD044在体外MCF7肿瘤细胞中的 IC_{50} 是相似的(约50nM),但在肿瘤异种移植模型中的体内最小有效剂量是30mg.kg⁻¹,即比上述HHT1小鼠模型中的高约10倍。根据不同的PK模型,这一有效浓度(相当于22.9mg/mL的Cavg)预计可以以20mg至40mg(VAD044游离碱)的单次固定剂量Q.D.在人体中实现。这一剂量是针对体重为70公斤的成年人计算的,且预计VAD044的生物利用度为50%至75%。

[0247] 总之,这些结果表明携带HHT基因缺失的血管和内皮细胞对AKT抑制非常敏感。因此,当该途径被过度激活时,低剂量的VAD044可以有效地控制血管畸形,这可能是由在HHT观察到的BMP9信号传导的抑制,也可能是由功能突变的获得所引起的,如在由体细胞突变PI3K α 或TIE2导致的过度生长综合征或静脉畸形中所观察到的(Castillo et al.,

(2016), "Phosphoinositide 3-kinase: a new kid on the block in vascular anomalies", Journal of Pathology (Vol.240, Issue 4, pp.387-396). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/path.4802>。

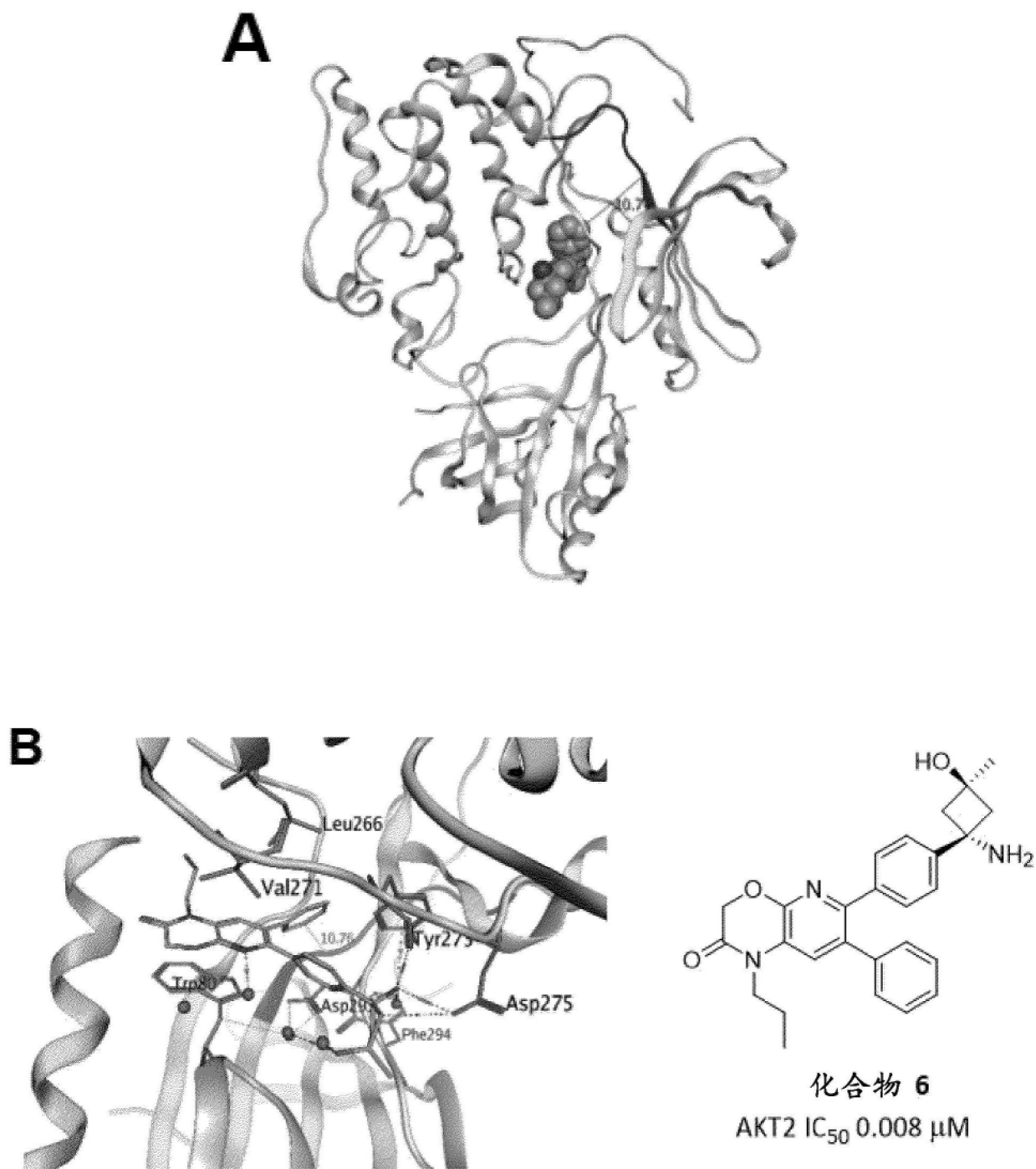


图1A&1B

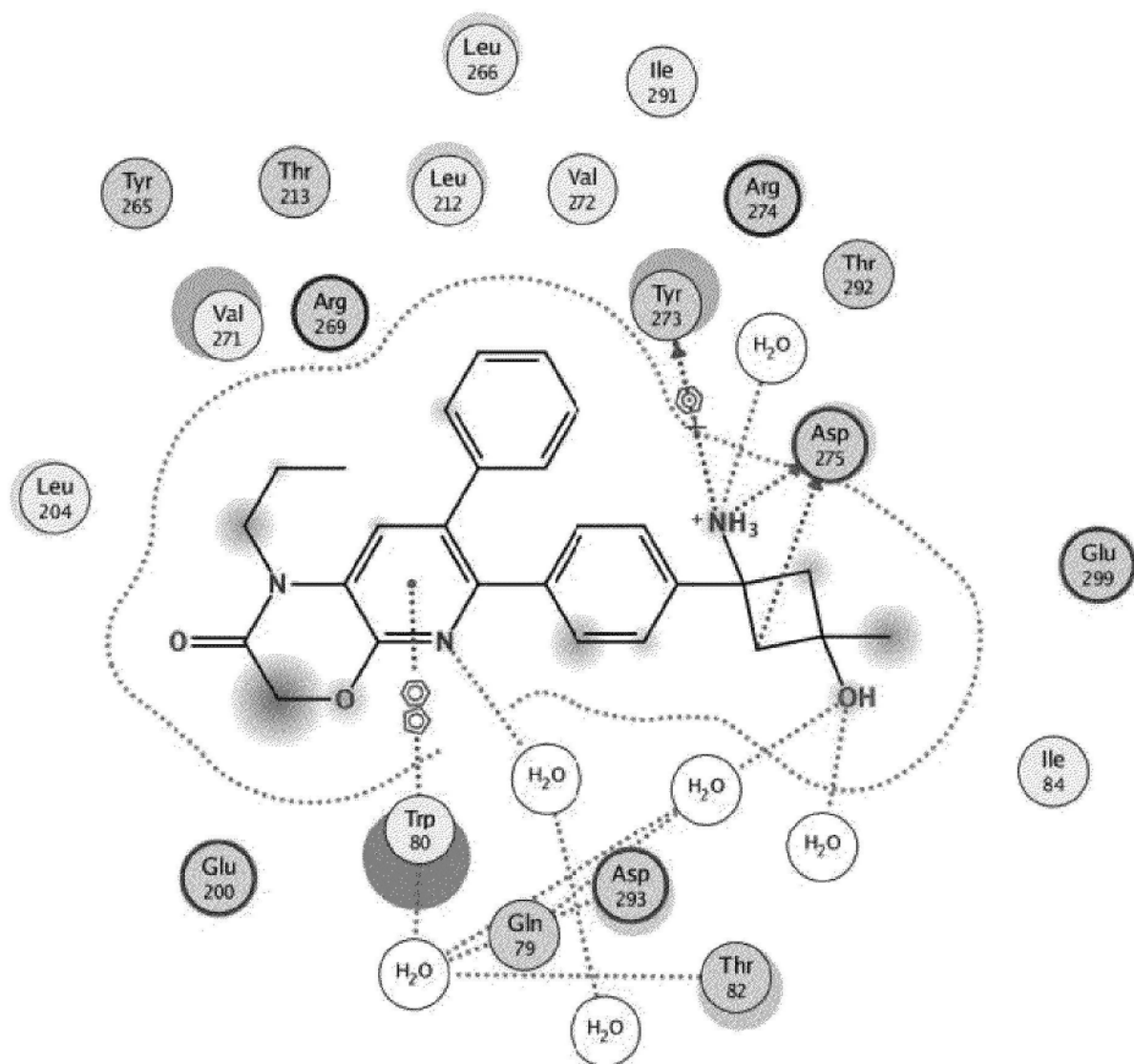


图1C

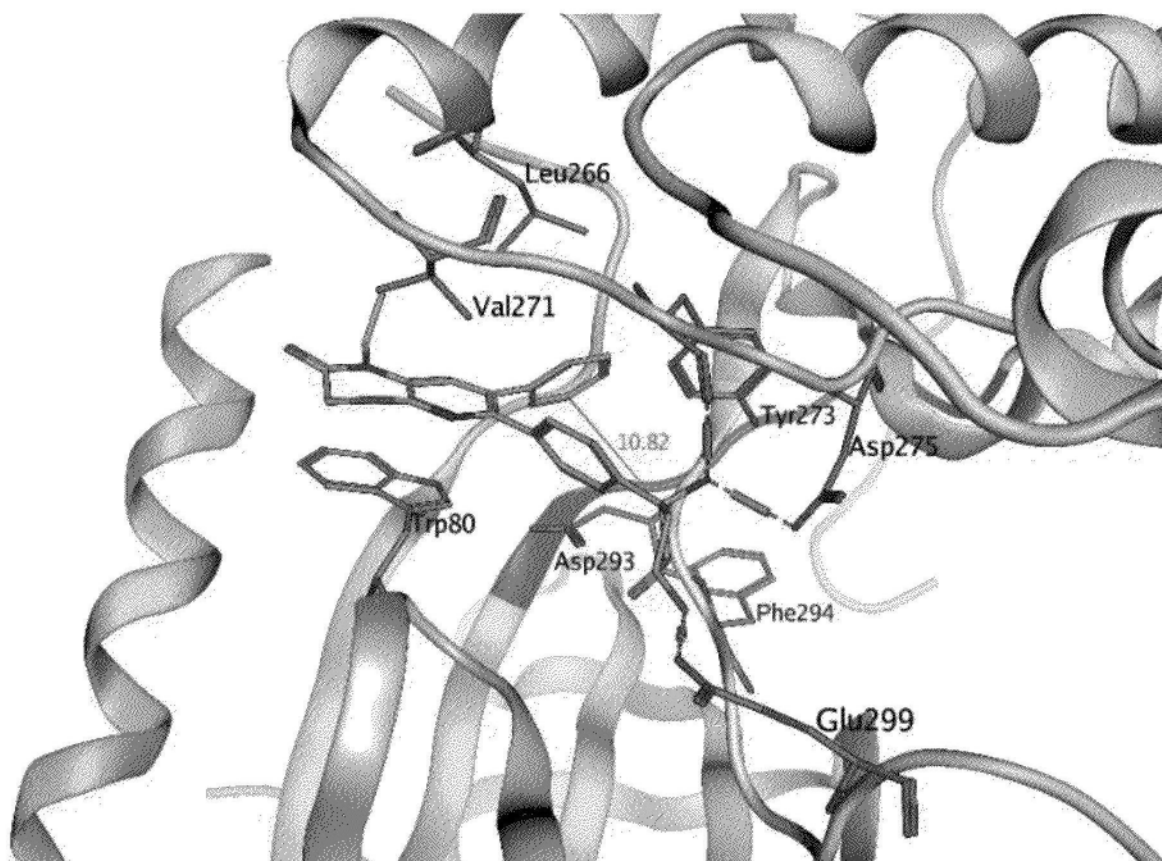


图1D

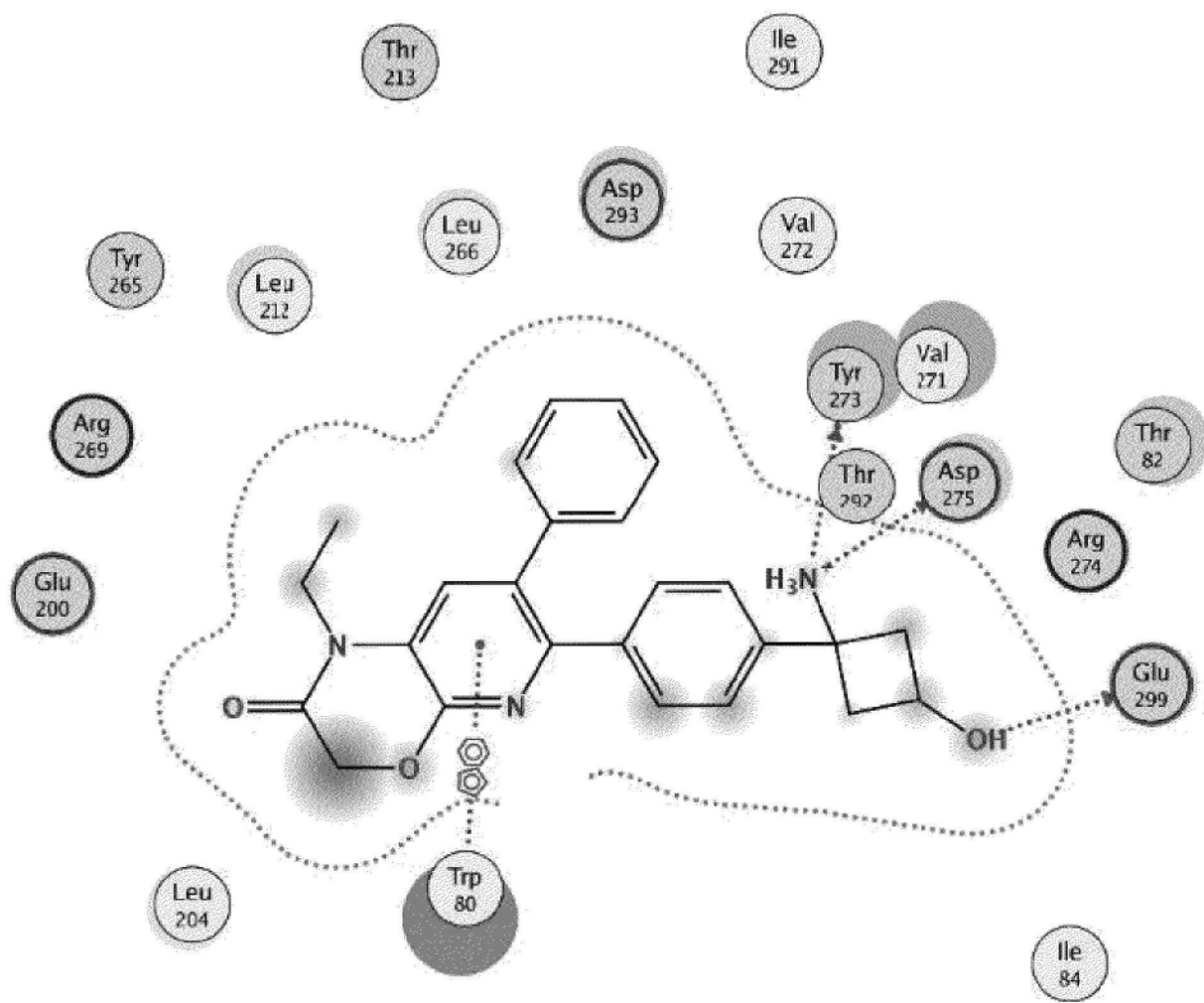
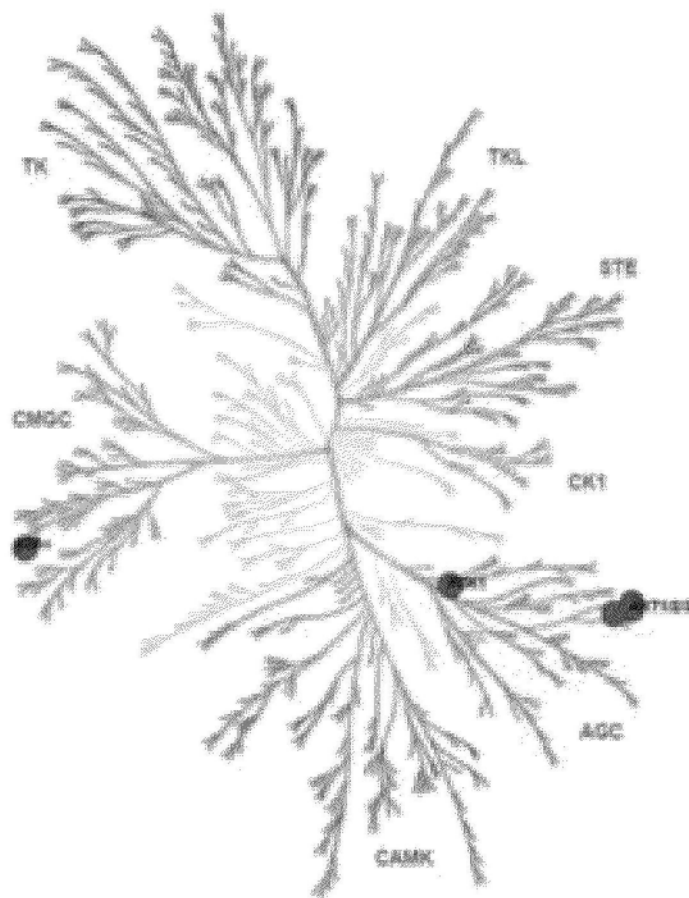


