

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390592** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.01

(22) Дата подачи заявки
2021.09.29

(51) Int. Cl. **A61K 31/5383** (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/14 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(54) АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

(31) **2015536.2**

(32) **2020.09.30**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2021/076811**

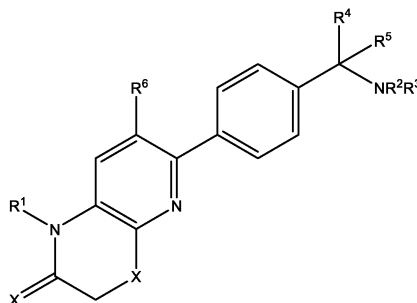
(87) **WO 2022/069552 2022.04.07**

(71) Заявитель:
ВАДЕРИС ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Пикард Дамиен, Сен-Мезар Пьерр (CH)

(74) Представитель:
**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)**

(57) В данном изобретении предложены соединения формулы (I)



или их фармацевтически приемлемые соли для применения в лечении наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ).

202390592

A1

A1

202390592

PCT/US2015/031081

МПК: *A61K 31/5383* (2006.01) *A61P 9/14* (2006.01)*A61P 9/00* (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к аллостерическим ингибиторам АКТ и к их применению в лечении наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Наследственная геморрагическая телеангиэктазия (НГТ) представляет собой доминантное генетическое заболевание, которым страдает один человек на 5000 - 8000 во всем мире. Клинические симптомы включают легочные, мозговые и печеночные артериовенозные мальформации (АВМ), представляющие собой непосредственные соединения между артериями и венами без кровеносных капилляров между ними. Без лечения АВМ могут вызывать угрожающие жизни осложнения. У пациентов с НГТ также развиваются мелкие артериовенозные мальформации в носу, во рту и желудочно-кишечном тракте, обозначаемые телеангиэктазиями. Эти хрупкие сосуды легко разрываются и кровоточат, вызывая рецидивирующую анемию после тяжелых и частых эпизодов кровотечения (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>).

В настоящее время большинство мутаций обнаружено в двух генах. НГТ1 вызывается мутациями в гене ENG (эндоглин), тогда как НГТ2 вызывается мутациями в ACVRL1 (активин-рецептороподобная киназа 1, ALK1). Оба являются рецепторами для трансформирующего фактора роста- β (TGF- β)/костного морфогенетического белка (BMP), экспрессирующегося главным образом в эндотелиальных клетках. Мутации представляют собой нулевые аллели, указывающие на то, что основной причиной НГТ является гаплонедостаточность. Как мутации в ENG или ACVRL1 (ALK1) приводят к патологическому ангиогенезу, остается малоизученным.

Установление причинных генных мутаций и создание моделей на животных показали, что за развитие сосудистых мальформаций при НГТ ответственны пониженная

сигнальная активность трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) / костного морфогенетического белка (BMP) и повышенная сигнальная активность фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в эндотелиальных клетках. Нарушения в этих ключевых путях приводят к активации эндотелиальных клеток, приводящей к отделению муральных клеток от эндотелия (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). Это начальное состояние нестабильности приводит к тому, что кровеносные сосуды некорректно реагируют на воздействие ангиогенных триггеров, что приводит к чрезмерному росту кровеносных сосудов и формированию сосудистых аномалий, предрасположенных к кровотечению.

Недавно ряд исследований на моделях на мышах и экспериментов *in vitro* выявил связь между сигнальным путем PI3K/AKT и повышенной активацией эндотелиальных клеток, наблюдаемой при НГТ. Потеря передачи сигналов ALK1 совпадает с усилением передачи сигналов PI3K/AKT, индуцированным снижением PTEN в эндотелиальных клетках (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). Это наблюдение подтверждают биопсии кожных телеангиэктазий у пациентов с НГТ1 и НГТ2, у которых повышенная пролиферация эндотелиальных клеток связана с повышением экспрессии нижележащих генов пути PI3K/AKT (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>).

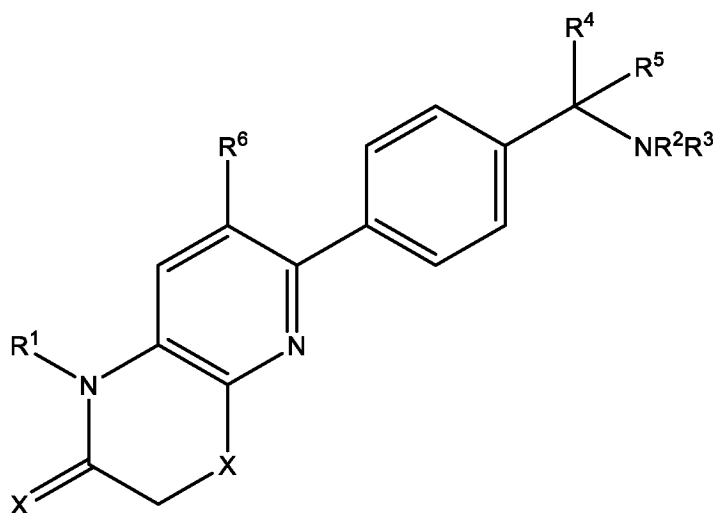
Адресное воздействие на передачу сигналов PI3K/AKT/mTOR может обеспечить терапевтическую стратегию для лечения патологического ангиогенеза, наблюдаемого при НГТ. Однако, безопасные и эффективные терапевтические средства пока неизвестны. Например, вортманин, широко используемый ингибитор пан-PI3K, способен ингибировать образование АВМ в сетчатке мышей в модели с индуцированным нокаутом (iKO) ALK1 или SMAD4 (Ola et al., (2016), (2018), выше) но не в модели с индуцированным нокаутом эндоглина (Eng-iKO) (Jin et al., (2017), выше). Аналогично, сиролimus, типичный ингибитор mTOR, не способен блокировать образование АВМ в модели Eng-iKO (Ruiz et al., (2019),

"Sirolimus plus nintedanib treats vascular pathology in HNT mouse models", BioRxiv Cell Biology. <https://doi.org/10.1101/739144>).

Следовательно, существует потребность в средствах для лечения НГТ, которые были бы эффективны и имели бы приемлемый профиль безопасности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретения предложено соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ) у субъекта, где:

каждый X независимо представляет собой O или S;

R¹ выбран из водорода и C₁-C₁₀ алкила, где каждый C₁-C₁₀ алкил, возможно, замещен одним или более заместителями, выбранными из галогена, -CN, -OR⁷ или 3-6-членного циклоалкила;

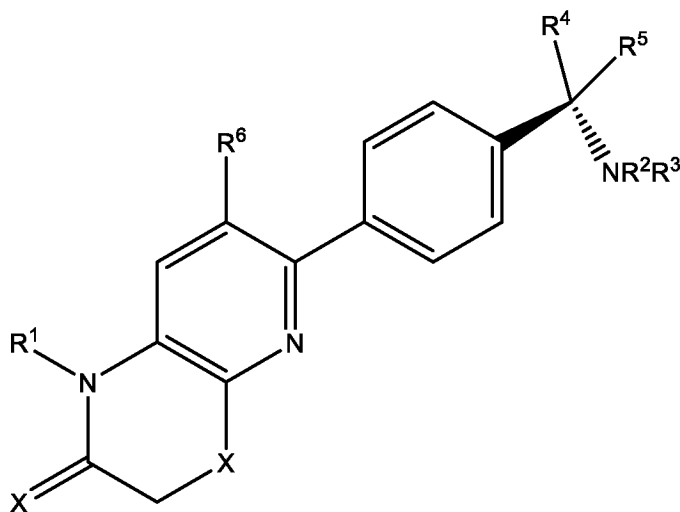
каждый из R² и R³ независимо выбран из водорода и C₁-C₁₀ алкила; или R² и R³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо;

каждый из R⁴ и R⁵ независимо выбран из C₁-C₆ алкила, C₂-C₆ алкенила или C₂-C₆ алкинила; или R⁴ и R⁵ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C₁-C₁₀ алкила, -CN, -OR⁷, галогена, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ и -NR⁷₂;

R⁶ представляет собой 5-7-членное арильное или гетероарильное кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C₁-C₁₀ алкила, -CN, -OR⁷, галогена, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ и -NR⁷₂; и

каждый R⁷ независимо выбран из водорода и C₁-C₁₀ алкила.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) имеет структуру:



В некоторых воплощениях R^6 представляет собой фенил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В других воплощениях R_6 представляет собой незамещенный фенил.

В некоторых воплощениях R^6 представляет собой 5-7-членное гетероарильное кольцо, замещенное одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В других воплощениях R_6 представляет собой незамещенное 5-7-членное гетероарильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо представляет собой 6-членное гетероарильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом азота. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом кислорода. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом серы. Например, гетероарильное кольцо может представлять собой пиридин, пиран, тиопиран, пиррол, фуран или тиофен.

В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное незамещенное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо. В других воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членный незамещенное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. Например, циклоалкильное кольцо может представлять собой циклопропильное кольцо,

циклобутильное кольцо, цикlopентильное кольцо или циклогексильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом азота. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом кислорода. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом серы. Например, гетероциклическое кольцо может представлять собой пиперидин, тетрагидропиран, тиан, пирролидин, тетрагидрофуран или тетрагидротиофен.