图1E

A**B**

激酶	%抑制 @ 10 μ M
AKT2	95
AKT1	89
p38 α	84
PDK1	77
AKT3	72

图2

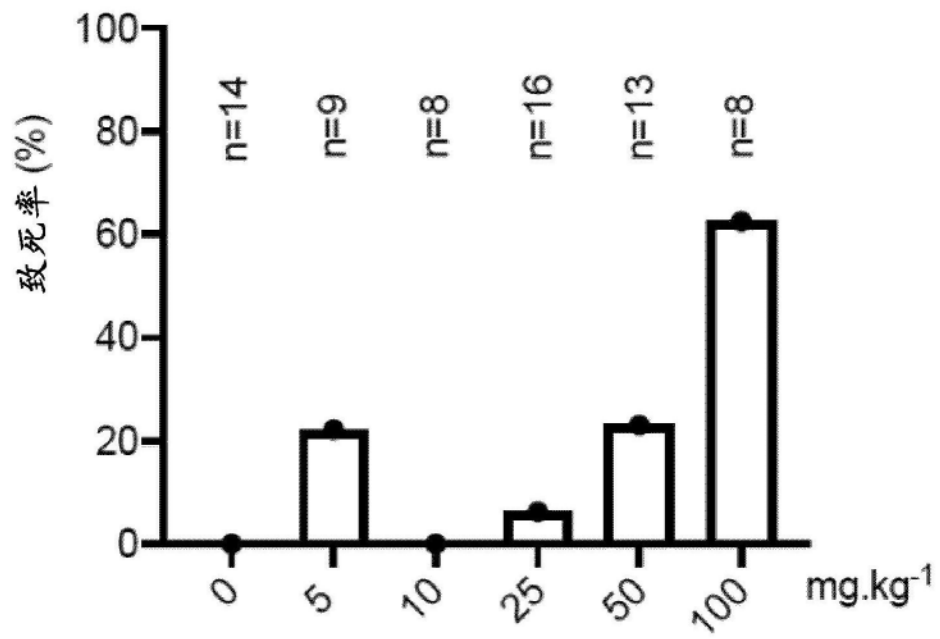
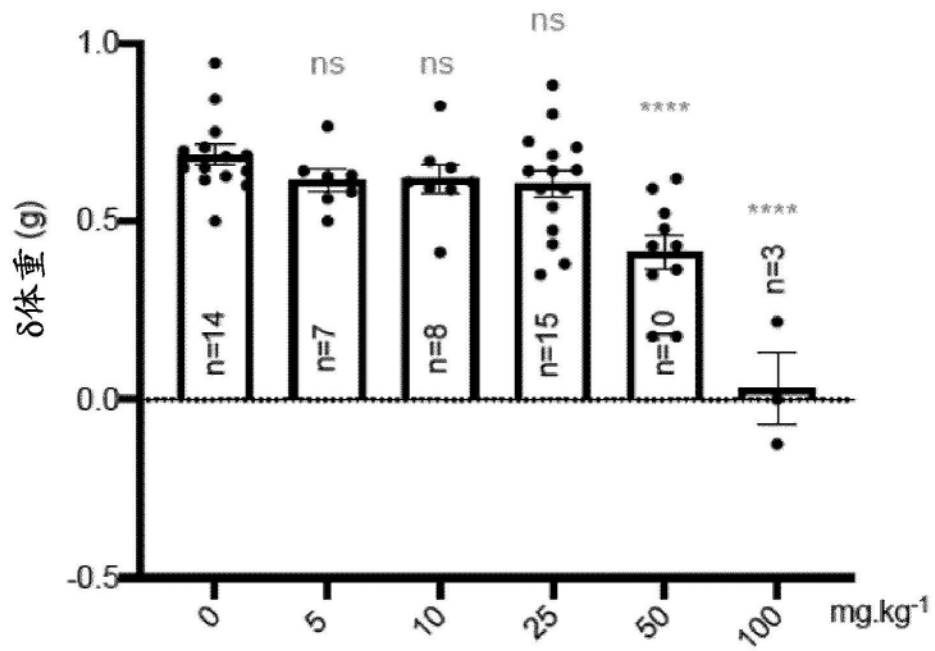
A-**B-**