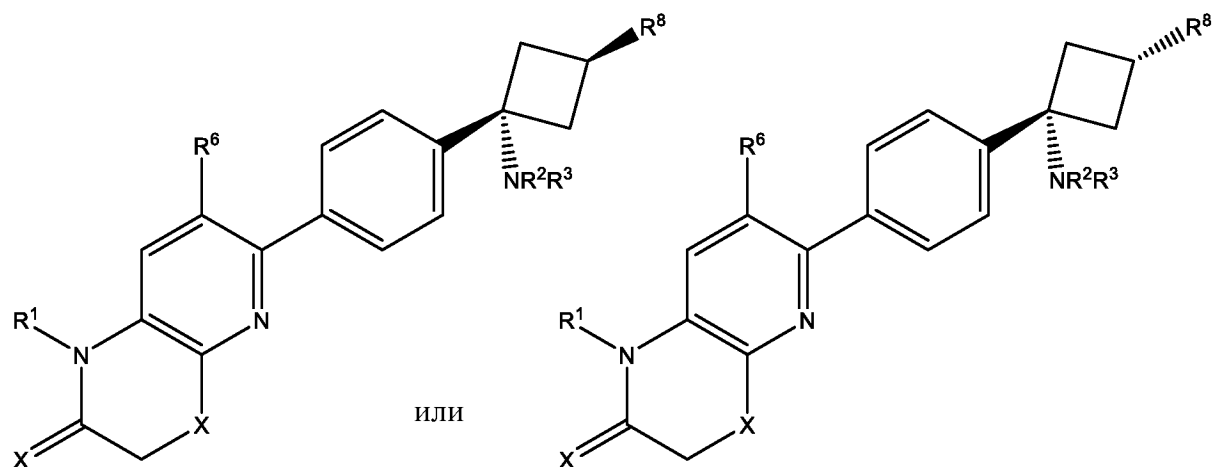
В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют незамещенное циклопропильное, циклобутильное, цикlopентильное или циклогексильное кольцо. В других воплощениях циклопропильное, циклобутильное, цикlopентильное или циклогексильное кольцо замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют незамещенное циклобутильное кольцо. В других воплощениях циклобутильное кольцо замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена.

В некоторых воплощениях каждый X представляет собой O .

В некоторых воплощениях R^1 представляет собой незамещенный C_1 - C_{10} алкил, незамещенный C_1 - C_6 алкил или незамещенный C_1 - C_4 алкил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил, этил, пропил, бутил, пентил или гексил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил, этил, *n*-пропил, изо-пропил, *n*-бутил, изо-бутил или трет-бутил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил или этил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой C_1 - C_{10} алкил, C_1 - C_6 алкил или C_1 - C_4 алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из галогена, $-CN$, $-OH$ или 3-6-членного циклоалкила. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой $-(CH_2)_nCN$, где n принимает значения 1, 2, 3, 4 или 5.

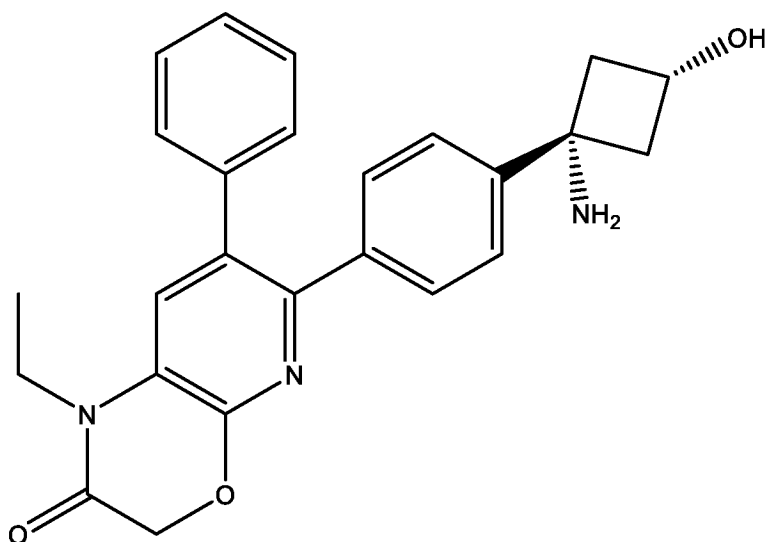
В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода и C_1 - C_{10} алкила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода и C_1 - C_6 алкила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода, метила и этила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 представляет собой водород.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^8 выбран из $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, галогена и $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль, мезилатную соль или фосфатную соль. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль. В некоторых таких воплощениях тартратная соль представляет собой L-тартратную соль.

В некоторых воплощениях соединение приготовлено в виде композиции для перорального введения субъекту.

В некоторых воплощениях субъектом является человек. В некоторых воплощениях субъектом является взрослый человек. В некоторых таких воплощениях соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 20 до 75 мг ежедневно. В других таких воплощениях соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 10 до 50 мг ежедневно, от 20 до 40 мг ежедневно или от 20 до 30 мг ежедневно.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение частоты, продолжительности или интенсивности кровотечения, связанного с НГТ. В некоторых таких воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение. В некоторых воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой носовое кровотечение.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает повышение уровней гемоглобина у субъекта.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение размера телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой кожные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой назальные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой телеангиэктазии полости рта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой желудочно-кишечные телеангиэктазии.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества и размера артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение образования АВМ у субъекта. В некоторых таких воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой легочные АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой церебральные (мозговые) АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой висцеральные АВМ.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение степени шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ у субъекта.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение потребности в железосодержащих добавках у субъекта, например, уменьшение количества введений железа путем инфузии, необходимых субъекту. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества переливаний крови, необходимых субъекту.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение печеночного кровотока.

В некоторых воплощениях лечение НГТ уменьшает необходимость трансплантации печени субъекту.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение частоты и/или тяжести дополнительных симптомов НГТ. Такие дополнительные симптомы могут включать одышку, мигрень, усталость, неврологические события и эмболические события.

В данном изобретении также предложено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в любом из указанных выше воплощений, в изготовлении лекарственного средства для лечения наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ).

В данном воплощении также предложен способ лечения наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в любом из указанных выше воплощений.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению частоты, продолжительности или интенсивности кровотечения, связанного с НГТ. В некоторых таких воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение. В некоторых воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой носовое кровотечение.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ включает повышение уровней гемоглобина у субъекта.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению размера телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой кожные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой назальные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой телеангиэктазии полости рта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой желудочно-кишечные телеангиэктазии.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению размера артериовенозных мальформаций (АВМ) у

субъекта. В некоторых воплощениях способ предупреждает образование АВМ у субъекта. В некоторых таких воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой легочные АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой мозговые АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой висцеральные АВМ.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ включает улучшение качества жизни субъекта.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к предупреждению сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ предупреждает у субъекта шунтирование справа налево, вызванный легочной АВМ. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению степени шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ у субъекта.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению потребности субъекта в железосодержащих добавках, например, уменьшению количества введений железа путем инфузии, необходимых субъекту. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества переливаний крови, необходимых субъекту.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению печеночного кровотока.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ уменьшает необходимость трансплантации печени субъекту.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению частоты и/или тяжести дополнительных симптомов НГТ. Такие дополнительные симптомы могут включать одышку, мигрень, усталость, неврологические события и эмболические события.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к общему улучшению качества жизни субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А показана общая структура соединения 6 в комплексе с АКТ2. На Фиг. 1В показана структура комплекса с увеличенным изображением аллостерического кармана и демонстрацией аминокислотных взаимодействий. На Фиг. 1С представлено схематическое изображение аминокислотных взаимодействий.

На Фиг. 1D показана структура свободного основания VAD044 в комплексе с АКТ2 (с увеличенным изображением аллостерического кармана и демонстрацией аминокислотных взаимодействий). На Фиг. 1E представлено схематическое изображение аминокислотных взаимодействий.

На Фиг. 2A представлена древовидная диаграмма, демонстрирующая относительную гомологию последовательностей различных киназ (где киназы, которые находятся на той же самой ветви и расположены вблизи друг друга, имеют высокий уровень гомологии последовательностей; тогда как расположенные на разных ветвях имеют последовательности, сильно различающиеся по гомологии). Как показано на Фиг. 2A, АКТ1, АКТ2 и АКТ3 имеют очень высокий уровень гомологии последовательностей. PDK1 располагается на той же самой основной ветви (обозначена «AGC»), как и АКТ1/2/3, что указывает на относительно высокий уровень гомологии последовательностей с АКТ1/2/3; тогда как p38α находится на совсем другой основной ветви (обозначенной «CMGC»), что указывает на низкий уровень гомологии последовательностей между АКТ1/2/3 и p38α. На Фиг. 2B показан % ингибирования указанных пяти киназ (АКТ1, АКТ2, АКТ3, PDK1 и p38α), достигающийся под воздействием VAD044 (6-(4-(1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-она L-тартрата).