图3

A-

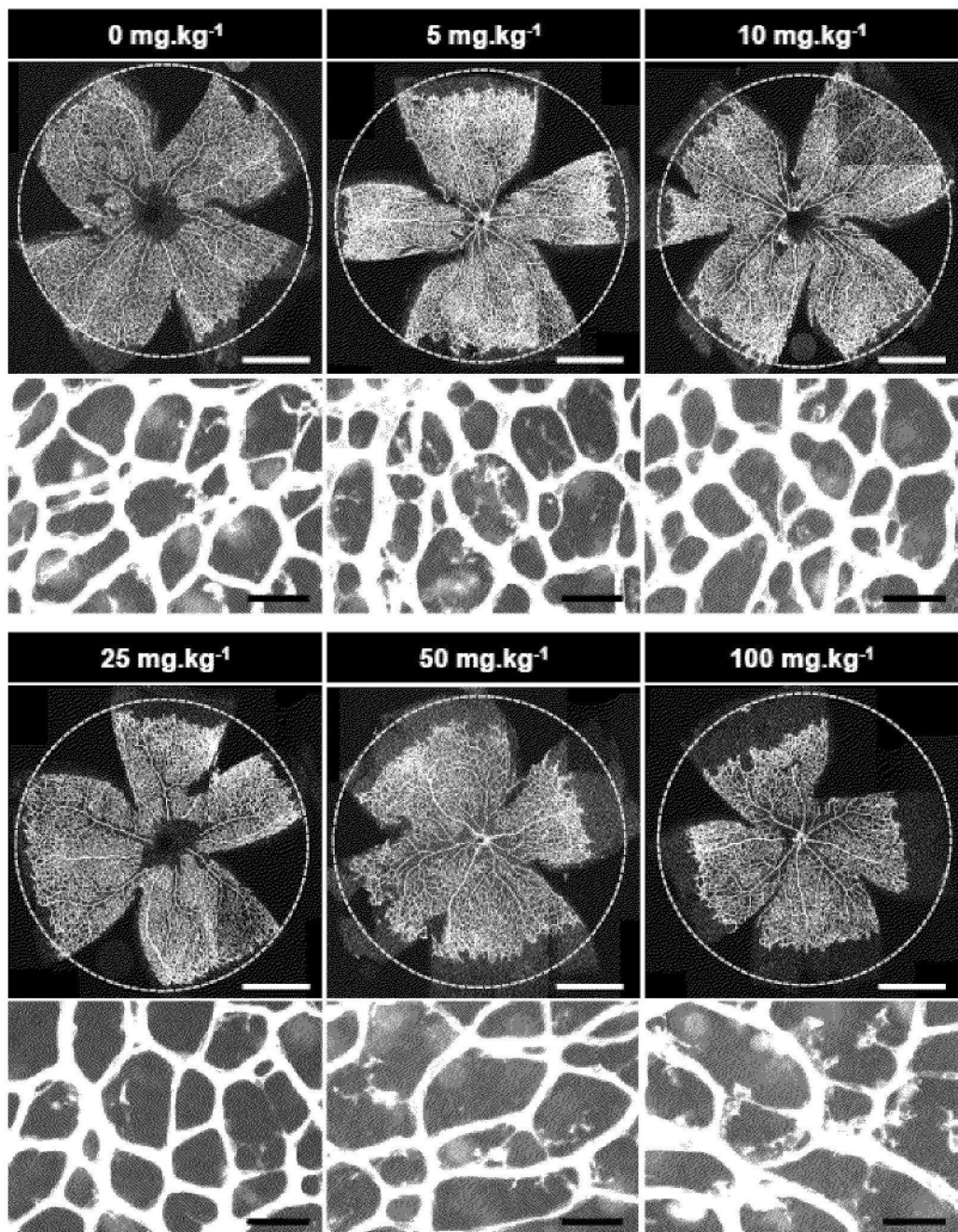


图4A

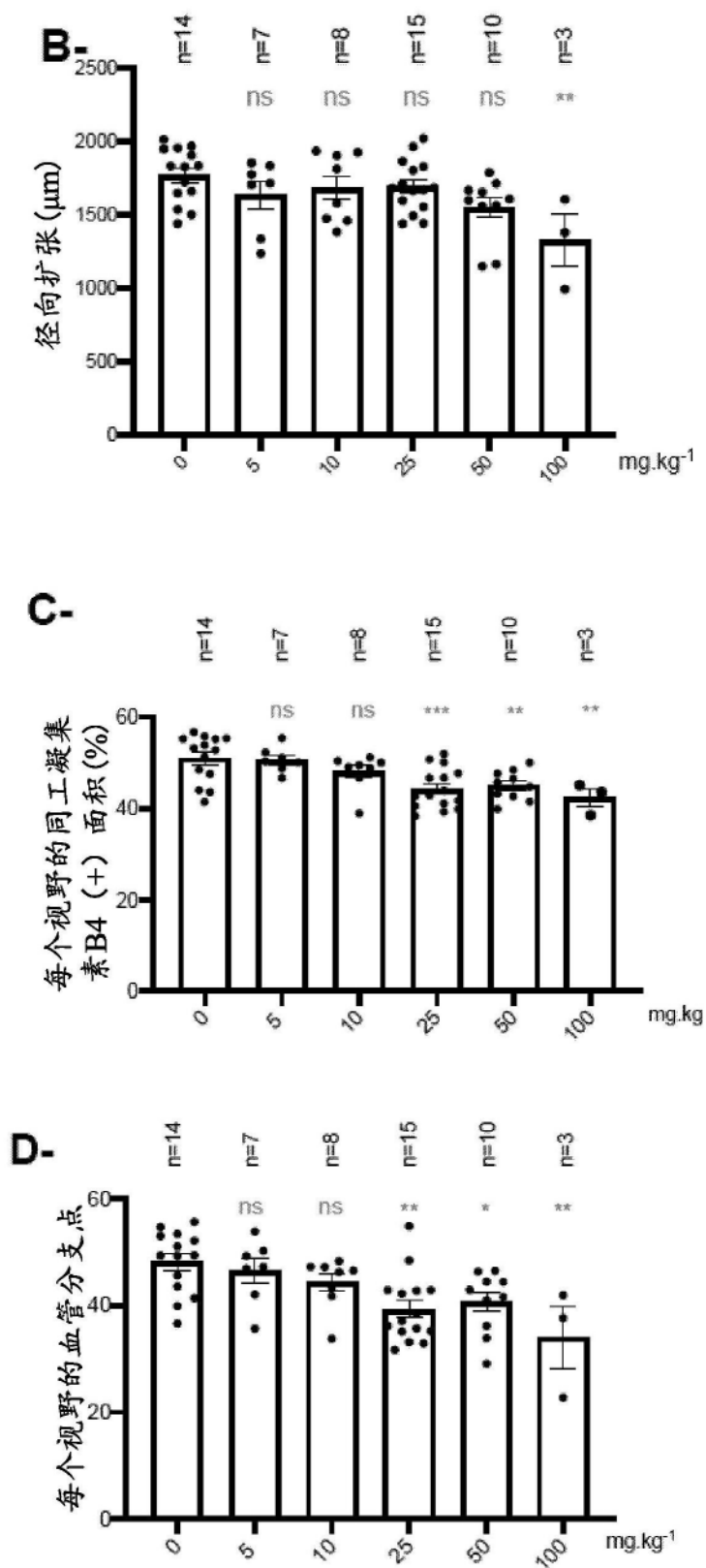


图4B-4D