На Фиг. 3 показана безопасность и потенциальная токсичность перифосина. На Фиг. 3(A) показана летальность детенышей, а на Фиг. 3(B) показана разница в массе тела животных между 4 днем после рождения (P4) и P7. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего (S.E.M.) **** $p < 0,0001$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой, получавшей инъекцию только носителя, с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

На Фиг. 4 показано, что перифосин обладает слабыми антиангиогенными свойствами у мышей. На Фиг. 4(A) показаны эндотелиальные клетки сосудов сетчатки, окрашенные изолектином B4, у мышей дикого типа на P7 после внутрибрюшинной инъекции носителя в отдельности или с 5, 10, 25, 50 или 100 мг/кг перифосина на P4. Внизу приведены изображения сосудистой сети с большим увеличением. На Фиг. 4(B) показана количественная оценка радиального разрастания, на Фиг. 2(C) показана площадь поверхности, положительной по изолектину-B4, а на Фиг. 4(D) показано количество точек ветвления на поле зрения. Планки погрешностей представляют S.E.M. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой,

получавшей инъекцию только носителя, с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

На Фиг. 5 показана эффективность перифосина в предотвращении образования АВМ у мышей в модели с Eng-iKO. Фиг. 5(A) иллюстрирует схему инъекций перифосина. На Фиг. 5(B) показаны конфокальные изображения, демонстрирующие влияние перифосина на сетчатки Eng-iKO, окрашенные изолектином-B4 для выявления эндотелиальных клеток. Внизу приведены изображения сосудистой сети с большим увеличением. На Фиг. 5(C) показано количество АВ шунтов на мыш. На Фиг. 5(D) показана количественная оценка радиального разрастания, на Фиг. 5(E) показана площадь с положительным окрашиванием изолектином-B4, а на Фиг. 5(F) показано количество точек ветвления на поле зрения. Планки погрешностей представляют S.E.M. * $p < 0,05$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой Eng-iKO с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

На Фиг. 6 показана безопасность и потенциальная токсичность упросертиба. На Фиг. 6(A) показана летальность детенышей, а на Фиг. 6(B) показана разница в массе тела животных между 4 днем после рождения (P4) и P7. Планки погрешностей представляют S.E.M. * $p < 0,05$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой, получавшей только инъекции носителя, с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

На Фиг. 7 показаны антиангиогенные свойства упросертиба у мышей. На Фиг. 7(A) показаны эндотелиальные клетки сосудов сетчатки, окрашенные изолектином B4, у мышей дикого типа на P7 после внутрибрюшинной инъекции носителя в отдельности или с 2,5, 5, 10, 25 мг/кг перифосина на P4. Внизу приведены изображения сосудистой сети с большим увеличением. На Фиг. 7(B) показана количественная оценка радиального разрастания, на Фиг. 7(C) показана площадь поверхности с положительным окрашиванием изолектином-B4, а на Фиг. 7(D) показано количество точек ветвления на поле зрения. Планки погрешностей представляют S.E.M. * $p < 0,0$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой, получавшей только носитель, с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

Фиг. 8(A) иллюстрирует схему инъекций упросертиба, а на Фиг. 8(B) показана летальность детенышей. Животным EngFlox/flox; cdh5-CreERT2 осуществляли инъекции

тамоксифена (50 мкг) на P2 для индукции почти полного нокаута генов у новорожденных мышей с последующей внутрибрюшинной инъекцией 0 или 5 мг/кг массы тела упротертиба однократно на P3 и P5. Животным, служащим контролем, осуществляли инъекции носителя в том же объеме.

Фиг. 9(A) иллюстрирует схемы инъекций VAD044, а на Фиг. 9(B) показана летальность детенышей. Животным EngFlox/flox; cdh5-CreERT2 осуществляли инъекции тамоксифена (50 мкг) на P2 для индукции почти полного нокаута генов у новорожденных мышей с последующей внутрибрюшинной инъекцией 0, 2,5, 5 или 10 мг/кг массы тела VAD044 однократно на P3 и P5. Животным, служащим контролем, осуществляли инъекции носителя в том же объеме. Затем мышей подвергали эвтаназии на P7 и обрабатывали сетчатки для иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано (Lebrin et al., 2010).

На Фиг. 10 показана эффективность VAD044 в предотвращении образования АВМ у мышей в модели с Eng-iKO. На Фиг. 10(A) показаны конфокальные изображения, демонстрирующие влияние VAD044 на сетчатки Eng-iKO, окрашенные изолектином-B4 для выявления эндотелиальных клеток. На Фиг. 10(B) показано количество АВ шунтов на мыш. На Фиг. 10(C) показана количественная оценка радиального разрастания, на Фиг. 10(D) показана площадь с положительным окрашиванием изолектином-B4, а на Фиг. 10(E) показано количество точек ветвления на поле зрения. Планки погрешностей представляют S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ результаты сравнения средних значений каждой группы с контрольной группой Eng-iKO с применением однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Даннета «нд» = отсутствие значимости.

На Фиг. 11 показан способ выделения и характеристики первичных эндотелиальных клеток мыши из легких мышей Eng-iKO и инфицирование аденовирусом с рекомбиназой Cre для индукции делеции гена Eng (и последующей делеции белка Eng) в клетках.

На Фиг. 12 показана передача сигнала АКТ и SMAD в нормальных эндотелиальных клетках и эндотелиальных клетках (ЭК) с делецией Eng.

На Фиг. 13А показано влияние аденовирусной инфекции на экспрессию эндоглина в нормальных ЭК и с нокаутом эндоглина (Eng-iKO). На Фиг. 13В показаны значения IC50 VAD044 в эндотелиальных клетках легких мышей с нормальным уровнем экспрессии Eng и в эндотелиальных клетках легких мышей, демонстрирующих полную утрату экспрессии Eng. На Фиг. 13С показано фосфорилирование p42/p44, которое анализировали в качестве контроля селективности.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как обсуждалось выше, адресное воздействие на сигнальный путь Pi3K/AKT/mTOR может обеспечить терапевтическую стратегию для лечения НГТ. Однако, безопасные и эффективные терапевтические средства пока неизвестны.

АКТ представляет собой серин/треониновую протеинкиназу, имеющую три изоформы: АКТ1, АКТ2 и АКТ3. АКТ1 выполняет незаменимую функцию в эндотелиальных клетках, регулируя важные нижележащие эффекторы (например, eNOS, Ang2 и FOXOs), благоприятствующие нескольким аспектам передачи ангиогенных сигналов, таким как увеличение прорастания и ремоделирование сосудов (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>). Несколько исследований показали, что устойчивая активация эндотелиальной АКТ вызывает увеличение размеров кровеносных сосудов и генерализованный отек вследствие хронической проницаемости сосудов (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>). Аналогично, неконтролируемая активация АКТ1 в эндотелиальных клетках индуцирует сосудистую мальформацию *in vivo* (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>). Таким образом, АКТ может быть ключевой молекулярной мишенью для контроля патологического ангиогенеза и сосудистой мальформации, наблюдающейся при НГТ.

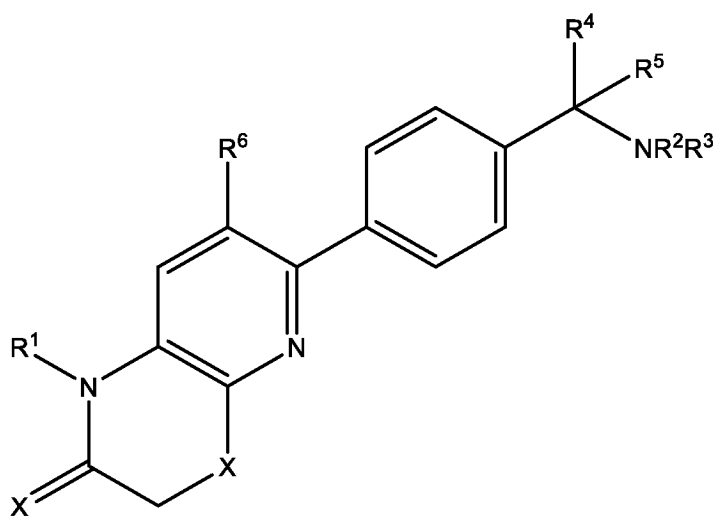
Авторы данного изобретения исследовали различные типы ингибиторов АКТ и оценивали профили их токсичности, их влияние на нормальный ангиогенез и их способность предупреждать развитие сосудистых мальформаций на модели НГТ у мышей. Результаты подробно обсуждаются в Примерах, приведенных ниже.

Подводя итоги вышесказанному, авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что конкретный аллостерический ингибитор АКТ, имеющий формулу (I), приведенную ниже, был способен предупреждать развитие сосудистых мальформаций на модели НГТ 1 типа (НГТ1) у мышей Eng-iKO. Как более подробно обсуждается в Примерах ниже, получали профили безопасности/токсичности данного соединения (и два других ингибитора АКТ) и определяли минимальные эффективные дозы каждого соединения для ингибирования ангиогенеза у мышей *C57BL/6J* дикого типа на 7 день после рождения (P7) с применением модели ангиогенеза сетчатки новорожденных. Также, для каждого

соединения определяли минимальную эффективную дозу каждого соединения для предупреждения развития артериовенозных мальформаций (ABM) у мышей *Eng-iKO*.

Авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что аллостерические ингибиторы АКТ формулы (I) способны лечить и/или предупреждать сосудистые мальформации, связанные с НГТ, в неожиданно низких дозах (приблизительно в 10 раз ниже, чем дозы, обычно применяющиеся в онкологии), при этом демонстрируя приемлемый профиль токсичности.

Таким образом, в первом аспекте данного изобретения предложено соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении НГТ у субъекта, где:

каждый X независимо представляет собой О или S;

R^1 выбран из водорода и C_1 - C_{10} алкила, где каждый C_1 - C_{10} алкил, возможно, замещен одним или более заместителями, выбранными из галогена, $-CN$, $-OR^7$ или 3-6-членного циклоалкила;

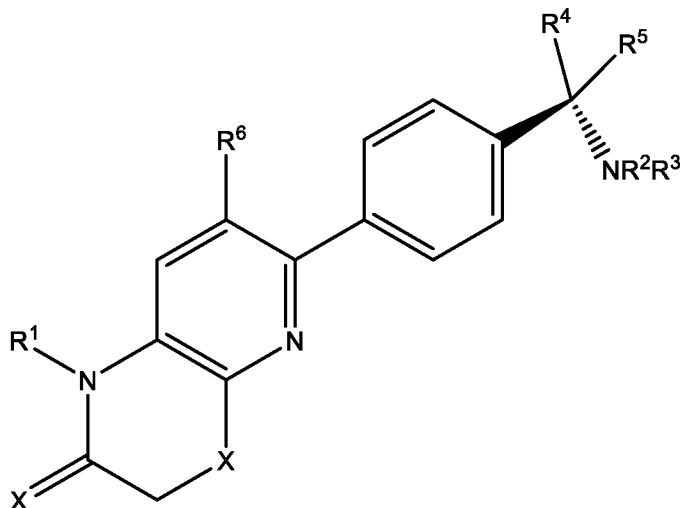
каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода и C_1 - C_{10} алкила; или R^2 и R^3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо;

каждый из R^4 и R^5 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила, C_2 - C_6 алкенила или C_2 - C_6 алкинила; или R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$;

R^6 представляет собой 5-7-членное арильное или гетероарильное кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$; и

каждый R^7 независимо выбран из водорода и C_1 - C_{10} алкила.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) имеет структуру:



В некоторых воплощениях R^6 представляет собой фенил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В других воплощениях R_6 представляет собой незамещенный фенил.