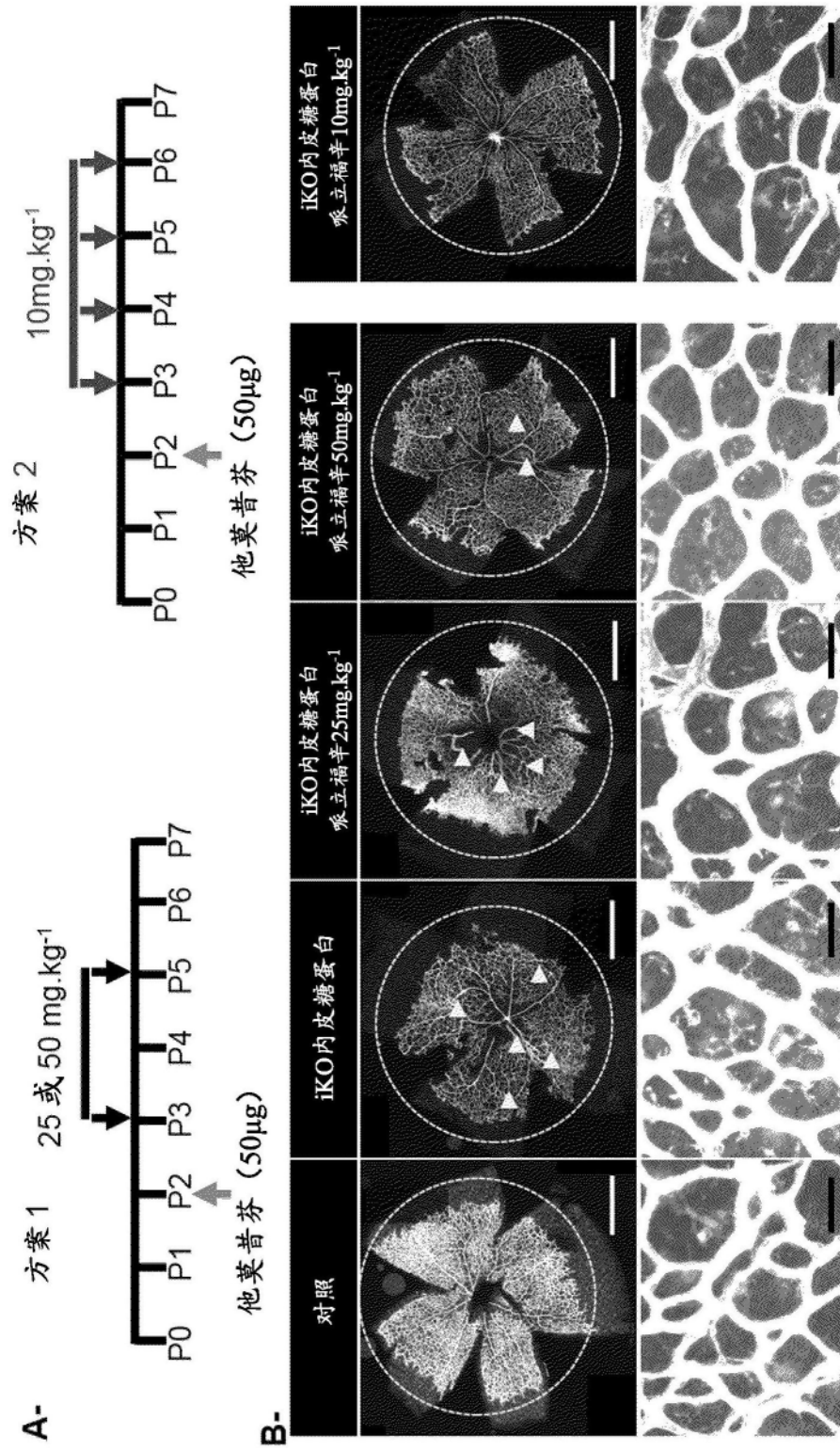


图5A-5B

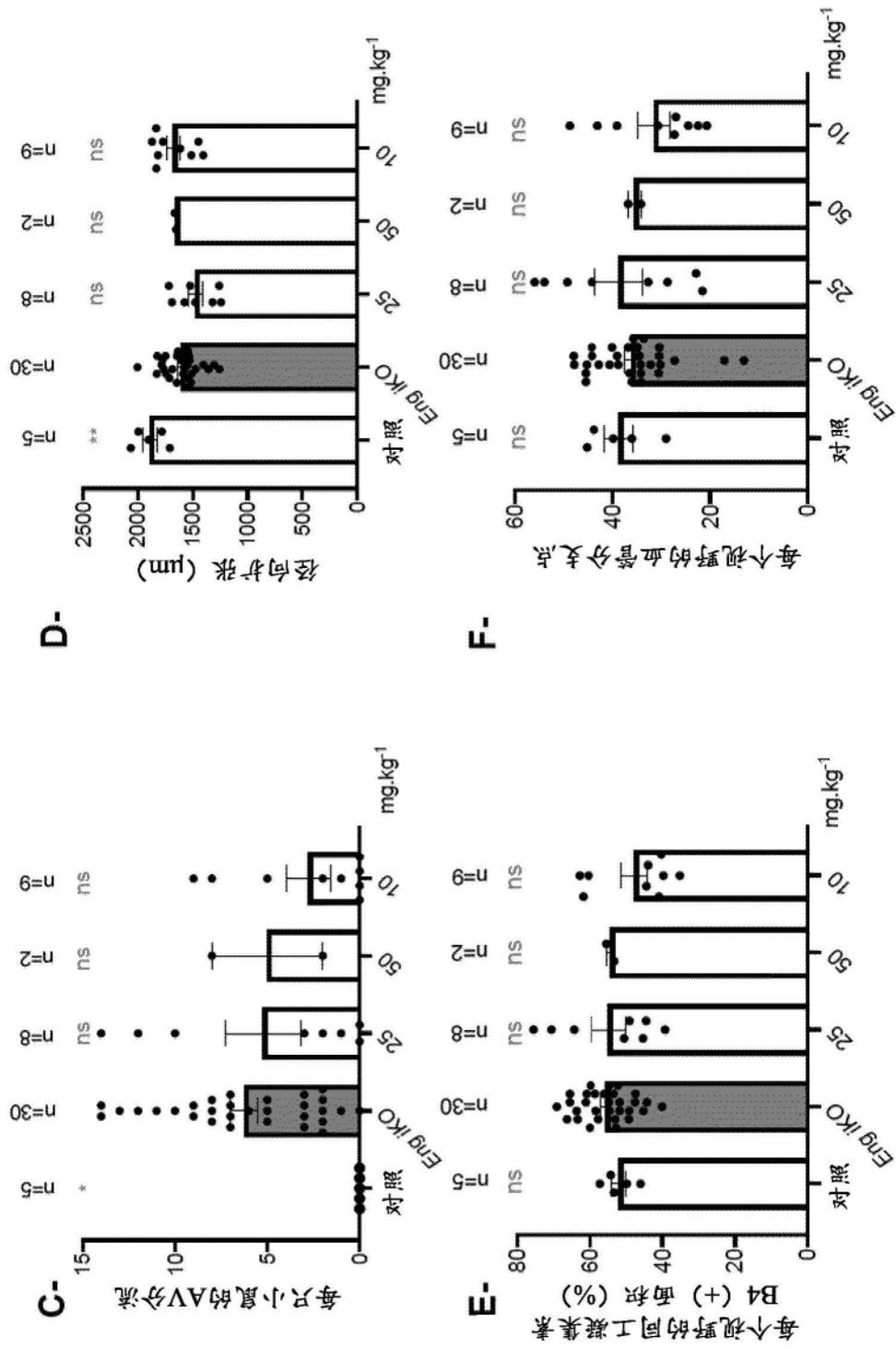
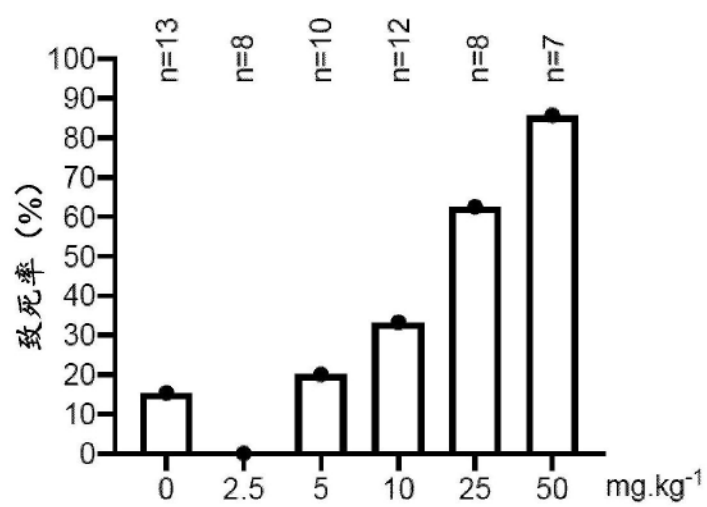


图5C-5F

A-



B-

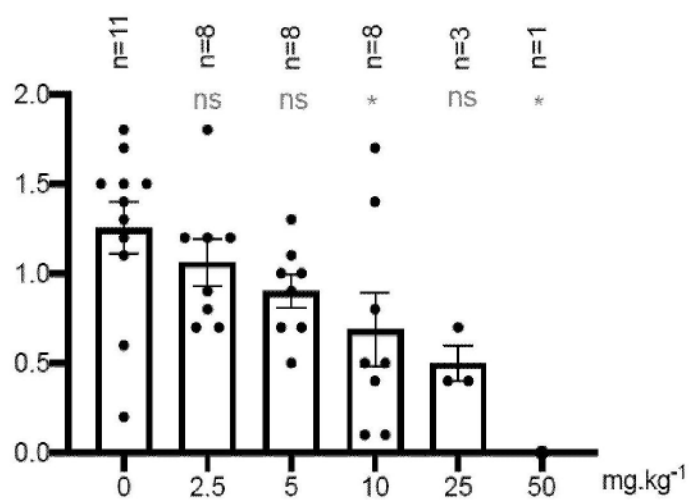


图6

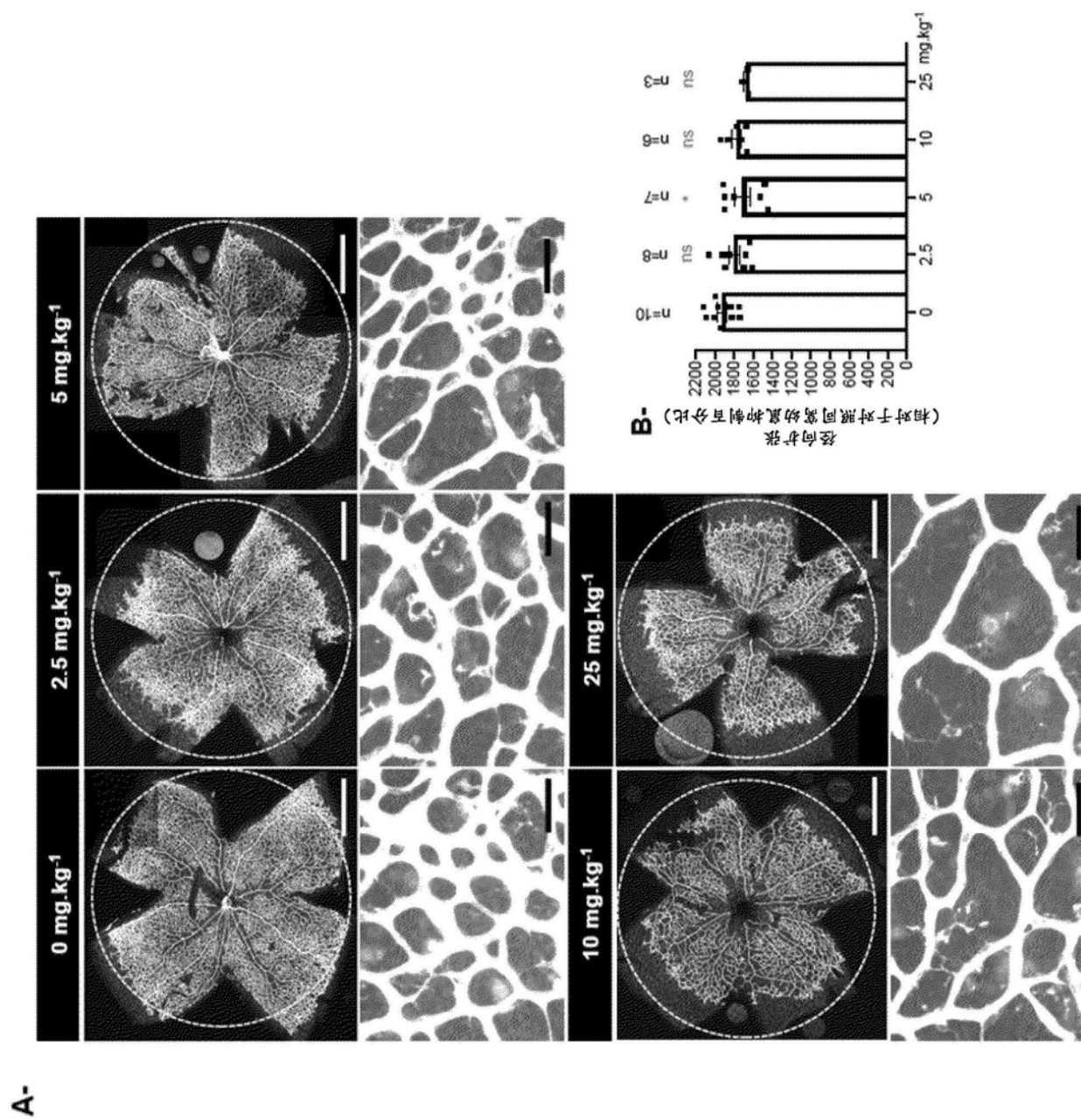


图7A-7B

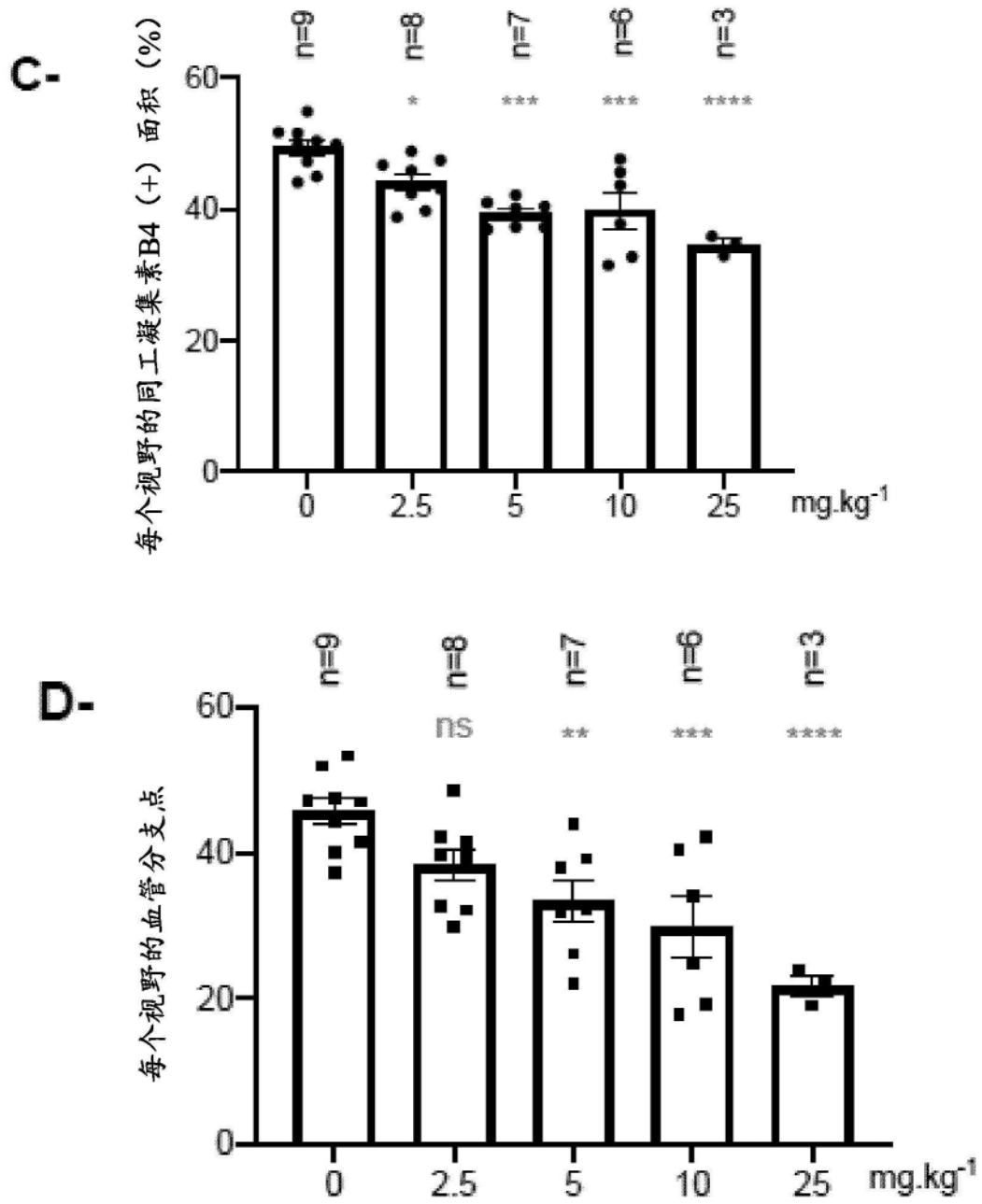


图7C-7D

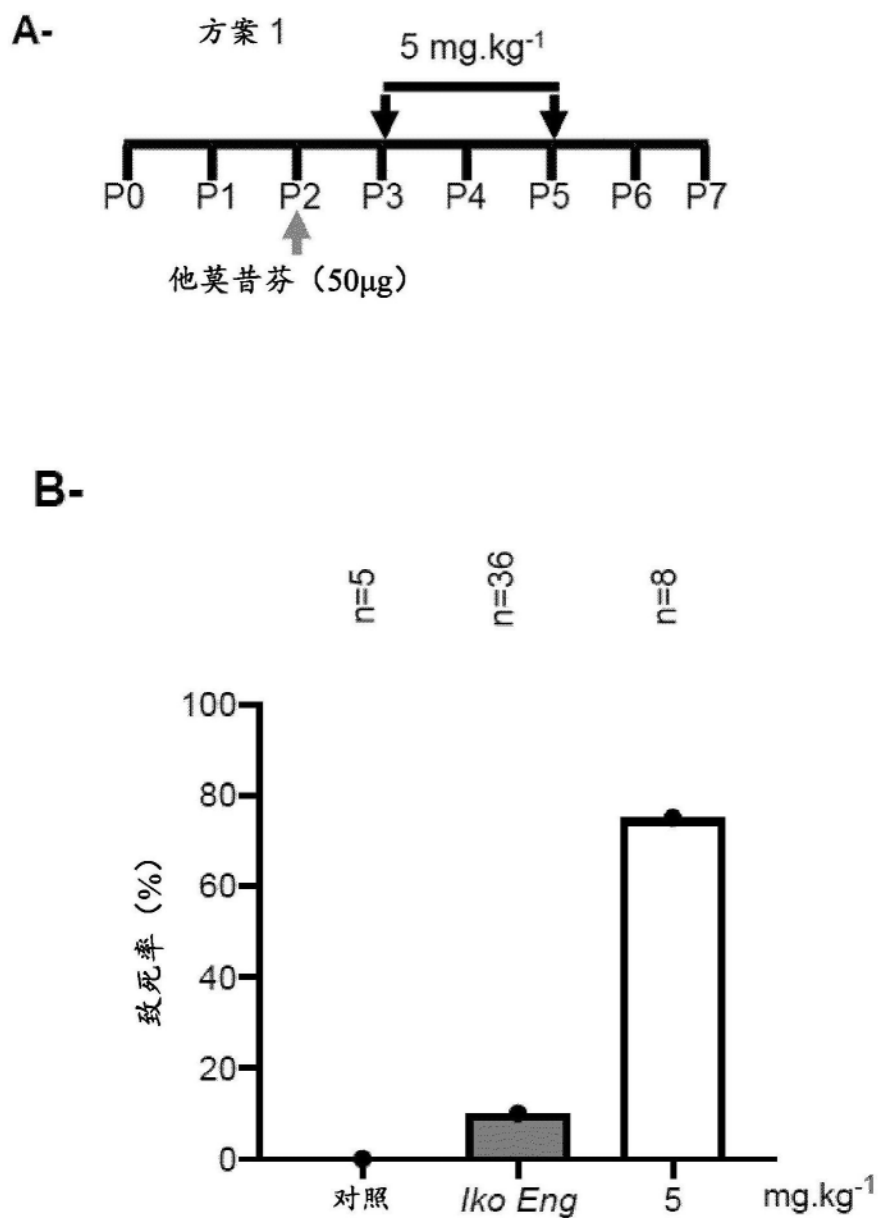


图8

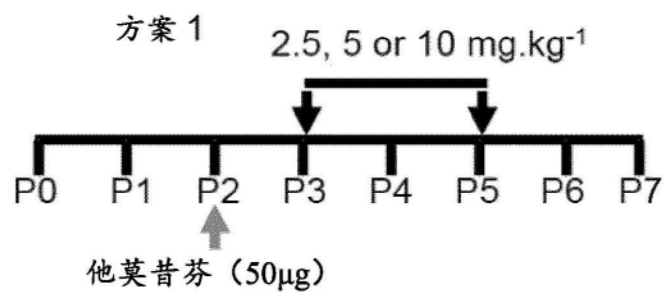
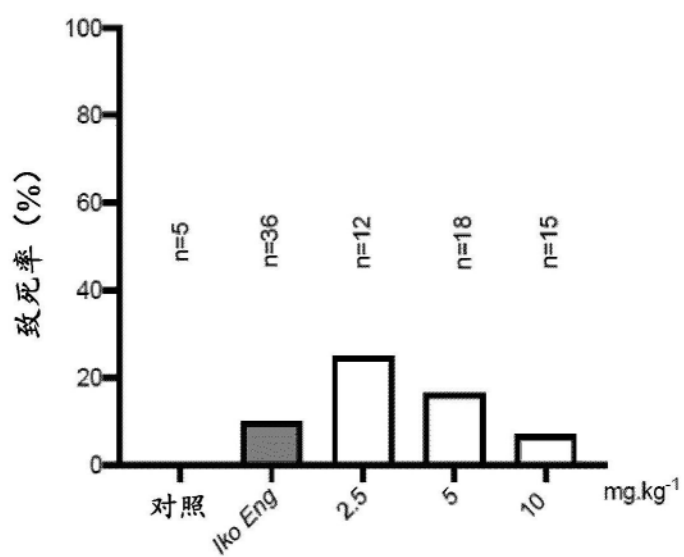
A-**B-**