В некоторых воплощениях R^6 представляет собой 5-7-членное гетероарильное кольцо, замещенное одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В других воплощениях R_6 представляет собой незамещенное 5-7-членное гетероарильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо представляет собой 6-членное гетероарильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом азота. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом кислорода. В некоторых воплощениях гетероарильное кольцо содержит по меньшей мере один атом серы. Например, гетероарильное кольцо может представлять собой пиридин, пиран, тиопиран, пиррол, фуран или тиофен.

В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное незамещенное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо. В других воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к

которому они присоединены, образуют 3-6-членное незамещенное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо, которое, возможно, замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. Например, циклоалкильное кольцо может представлять собой циклопропильное кольцо, циклобутильное кольцо, цикlopентильное кольцо или циклогексильное кольцо. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом азота. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом кислорода. В некоторых воплощениях гетероциклическое кольцо содержит по меньшей мере один атом серы. Например, гетероциклическое кольцо может представлять собой пиперидин, тетрагидропиран, тиан, пирролидин, тетрагидрофуран или тетрагидротиофен.

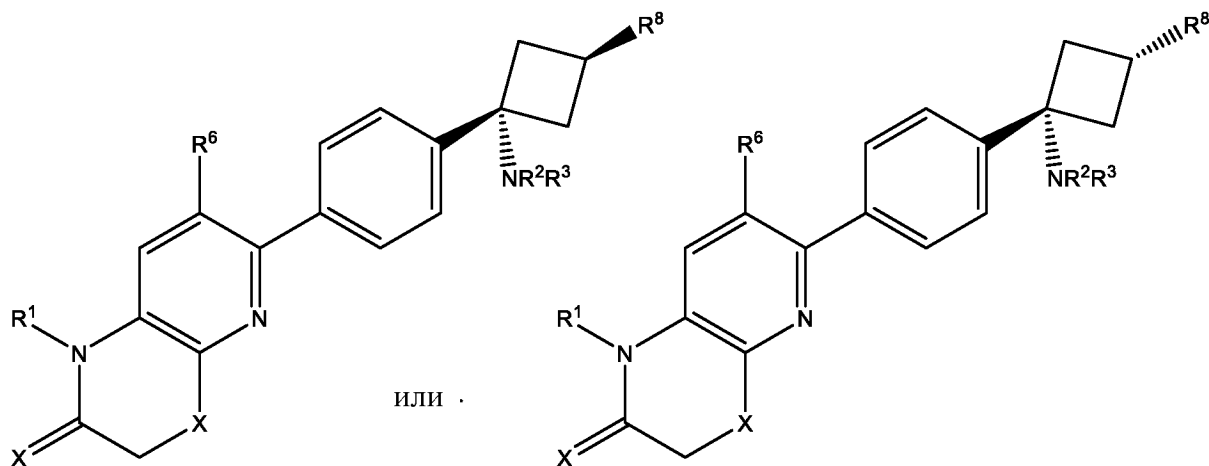
В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют незамещенное циклопропильное, циклобутильное, цикlopентильное или циклогексильное кольцо. В других воплощениях циклопропильное, циклобутильное, цикlopентильное или циклогексильное кольцо замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена. В некоторых воплощениях R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют незамещенное циклобутильное кольцо. В других воплощениях циклобутильное кольцо замещено одним или более заместителями, выбранными из C_1 - C_{10} алкила, $-CN$, $-OR^7$, галогена, $-COR^7$, CO_2R^7 , $CONR^7_2$ и $-NR^7_2$. В некоторых воплощениях один или более заместителей выбраны из C_1 - C_6 алкила, $-CN$, $-OH$ и галогена.

В некоторых воплощениях каждый X представляет собой O .

В некоторых воплощениях R^1 представляет собой незамещенный C_1 - C_{10} алкил, незамещенный C_1 - C_6 алкил или незамещенный C_1 - C_4 алкил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил, этил, пропил, бутил, пентил или гексил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил, этил, н-пропил, изо-пропил, н-бутил, изо-бутил или трет-бутил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой метил или этил. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой C_1 - C_{10} алкил, C_1 - C_6 алкил или C_1 - C_4 алкил, замещенный одним или более заместителями, выбранными из галогена, $-CN$, $-OH$ или 3-6-членного циклоалкила. В некоторых воплощениях R^1 представляет собой $-(CH_2)_nCN$, где n принимает значения 1, 2, 3, 4 или 5.

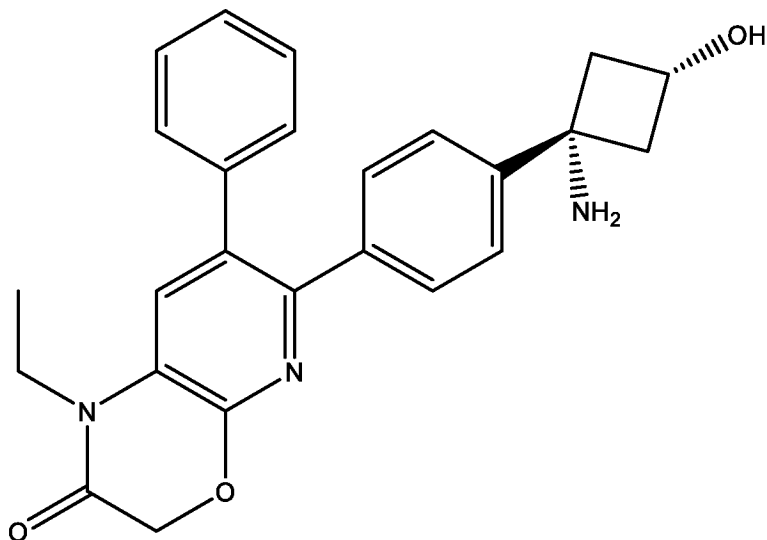
В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода и C_1 - C_{10} алкила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода и C_1 - C_6 алкила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 независимо выбран из водорода, метила и этила. В некоторых воплощениях каждый из R^2 и R^3 представляет собой водород.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^8 выбран из -OH, -CN, галогена или C_1 - C_6 алкила.

В некоторых воплощениях соединение формулы (I) представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль, мезитатную соль или фосфатную соль. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль. В некоторых таких воплощениях тартратная соль представляет собой L-тартратную соль.

В некоторых воплощениях соединение приготовлено в виде композиции для перорального введения субъекту.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение частоты, продолжительности или интенсивности кровотечения, связанного с НГТ. В некоторых таких воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение. В некоторых воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой носовое кровотечение.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает повышение уровней гемоглобина у субъекта.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение размера телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой кожные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой назальные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой телеангиэктазии полости рта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой желудочно-кишечные телеангиэктазии.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение размера артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение образования АВМ у субъекта. В некоторых таких воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой легочные АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой церебральные (мозговые) АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой висцеральные АВМ.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает предупреждение у субъекта шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение у субъекта степени шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение потребности в железосодержащих добавках у субъекта, например, уменьшение количества введений железа путем инфузии, необходимых субъекту. В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение количества переливаний крови, необходимых субъекту.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение печеночного кровотока.

В некоторых воплощениях лечение НГТ уменьшает необходимость трансплантации печени субъекту.

В некоторых воплощениях лечение НГТ включает уменьшение частоты и/или тяжести дополнительных симптомов НГТ. Такие дополнительные симптомы могут включать одышку, мигрень, усталость, неврологические события и эмболические события.

В данном воплощении также предложен способ лечения наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ) у субъекта, которому это необходимо, включающий введение субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в любом из указанных выше воплощений.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению частоты, продолжительности или интенсивности кровотечения, связанного с НГТ. В некоторых таких воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение. В некоторых воплощениях кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой носовое кровотечение.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ включает повышение уровней гемоглобина у субъекта.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению размера телеангиэктазий у субъекта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой кожные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой назальные телеангиэктазии. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой телеангиэктазии полости рта. В некоторых воплощениях телеангиэктазии представляют собой желудочно-кишечные телеангиэктазии.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению размера артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта. В некоторых воплощениях способ предупреждает образование АВМ у субъекта. В некоторых таких воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой легочные АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют

собой мозговые АВМ. В некоторых воплощениях артериовенозные мальформации представляют собой висцеральные АВМ.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ включает улучшение качества жизни субъекта.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к предупреждению сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ предупреждает у субъекта шунтирование справа налево, вызванный легочной АВМ. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению у субъекта степени шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению потребности субъекта в железосодержащих добавках, например, уменьшению количества введений железа путем инфузии, необходимых субъекту. В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению количества переливаний крови, необходимых субъекту.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению печеночного кровотока.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ уменьшает необходимость трансплантации печени субъекту.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к уменьшению частоты и/или тяжести дополнительных симптомов НГТ. Такие дополнительные симптомы могут включать одышку, мигрень, усталость, неврологические события и эмболические события.

В некоторых воплощениях способ лечения НГТ приводит к общему улучшению качества жизни субъекта.

ТЕРМИНОЛОГИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В данном описании термин «аллостерический ингибитор АКТ» означает вещество, ингибирующее активность АКТ путем связывания с АКТ в сайте, отличном от активного сайта фермента.

В данном описании термин «галоген» относится к -F, -Cl, -Br и -I.

Сокращения

Таблица 1: Сокращения

HGT	Наследственная геморрагическая телеангиэктазия
AVM	Артериовенозная мальформация
AV	Артериовенозный
Eng-iKO	Эндоглин-индуцированный нокаут
ALK1 (также известный как ACVRL1)	Активин рецептор-подобная киназа 1
BMP	Костный морфогенетический белок
TGF- β	Трансформирующий фактор роста- β
VEGF	Фактор роста сосудистого эндотелия
PI3K	Фосфоинозитид 3-киназа
AKT	Протеинкиназа В (также известная как PKB)
PTEN	Гомолог фосфатазы и тензина
mTOR	Мишень рапамицина в клетках млекопитающих
eNOS	Эндотелиальная синтаза оксида азота
Ang2	Ангиогенин 2
FOXOs	Белки Forkhead box (класс O)
iKO	Индукцированный нокаут
IP injection	Внутрибрюшинная инъекция
PFA	Параформальдегид

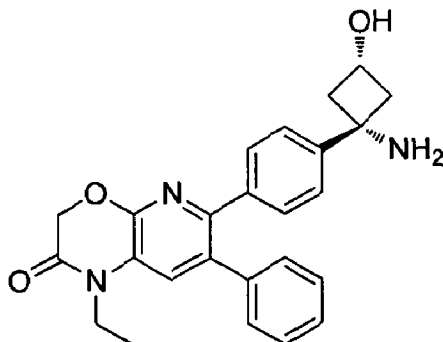
PBS	Фосфатно-солевой буферный раствор
BSA	Бычий сывороточный альбумин
α -SMA	Гладкомышечный альфа-актин
FITC	Флуоресцеина изотиоцианат
ANOVA	Дисперсионный анализ
SEM	Стандартная ошибка среднего
АТФ	Аденозинтрифосфат
PKA	Протеинкиназа А
PKC	Протеинкиназа С
PKG	Протеинкиназа G
PRKACA	Каталитическая субъединица альфа протеинкиназы
PRKACB	Каталитическая субъединица бета протеинкиназы
cGMP	Циклический гуанозинмонофосфат
PRKG1	цГМФ-зависимая протеинкиназа 1
ROCK	Rho-ассоциированная протеинкиназа
Px	Постнатальный день x
Q.D.	<i>quaque die</i> (то есть один раз в сутки)

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1. Синтез 6-(4-(1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-она

6-(4-(1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он (обозначаемый здесь как «свободное основание VAD044») синтезировали согласно протоколу, изложенному в WO2011077098 - см., в частности, Примеры 97, 113 и 139 (воспроизведены ниже):

Синтез 6-(4-((1s,3s)-1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-она: из WO2011077098 Пример 139:



Стадия 1: трет-бутил((1s,3s)-1-(4-(1-этил-2-оксо-7-фенил-2,3-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-6-ил)фенил)-3-гидроксициклобутил)карбамат

В 15 мл пробирку для реакций добавляли 6-бromo-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он* (50 мг, 0,150 ммоль), трет-бутил((1s,3s)-3-гидрокси-1-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)циклобутил)карбамат** (49 мг, 0,125 ммоль) и цезия карбонат (204 мг, 0,625 ммоль) в смеси 1,4-диоксана (2,3 мл) и воды (0,8 мл) с получением бесцветного раствора. Дегазировали путем барботирования азотом в течение 15 минут, с последующим добавлением дихлорметанового аддукта [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлоропалладия(II) (20 мг, 0,025 ммоль) и дегазации в течение дополнительных 5 минут. Реакционную смесь нагревали до 50°C в атмосфере азота в течение одного часа и затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры, разводили водой (5 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 x 5 мл). Объединенные органические фазы высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха под пониженным давлением. Осадок очищали при помощи хроматографии Biotage (циклогексан:этилацетат, элюирование градиентом от 90:10 до 0:100) с получением желаемого продукта в виде беловатого твердого вещества (45 мг, выход 70%). ¹H-ЯМР (500 МГц, 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 (Способ D) RT = 1,25 мин, M+H⁺ = 516.20.

Стадия 2: 6-(4-((1s,3s)-1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он

трет-бутил((1s,3s)-1-(4-(1-этил-2-оксо-7-фенил-2,3-дигидро-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-6-ил)фенил)-3-гидроксициклобутил)карбамат (45 мг, 0,087 ммоль) растворяли в TFA (1 мл) и перемешивали в течение 30 секунд. Раствор немедленно концентрировали досуха под пониженным давлением. Осадок растворяли в диэтиловом эфире (~3 мл) и концентрировали досуха под пониженным давлением три раза. Затем осадок суспендировали в диэтиловом эфире (3 мл) и после отстаивания удаляли отделившийся растворитель пипеткой. Это повторяли три раза. Оставшийся растворитель удаляли путем лиофилизации в течение ночи с получением желаемого соединения в виде беловатого твердого вещества (33 мг, выход 71%). ¹H-ЯМР (500 МГц, 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 (Способ D) RT = 0,74 мин, M+H⁺ = 416.20.

*Синтез 6-бromo-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-она: из WO2011077098 Пример 113 (стадии 1-4) и стр. 222 (стадия 5):

Стадия 1: Этил 2-((5-бromo-3-нитропиридин-2-ил)окси)ацетат

К суспензии гидрида натрия (5,31 г, 133 ммоль) в 1,4-диоксане (250 мл) добавляли по каплям этилгликолят (12,56 мл, 133 ммоль) в течение 30 минут, поддерживая температуру ниже 30°C. Полученную густую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. В отдельную 1 л круглодонную колбу добавляли 5-бromo-2-хлоро-3-нитропиридин (21 г, 88 ммоль) в 1,4-диоксане (150 мл) с получением коричневого раствора. Суспензию гидрида натрия и этилгликолята добавляли по каплям в течение 30 минут при 0°C. Полученную реакционную смесь нагревали до 80°C в течение ночи.

Реакционную смесь концентрировали под пониженным давлением и неочищенный осадок очищали при помощи хроматографии на колонках Biotage на основе диоксида кремния (градиент от 0% до 10% этилацетата в н-гексанах) с получением указанного в заголовке соединения (1,8 г, 44%). ¹H ЯМР (500 МГц, 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).

Стадия 2: Этил 2-((3-нитро-5-фенилтиридин-2-ил)окси)ацетат

В 1 л круглодонную колбу добавляли этил 2-(5-бromo-3-нитропиридин-2-илокси)ацетат (18,33 г, 60,1 ммоль), фенилбороновую кислоту (10,99 г, 90 ммоль), трифенилфосфин (4,73 г, 18,02 ммоль) и цезия фторид (45,6 г, 300 ммоль) в 1,2-диметоксиэтаноле (300 мл) с получением желтого раствора. Реакционную смесь дегазировали

путем барботирования азотом в течение 30 минут. Добавляли палладия (II) ацетат (2,023 г, 9,01 ммоль) и нагревали смесь до 75°C в атмосфере азота в течение ночи. Реакционной смеси давали остыть до комнатной температуры и концентрировали досуха при пониженном давлении с получением коричневого твердого вещества. Его повторно растворяли в дихлорметане, фильтровали и концентрировали досуха под пониженным давлением с получением коричневого осадка. Неочищенный осадок очищали при помощи хроматографии Biotage (градиент от 5% до 60% этилацетата в н-гексанах) с получением указанного в заголовке соединения (6,9 г, 38%). ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8.58 (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).

Стадия 3: 7-Фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он

В 500 мл круглодонную колбу добавляли этил 2-(3-нитро-5-фенилпиридин-2-илокси)ацетат (4,6 г, 15,22 ммоль) в соляной кислоте, 37% (40 мл) с получением желтой суспензии. Смесь охлаждали до 0-5°C и затем добавляли порциями олово в порошке (9,94 г, 84 ммоль). Добавление сопровождалось выделением теплоты. В ходе добавления следует соблюдать осторожность. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение дополнительных 30 минут до прекращения пенообразования. Реакционную смесь нагревали до 80°C в атмосфере азота в течение 3 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой (800 мл). Выделяли белый преципитат путем фильтрования, промывали водой (100 мл) и отсасывали досуха с получением белого твердого вещества. Твердое вещество подвергали азеотропной перегонке с толуолом (3 x 30 мл) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (2,6 г, 77%). ¹H ЯМР (500 МГц, (CD₃)₂SO) δ 10.41 (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).

Стадия 4: 6-бromo-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он

В 10 мл сосуде для микроволновой обработки находились 7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он (50 мг, 0,221 ммоль) и N-бромосукцинимид (78,6 мг, 0,441 ммоль) в диметилформамиде (1 мл). Реакционную смесь нагревали до 80°C при СВЧ облучении в течение 30 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разводили этилацетатом (10 мл). Органический раствор промывали водой (2x10 мл) и рассолом (2x10 мл). Органическую фазу высушивали над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный осадок очищали при помощи хроматографии Biotage (градиент от 0% до 5% метанола в дихлорметане) с получением

указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (61 мг, 90%). ^1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD) δ 7.48-7.32 (5H, m), 7.12 (1 H, s), 4.82 (2H, s).