图9

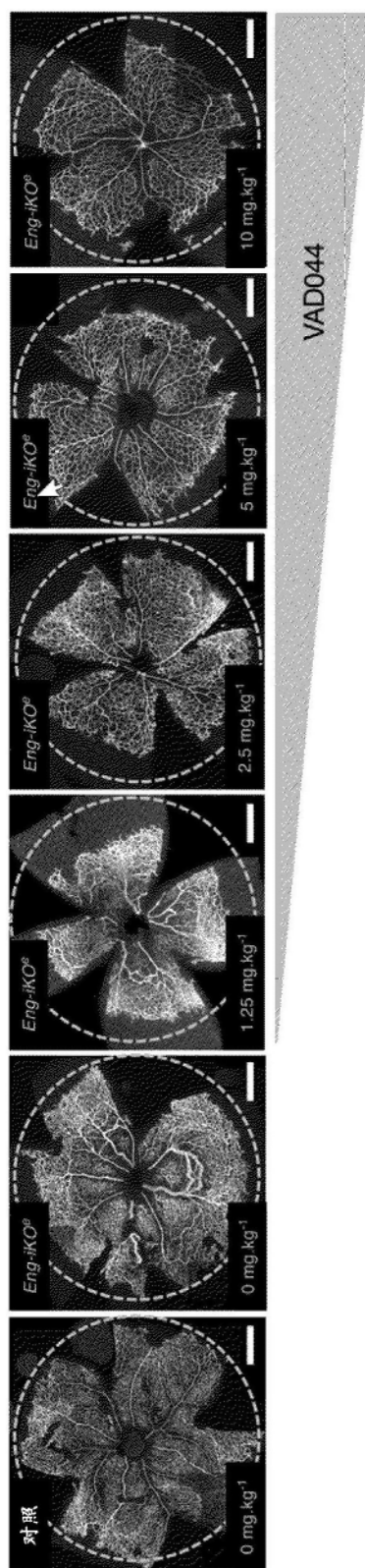


图10A

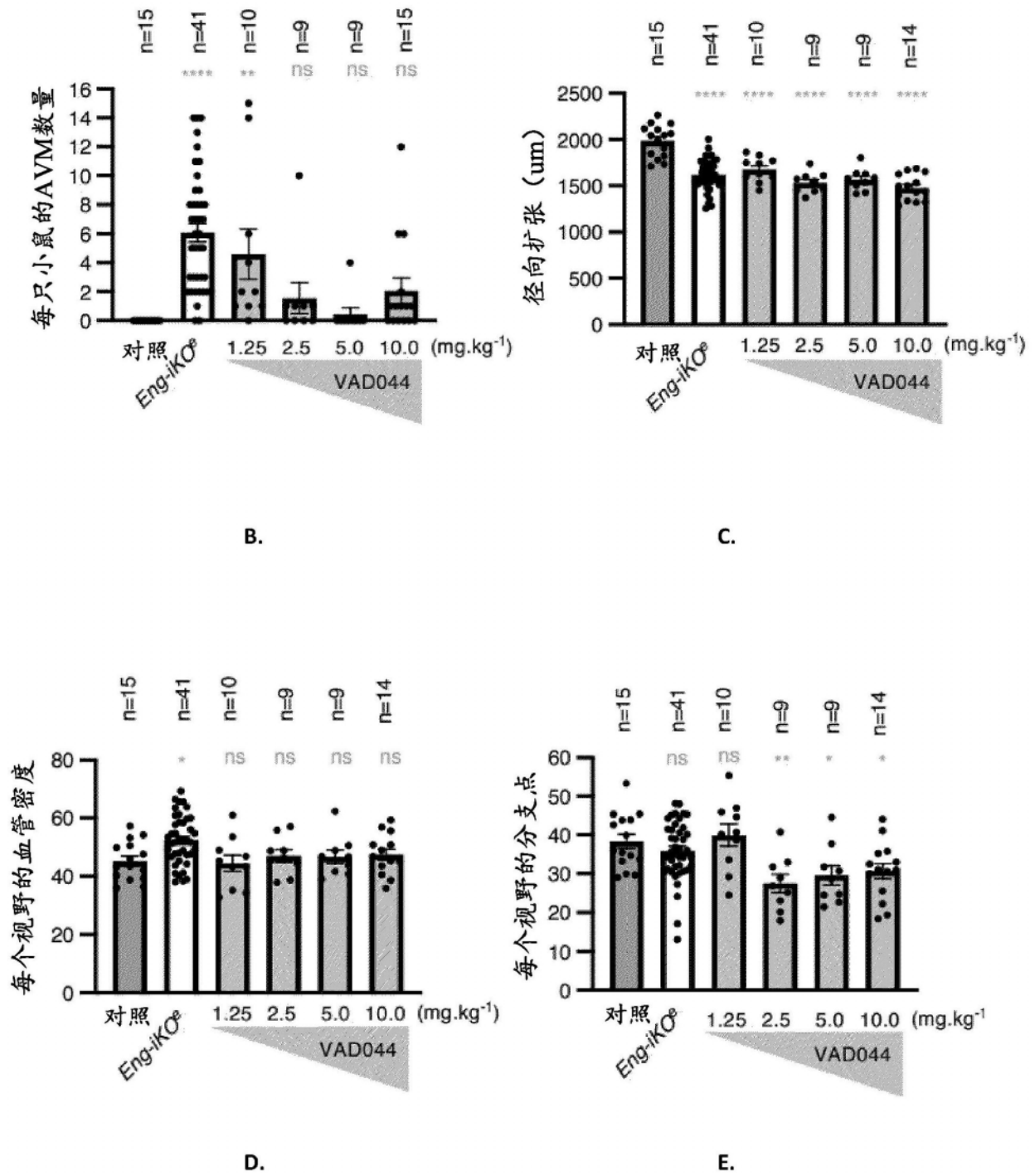


图10B-10E

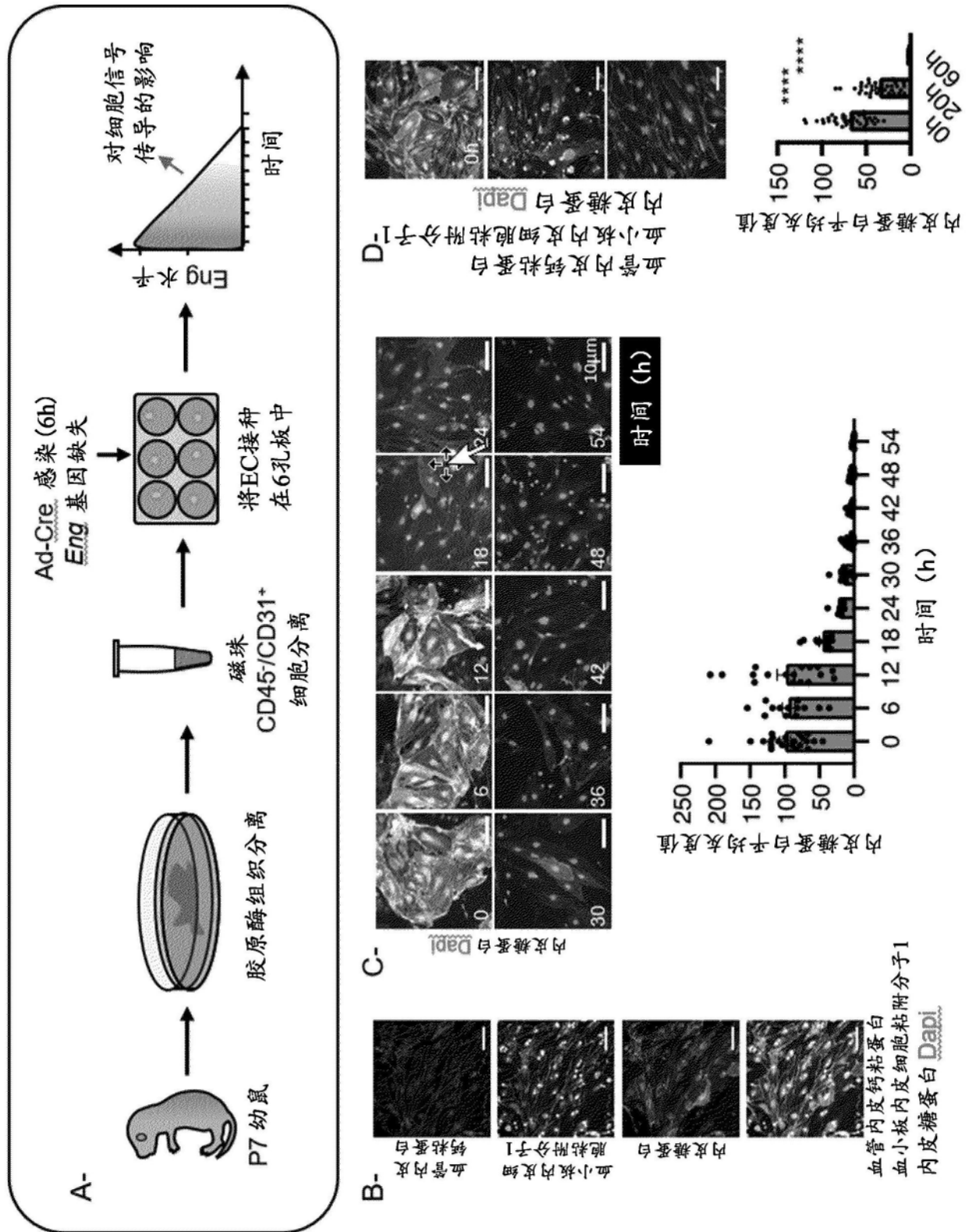