Стадия 5: 6-бromo-1-этил-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он

В 15 мл реакционную пробирку добавляли 6-бromo-7-фенил-1H-пиридо[2,3-b][1,4]оксазин-2(3H)-он (300 мг, 0,983 ммоль), иодозтан (0,095 мл, 1,180 ммоль) и карбонат калия (408 мг, 2,95 ммоль) в безводном N,N-диметилформамиде (1 мл) с получением коричневой суспензии. Перемешивали при 50°C в атмосфере азота в течение 60 минут. Реакционную смесь разводили насыщенным раствором бикарбоната натрия (5 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 x 5 мл). Объединенные органические фазы промывали водой с рассолом 50:50 (3 x 5 мл), высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха под пониженным давлением с получением коричневого твердого вещества. Его очищали при помощи хроматографии Biotage (25 г картридж на основе диоксида кремния, циклогексан:этилацетат, элюирование градиентом от 90:10 до 20:80) с получением указанного в заголовке соединения в виде бежевого твердого вещества (160 мг, выход 48,8%). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7.58-7.37 (5H, m), 7.21 (1H, s), 4.86 (2H, s), 3.96 (2H, q), 1.27 (3H, t). LCMS (Способ D) RT = 1,293 мин, M+1 = 334.

****Синтез трет-бутил((1s,3s)-3-гидрокси-1-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)циклобутил)карбамата (из WO2011077098 Пример 97):**

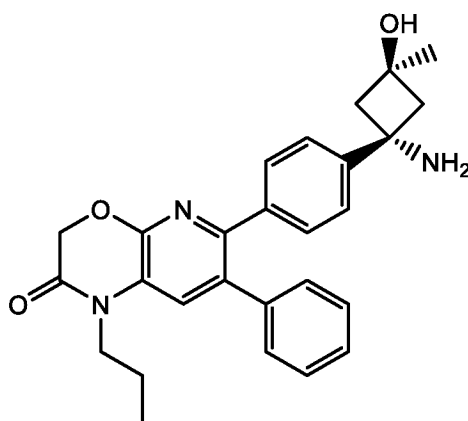
В 40 мл реакционную пробирку добавляли трет-бутил(1s,3s)-1-(4-бromoфенил)-3-гидроксициклобутилкарбамат*** (0,25 г, 0,731 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (14 мл) с получением бесцветного раствора. Его дегазировали путем барботирования азотом в течение 20 минут с последующим добавлением дихлорметанового аддукта [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлоропалладия(II) (60 мг, 0,073 ммоль). После барботирования азотом в течение дополнительных 15 минут добавляли калия ацетат (143 мг, 1,461 ммоль) и бис(пинаколато)диборон (223 мг, 0,877 ммоль). Реакционную смесь нагревали до появления конденсата в течение ночи, затем концентрировали досуха под пониженным давлением и очищали при помощи хроматографии Biotage (циклогексан:этилацетат, элюирование градиентом от 88:12 до 0:100) с получением желаемого продукта в виде бесцветного масла, затвердевающего в состоянии покоя (240 мг, выход 84%). ^1H -ЯМР (500 МГц, CDCl_3) 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).

(*** синтез описан в WO2009148887 и WO2009148916)

Пример 2. Фармакодинамика *in vitro*

Обнаружили, что 6-(4-(1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1Н-пиридо[2,3-*b*][1,4]оксазин-2(3Н)-она L-тарtrat (VAD044) осуществляет мощное и селективное ингибирование активности полноразмерных АКТ1 и АКТ2 в биохимическом киназном тесте со значениями IC_{50} 125 нМ и 95 нМ, соответственно (по сравнению с более 500 нМ в отношении АКТ3). Однако, мутированные формы всех трех изоформ АКТ, содержащие неактивные плекстрин-гомологичные домены (РН), не ингибировались VAD044. Кроме того, инкубация VAD044 с увеличивающимися концентрациями АТФ не оказывала влияния на значение IC_{50} при сравнении с экспериментами, выполнявшимися при K_m для АТФ. Это подтверждает, что способ связывания с VAD044 является аллостерическим и не зависящим от концентрации АТФ.

Предполагаемый аллостерический способ связывания VAD044 валидировали с использованием сокристаллической структуры высокого разрешения (2,32 Å (0,232 нм)), полученной для близкого аналога свободного основания VAD044 (Соединение 6, ниже) в комплексе с АКТ2 (см. Фиг. 1А).



Соединение 6

Как показано на Фиг. 1В, соединение 6 связывается в кармане аллостерического связывания приблизительно на расстоянии 10 Å (1 нм) от шарнирной области на границе раздела N- и C-долей киназного домена и РН домена.

Пример 3. Селективность в отношении киназ и профиль в отношении рецепторов и ионных каналов

VAD044 является мощным аллостерическим ингибитором АКТ1 и АКТ2. Исследовали окно селективности VAD044 в отношении неродственных протеинкиназ, сопряженных с G-белком рецепторов и ионных каналов. Хорошее окно селективности позволяет предположить благоприятный профиль безопасности при фармакологических концентрациях, которые, согласно ожиданиям, будут эффективны у пациентов.

Селективность в отношении киназ

VAD044 продемонстрировал высокую селективность в отношении АКТ1 и АКТ2 при 10 мкмоль при тестировании на панели из 450 киназ (как показано на Фиг. 2В, достигалось 89% ингибирование АКТ1 и 95% ингибирование АКТ2). Следует отметить, что ингибирование более 75% достигалось только в отношении двух киназ: p38α и PDK1 (84% и 77% ингибирование, соответственно, как показано на Фиг. 2В). Достигалось лишь 72% ингибирование АКТ3 (см. Фиг. 2В).

Дальнейший анализ с применением кривой титрования, построенной по 10 точкам, подтвердил, что значение IC_{50} в отношении p38α и PDK1 превышало 10 мкмоль.

Кроме того, значение IC_{50} VAD044 в отношении АКТ1 и АКТ2 оказалось значительно ниже ($IC_{50} = 125$ нМ и $IC_{50} = 95$ нМ, соответственно), чем в отношении изоформы АКТ3 (для которой значение EC_{50} VAD044 превышало 500 нМ).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что VAD044 является мощным и селективным ингибитором АКТ1 и АКТ2.

Профиль в отношении рецепторов и ионных каналов

10 мкмоль VAD044 не ингибировал активность ионных каналов сердца Nav1.5, Cav1.2, Kv4.3, KChIP2, Kv1.5, KCNQ1, minK, Kir2.1 и HCN4 ниже 25% и демонстрировал превосходную селективность на панели 76 рецепторов и ионных каналов (панель Millipore Drug Discovery Safety and Liability). Следует отметить более чем 50% ингибирование при 10 мкмоль только трех сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), а именно LPA1, мотилина и рецепторов P2Y1 (были продемонстрированы средние значения ингибирования 57,4%, 50,0% и 50,6%, соответственно), и агонистическую активность в отношении только одного GPCR с увеличением активности GPCR более чем на 20% (а именно GPR14, с увеличением на 29,5%, наблюдавшимся при 10 мкмоль). Эти результаты приведены в Таблице 2 ниже:

Таблица 2: Результаты, полученные с использованием панели Безопасность и обязательства при разработке лекарств от Millipore

Мишень GPCR	АГОНИСТ средний % увеличения активности	АНТАГОНИСТ средний % ингибирования	Мишень GPCR	АГОНИСТ средний % увеличения активности	АНТАГОНИСТ средний % ингибирования
5-HT1A	2,1	30,6	GnRH	-0,6	4
5-HT2A	1,3	-0,7	GPR109A	-0,7	3,1
5-HT2B	3,7	7,6	GPR14	29,5	52,9
5-HT2C	0,8	21,9	H1	-0,2	3,8

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
D2	-1,1	-0,2
D5	-0,8	35,4
DP	-1,7	5,8
EP2	-1	-0,5
EP3	-0,1	9,2
ETA	-0,4	10,5
ETB	-1,1	2,9
FP	-0,7	13,6

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
Мотилин	-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
S1P3	-0,4	-0,6
SST4	-0,8	16,5
Тромбин- активированные PAR	0	-1,2
TP	-0,5	0
TSH	-0,1	-0,5
V1A	-1,5	2,5
V2	-1,5	22,8
VPAC1	-0,7	8,5

FPR1	-0,1	13,3	VPAC2	0	6,2
GAL1	0,3	3,4	Y2	-2,2	-5,7

Приведенные выше результаты демонстрируют, что VAD044 не влияет на протестированные рецепторы и ионные каналы.

Таким образом, ферментативный профиль VAD044 *in vitro* можно резюмировать следующим образом:

- VAD044 эффективно и селективно ингибирует АКТ1 и АКТ2 (IC₅₀=125 нМ и 95 нМ) с окном по меньшей мере в 5 раз больше, чем в отношении изоформы АКТ3 (IC₅₀ более 500 нМ)
- VAD044 не влияет на широкий спектр протестированных киназ, рецепторов и ионных каналов.

Пример 4: Исследование безопасности/токсичности трех соединений ингибиторов АКТ, их антиангиогенных свойств и способности предупреждать образование АВМ у мышей Eng-iKO

Материалы/методы

Мыши

Беременные самки C57Bl/6J были предоставлены Janvier Labs. Мышей *EngFlox/flox* (Mahmoud et al., (2010), "Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin", *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211037>) скрещивали с *Cdh5(PAC)-CreERT2* (12) с получением специфического индуцированного нокаута *Eng* в эндотелии. Содержание и обращение с животными соответствовали рекомендациям правительства Голландии и директиве 2010/63/EU Европейского Парламента. Предпринимали все усилия для минимизации количества используемых животных и их страданий. Все протоколы были одобрены институциональным комитетом медицинского центра университета Лейден по гуманному обращению с животными (номер проекта AVD1160020171628). Для исследования ангиогенеза сетчатки использовали самцов и самок мышей на первой неделе после рождения.

Ингибирование АКТ *in vivo*

Профиль безопасности/токсичности и установление минимальной эффективной дозы, ингибирующей ангиогенез:

Детенышам мышей C57Bl/6J дикого типа осуществляли однократную инъекцию 5, 10, 25, 50 или 100 мг/кг массы тела перифосина или 0, 2,5, 5, 10, 25 или 50 мг/кг массы тела упротертиба или 2,5, 5 и 10 мг/кг VAD044 на P4 и затем умерщвляли на P7. Сетчатки

обрабатывали для иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано (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>).

Определение минимальной эффективной дозы, предотвращающей образование АВМ у мышей Eng-iKO:

Для индукции почти полного нокаута генов у новорожденных мышей *EngFlox/flox; cdh5-CreERT2* осуществляли инъекции тамоксифена (50 мкг) на P2 с последующей внутрибрюшинной инъекцией 0, 25 или 50 мг/кг массы тела перифосина однократно на P3 и P5 или внутрибрюшинной инъекцией 10 мг/кг массы тела перифосина однократно на P3, P4, P5 и P6. Животным, которые служили контролем, осуществляли инъекции носителя в том же объеме. Затем мышей подвергали эвтаназии на P7 и обрабатывали сетчатки для иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано (Lebrin et al., см. выше).

Для индукции почти полного нокаута генов у новорожденных мышей *EngFlox/flox; cdh5-CreERT2* осуществляли инъекции тамоксифена (50 мг) на P2 с последующей внутрибрюшинной инъекцией 0, 1, 2,5 или 5 мг/кг массы тела упротертиба однократно на P3. Животным, которые служили контролем, осуществляли инъекции носителя в том же объеме. Затем мышей подвергали эвтаназии на P7 и обрабатывали сетчатки для иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано (Lebrin et al., см. выше).

Для индукции почти полного нокаута генов у новорожденных мышей *EngFlox/flox; cdh5-CreERT2* осуществляли инъекции тамоксифена (50 мг) на P2 с последующей внутрибрюшинной инъекцией 0, 2,5, 5 или 10 мг/кг массы тела VAD044 однократно на P3 и P5. Животным, которые служили контролем, осуществляли инъекции носителя в том же объеме. Затем мышей подвергали эвтаназии на P7 и обрабатывали сетчатки для иммунофлуоресцентного окрашивания, как описано (Lebrin et al., см. выше).

Анализ сосудистой сети сетчатки

Что касается сосудистой сети сетчатки, количественную оценку числа АВ шунтов на мышь осуществляли вручную. Радиальное разрастание от зрительного нерва, длину сосудов и точки ветвления анализировали по меньшей мере в 4 полях зрения на сетчатку с применением программного обеспечения Image J (Национальный институт здоровья США), как описано 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; и 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. Специально разработанный в лаборатории макрос позволял автоматически обрабатывать изображения с использованием одинаковых параметров обработки и количественной оценки. Вкратце, яркость изображений увеличивали путем изменения предельных значений пикселей, зависящих от конкретного содержимого гистограммы изображения. Для уменьшения интенсивности однородностей применяли фильтр Гаусса. Порядок фильтра зависел от разрешения изображения. Затем рассчитывали шаг порога на основании методики глобального порога, такой как способ, предложенный Otsu, или способ, предложенный Li, с получением двоичного изображения. Затем применяли фильтр «медиана» для устранения возможных локальных неоднородностей, которые могли привести к ложному обнаружению точек ветвления. По двоичным изображениям производили количественную оценку плотности сосудов (рассчитываемую как отношение пикселей, ассоциированных с сосудами, поделенное на общее количество пикселей в изображении). Что касается других параметров, вначале рассчитывали остов изображения при помощи ImageJ, затем количественно оценивали общую длину сосудов с применением встроенной утилиты Measure Skeleton Length в ImageJ. Количество точек ветвления получали при помощи встроенной утилиты Analyze Skeleton в ImageJ. Все результаты переносили в программу Microsoft Office Excel и автоматически преобразовали с применением созданной в лаборатории программы. Поскольку все изображения, сгенерированные на каждом этапе обработки, сохранялись, осуществляли визуальный контроль, обеспечивающий отсутствие некорректных результатов.

Статистическую обработку проводили с применением программы Prism 7 (GraphPad). Для большинства экспериментов применяли однофакторный дисперсионный анализ для множественных сравнений. Результаты представлены как средние значения $\pm$ SEM. Применяли апостериорный критерий Даннетта для парных значений. Значение $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$ или $****P<0,0001$ обозначает статистическую значимость. Ранее авторы изобретения наблюдали внутригрупповую вариацию параметров, относящихся к изменениям архитектуры кровеносных сосудов, приблизительно 15%, таким образом, ожидалось различия между контрольными и мутантными мышами приблизительно 20-30%. Таким образом, ожидалось, что группа из 8 мышей на каждое условие позволит выявить статистическую значимость.

Выделение, культивирование и стимуляция мышечных эндотелиальных клеток

Хирургическим путем извлекали легкие детенышей мышей Engflox/flox, промывали ледяной DMEM и выделяли эндотелиальные клетки, как описано 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). Вкратце, ткани измельчали при помощи ножниц, расщепляли коллагеназой А (10103586001, Roche) 3 мг/мл в DMEM в течение 15 мин при 37°C и затем фильтровали через стрейнер 70 мкм. Клеточную суспензию центрифугировали при 200 g в течение 5 мин и удаляли CD45+ клетки с применением Dynabeads с овечьим антителом против IgG крысы (11035, Invitrogen), покрытых крысиным антителом к CD45 мыши (550539, BD Pharmigen). Эндотелиальные клетки сортировали с применением Dynabeads с овечьим антителом против IgG крысы (11035, Invitrogen), покрытых крысиным антителом к PECAM1 мыши (550274, BD Pharmigen), согласно инструкциям производителя. После 5-кратного промывания при помощи DMEM с 0,1% BSA клетки высевали в 6-луночные планшеты. ЭК (эндотелиальные клетки) легких и печени поддерживали в течение двух-трех пассажей в среде для культивирования эндотелиальных клеток 2 (C-22011, PromoCell) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, человеческих эпидермальных факторов роста, основного фактора роста фибробластов, инсулиноподобного фактора роста, человеческого фактора роста эндотелия-165, аскорбиновой кислоты, гепарина и гидрокортизона (C-39211, SupplementPack EC GM2, PromoCell).

ЭК высевали в 6-луночные планшеты и культивировали до конfluence 90%. Затем клетки промывали PBS и оставляли в условиях сывороточного голодания в течение шести часов. Клетки обрабатывали в течение 1 ч 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 5,0 или 10,0 мМ VAD044 в среде для культивирования эндотелиальных клеток 2 (C-22011, PromoCell) перед стимуляцией VEGF-A (25 нг/мл) в течение 30 мин. Клетки промывали холодным PBS и затем лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), 1% тритон X-100, 0,1% додецилсульфат натрия (SDS), 0,5% дезоксихолат), содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз (PPC1010, Sigma-Aldrich).

Инфицирование аденовирусом

ЭК легких или печени инфицировали аденовирусом, экспрессирующим Cre-рекомбиназу (SL100707, SignaGen Laboratories), с применением множественности заражения (m.o.i) 500 в течение 6 часов, промывали PBS и затем культивировали в среде для культивирования эндотелиальных клеток 2 в течение 12 - 60 часов перед использованием.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Глаза фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в PBS при комнатной температуре в течение 10 мин, сетчатки препарировали, пост-фиксировали в 4% PFA в PBS при 4°C в течение ночи, затем обрабатывали для иммунологического окрашивания. Сетчатки пермеабелизовали в PBS, 1% BSA и 0,5% тритон X-100 при 4°C в течение ночи, промывали в PBS, дважды промывали в PBlec (PBS, pH 6,8, 1% тритон-X-100, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂, 0,1 mM MnCl₂) и затем инкубировали в биотинилированном лектине *Griffonia simplicifolia* (изолектин B4) (B-1205, Vector Laboratories, 1:50) в PBlec при 4°C в течение ночи. После 5 промываний в PBS образцы инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с Cy-3 (PA43001, Sigma-Aldrich, 1:100), и антителом к SMA (клон 1A4) (F3777, Sigma-Aldrich), конъюгированным с FITC, разведенным в PBS, 0,5% BSA и 0,25% X-100, при 4°C в течение 2 ч. После промывания плоский тотальный препарат сетчаток заключали в среду DAKO (S3023, Dako). Полные 3-мерные изображения тотальных препаратов сетчаток с высоким разрешением получали с применением лазерного сканирующего микроскопа SP5 или SP8 (Leica).

Вестерн-блоттинг и количественный анализ

Образцы кипятили в течение 10 мин и разделяли белки при помощи электрофореза в 10% полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с последующим блокированием 5% BSA или 5% порошковым молоком/Трис-буферизованным физиологическим раствором/Tween 20 и инкубировали со следующими первичными антителами: кроличьим антителом к фосфо-Akt1 (Ser473) (44-621G, Invitrogen), кроличьим антителом к Akt1 (2938S, Cell Signaling), кроличьим антителом к фосфо-Smad1/5 (Ser463/465) (9516S, Cell Signaling), кроличьим антителом к Smad1 (6944S, Cell Signaling), мышинным антителом к фосфо-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) (9106S, Cell signaling), кроличьим антителом к p44/42 MAPK (Erk1/2) (9102S, Cell Signaling), козьим антителом к эндоглину (AF1097, R&D systems) и мышинным антителом к β-актину (A5441, Sigma-Aldrich). Для детекции использовали конъюгированное с HRP антитело к IgG кролика или конъюгированное с HRP антитело к IgG мыши (W4011 или W4021, соответственно, Promega) или конъюгированное с HRP антитело к IgG козы (HAF017, R&D systems) с последующим сканированием при помощи устройства для визуализации ChemiDoc, BIO-RAD. Изображения регистрировали в линейном диапазоне и использовали программу ImageJ для измерения уровней белка и фосфорилирования белка. Для всех блотов вычитали уровень шума и нормализовали результаты, как указано в графических материалах.