图11

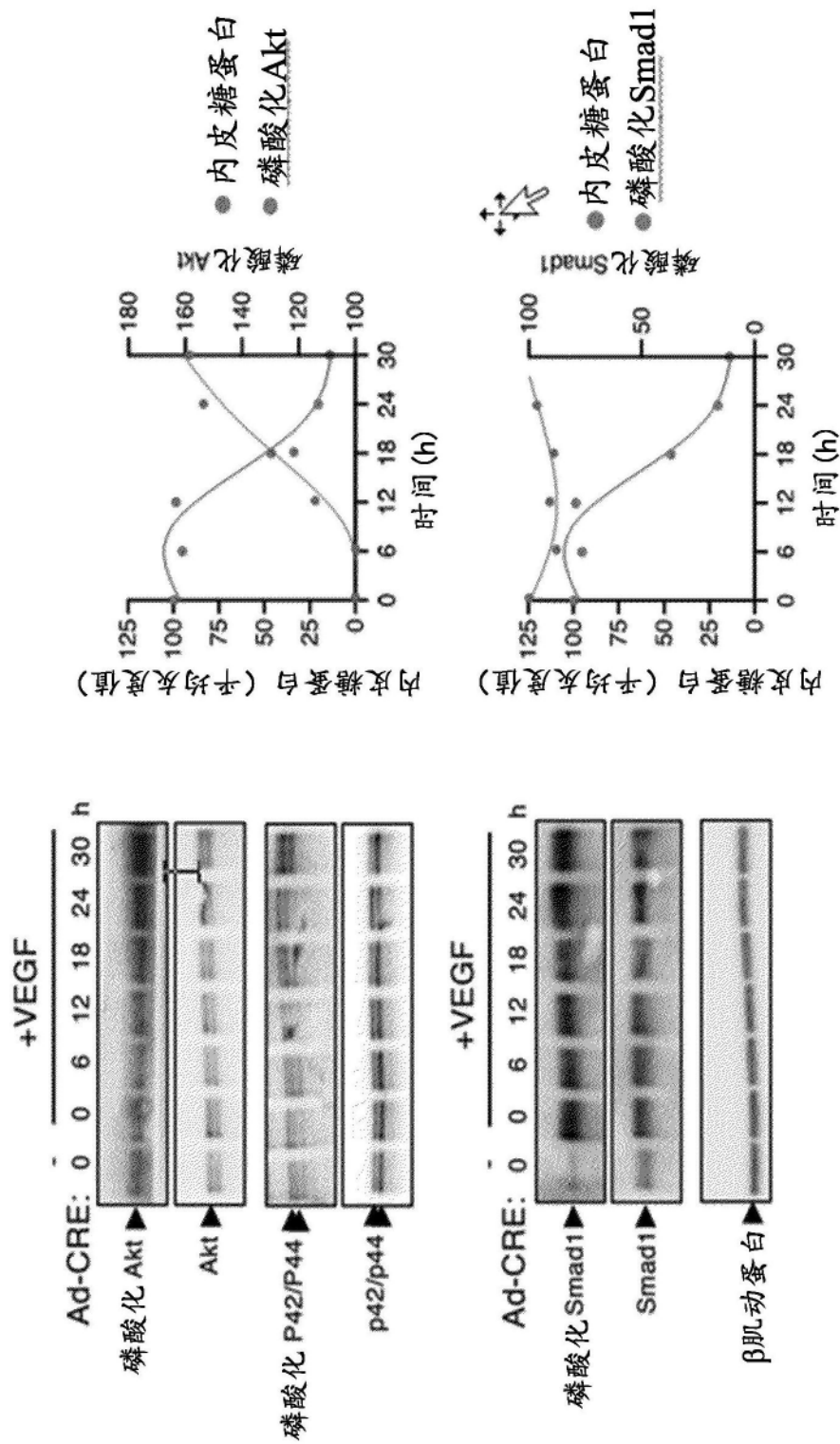


图12

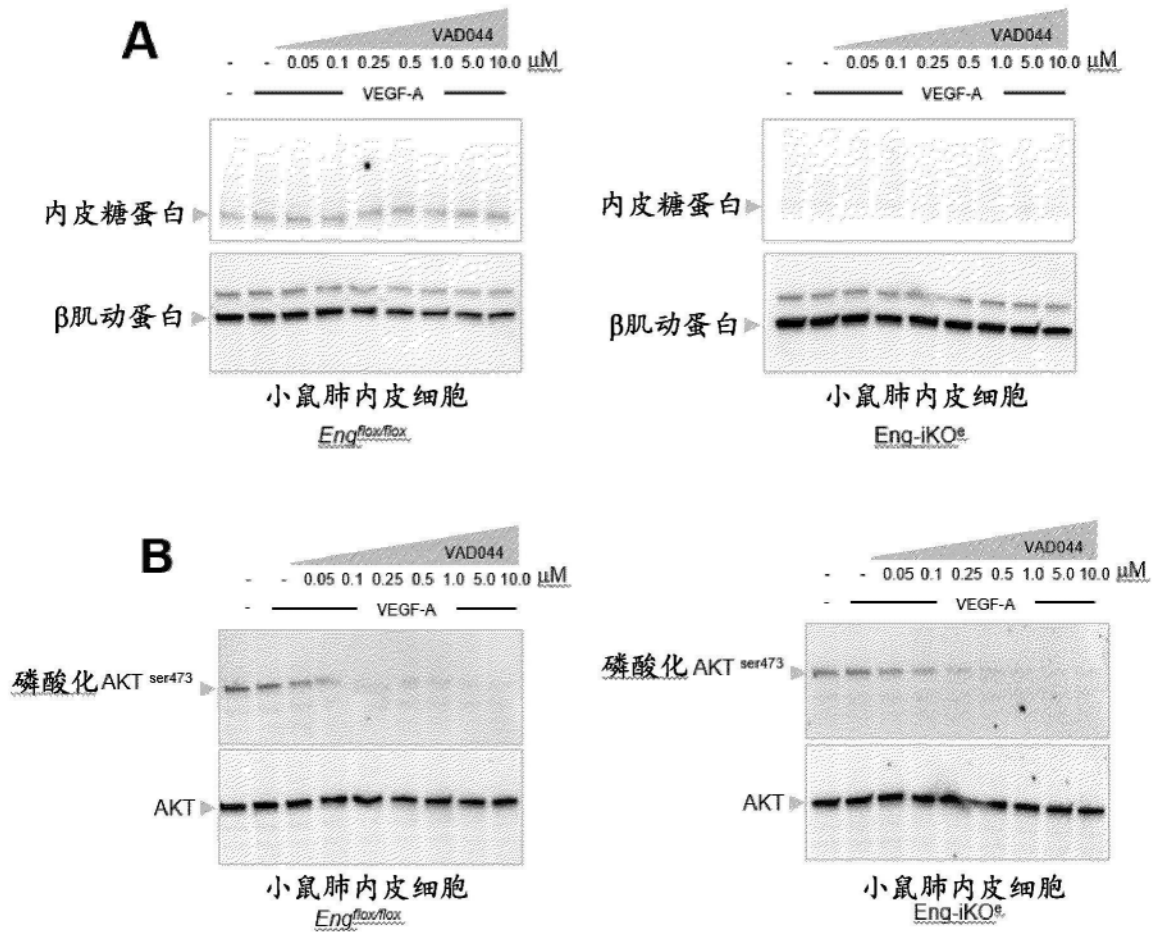


图13

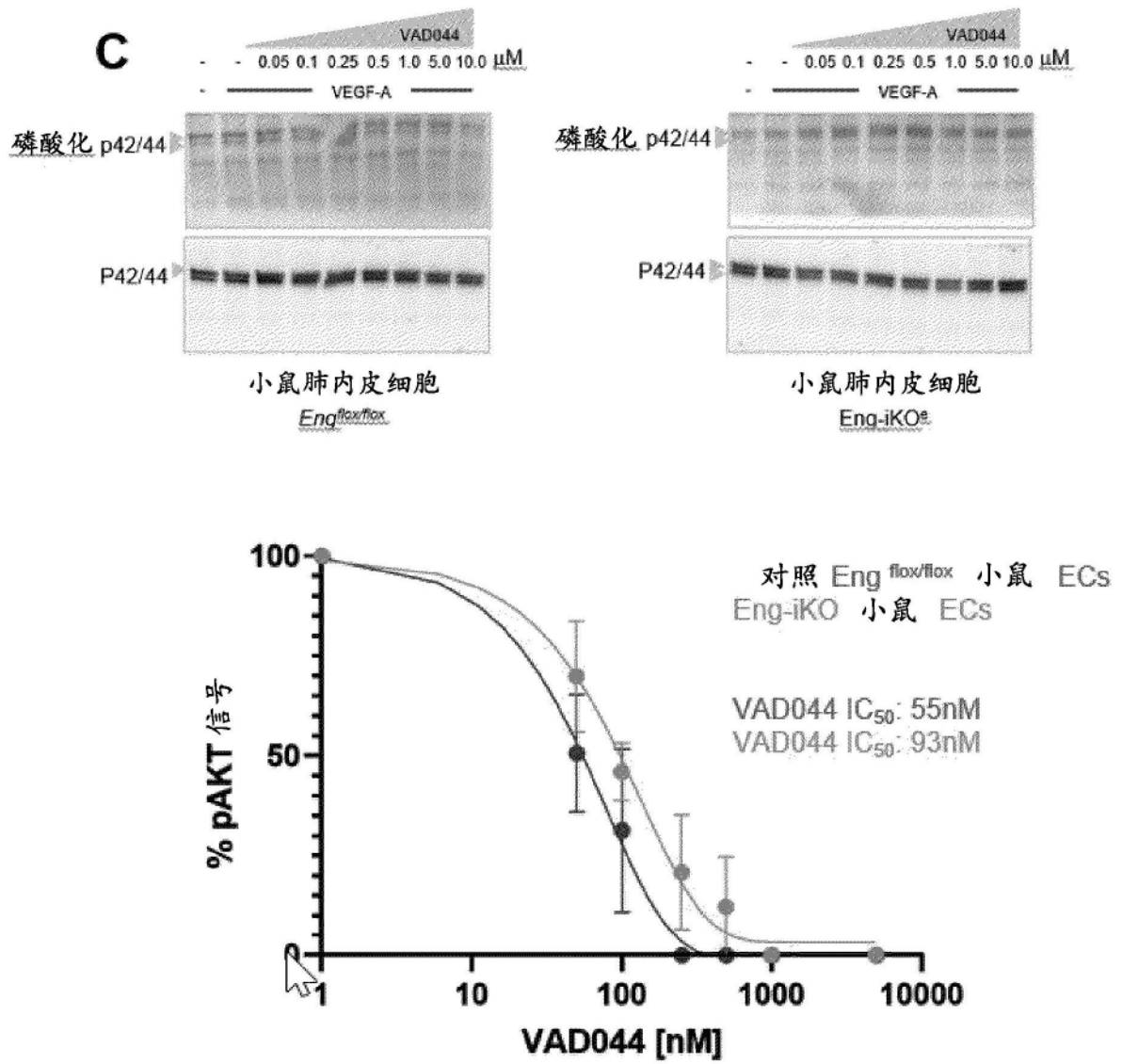


图13(续)