Фармакокинетический (ФК) профиль VAD044 у новорожденных мышей

Готовили VAD044 в стерильном PBS и вводили новорожденным мышам на P3 и P5 внутрибрюшинным (i.p.) путем в дозе с концентрацией 2,5 мг/кг и объемом 10 мкл/г. Для получения плазмы у каждой мыши забирали терминальные образцы крови через 24 ч и 48 ч после инъекций под изофлурановым наркозом. В исследовании использовали 4 новорожденных мышей на каждый момент времени. Для получения плазмы кровь собирали в устройство для забора крови microvette (Sartsed) с покрытием EDTA. Кровь центрифугировали при 2700 x g в течение 10 минут и отбирали приблизительно от 30 до 40 мкл плазмы и аликвотировали в полипропиленовые пробирки (по две аликвоты на каждое животное). Образцы плазмы хранили до проведения биоанализа при -80°C. Уровни соединения VAD044 в образцах плазмы определяли при помощи LC-MS/MS. Концентрация VAD044 в плазме через 24 ч и 48 ч позволяет рассчитать C_{avg} согласно следующей формуле: $AUC_{0-inf}/(\text{интервал величины } 48 \text{ ч})$.

Моделирование человеческой дозы

Анализ, моделирующий человеческую дозу, осуществляли с применением подхода нелинейного моделирования смешанных эффектов при помощи специального программного обеспечения MONOLIX (версия 2019R1). Для предварительной и последующей обработки данных и анализа результатов моделирования использовали R (версия 3.5.3). Все исходные ФК данные, полученные на мышинных, крысиных и собачьих образцах, использованные для построения моделей, объединены в Таблице 3, где представлены сводные данные по количеству животных и количеству образцов, включенных в общий анализ.

Таблица 3. Обобщенные данные по имеющимся наблюдениям концентраций VAD044

Данные	Число животных	Число образцов	Число образцов, включенных в анализ
Мышь	15	90	90 (100%)
Крыса	161	861	861 (100%)
Собака	38	448	448 (100%)
ИТОГО	214	1399	1399 (100%)

ФК параметры человеческой модели определяли на основании аллометрического масштабирования параметров клиренса и объема в зависимости от массы тела. В отношении биодоступности и скорости всасывания необходимо было сделать допущения. Скорость всасывания k_{abs} получали из значения у собак с применением аллометрического масштабирования в зависимости от массы тела с показателем степени -0,25. Указанный

показатель степени был получен ранее для других параметров, связанных с той же физической единицей, что и k_{abs} , 1/время, см. Dawson TH. Allometric relations and scaling laws for the cardiovascular system of mammals. *Systems*. 2014 Jun;2(2):168-85. Данные текущего анализа не позволяли определить значения биодоступности у человека. Таким образом, пришлось исходить из допущения, предположив 50% биодоступность у человека в качестве достаточно консервативной оценки.

Как обсуждается ниже, экспозиция свободному основанию VAD044 в крови, измеренная в плазме новорожденных мышей при помощи биоанализа LC/MS/MS при дозе 2,5 мг/кг, соответствует C_{avg} 22,9 нг/мл (или 55,1 нМ) в течение 48 часового интервала между введениями. На основании ФК моделирования прогнозируется, что такая экспозиция будет достигаться у человека при однократном приеме фиксированной дозы (свободного основания VAD044) от 20 до 40 мг ежедневно. Указанная доза рассчитана для взрослого человека 70 кг и с прогнозируемой биодоступностью VAD044 от 50 до 75%.

Оценивавшиеся соединения

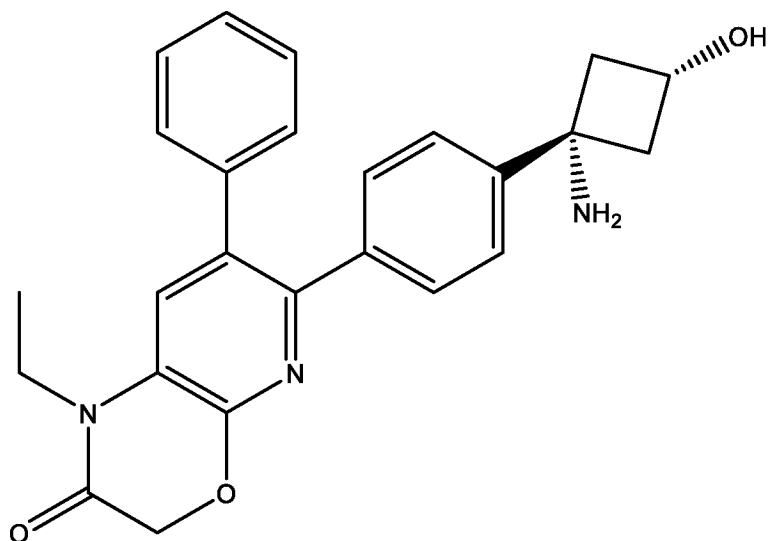
Исследовали три соединения с различными ингибиторными свойствами в отношении АКТ киназы:

(i) **Перифосин** (препарат сравнения): ингибитор АКТ из класса алкилфосфолипидов. В отличие от АТФ-связывающих ингибиторов киназ, перифосин воздействует на плекстрин-гомологичный (PH) домен АКТ, тем самым предупреждая ее транслокацию на плазматическую мембрану (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>))

(ii) **Упросертиб** (препарат сравнения): конкурирующий с АТФ ингибитор АКТ1, АКТ2 и АКТ3. Он также потенциально способен ингибировать представителей семейства РКС, включая PRKACA, PRKACB, а также cGMP-зависимую протеинкиназу PRKG1 и ROCK киназы (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>)

(iii) **VAD044** (соединение по данному изобретению): новый аллостерический ингибитор АКТ1/2 с превосходной селективностью относительно других киназ. Как

обсуждалось выше, VAD044 представляет собой L-тарtratную соль соединения, показанного ниже (обозначается как «свободное основание VAD044»):



Свободное основание VAD044

Наименование IUPAC 6-(4-(1-амино-3-гидроксициклобутил)фенил)-1-этил-7-фенил-1Н-пиридо[2,3-*b*][1,4]оксазин-2(3Н)-он

Профиль перифосина

Токсичность

Побочных эффектов у новорожденных мышей, которым осуществляли однократную инъекцию перифосина на P4, в дозах в диапазоне от 5 до 25 мг/кг, не наблюдалось. Введение 50 мг/кг перифосина задерживало прибавку в весе, а введение 100 мг/кг перифосина вызывало значительную смертность детенышей (см. Фиг. 3). Таким образом, профиль безопасности перифосина является удовлетворительным по сравнению с таким лекарственным средством, как талидомид, который ранее был испытан на новорожденных мышах и, как сообщалось, снижал тяжесть и частоту носовых кровотечений у пациентов с НГТ (Lebrin et al., см. выше).

Антиангиогенные свойства у мышей C57Bl/6J

Низкие дозы перифосина, вводимые однократно на P4 (дозы в диапазоне от 5 до 10 мг/кг), не влияли на ангиогенез (см. Фиг. 4A-D). Только высокие дозы перифосина в диапазоне от 25 до 100 мг/кг приводили к незначительным изменениям в сосудистом русле сетчатки, с небольшим уменьшением числа точек ветвления и площади сосудов (см. Фиг. 4A-D). Перифосин 100 мг/кг также приводил к уменьшению радиального разрастания сосудов, проявляя незначительные препятствующие миграции эндотелиальных клеток свойства (см. Фиг. 4A-B). Таким образом, перифосин демонстрирует слабые антиангиогенные свойства.

Способность предотвращать образование АВМ у мышей Eng-iKO

Мышам *Eng-iKO* на P2 осуществляли инъекции 50 мкг тамоксифена. Затем мышам вводили внутривентриально перифосин либо на P3 и P5 (25 или 50 мг/кг массы тела, внутривентриально) (Фиг. 5A) или ежедневно с P3 до P6 (10 мг/кг массы тела, внутривентриально). Анализировали сетчатки на P7 (Фиг. 5A). Однопометных животных, получавших инъекции только носителя или тамоксифена и носителя, использовали в качестве контроля. Как и ожидалось, условная делеция *Eng* на P2 приводила к образованию АВМ сетчатки (Фиг. 5B) и умеренному снижению роста сосудов (Фиг. 3D). Перифосин не обладал способностью предотвращать образование АВМ у мышей *Eng-iKO* (Фиг. 5C) и не подавлял ангиогенез (Фиг. 5D-E) в протестированных дозах и схемах введения (Фиг. 5A-F). Кроме того, ежедневное внутривентриальное введение 25 мг/кг перифосина приводило к гибели детенышей (данные не приведены).

Профиль упросертиба

Токсичность

Упросертиб оказался высоко токсичным, о чем свидетельствовала жизнеспособность детенышей и масса мышей дикого типа, наблюдаемая с P4 до P7 после однократной инъекции упросертиба на P4 (концентрация в диапазоне от 10 до 50 мг/кг массы тела) – см. Фиг. 6A-B. Обнаружили, что дозы от 1 до 5 мг/кг массы тела, вводившиеся мышам *Eng-iKO*, приводили к гибели большинства детенышей.

Антиангиогенные свойства у мышей C57Bl/6J

Даже в низких дозах, вводимых однократно на P4 (от 5 до 25 мг/кг, внутривентриально), упросертиб подавлял ангиогенез с небольшим уменьшением радиального разрастания (Фиг. 7B) и значительным уменьшением площади сосудов (Фиг. 7C) и числа точек ветвления (Фиг. 7D), что предполагает антипролиферативное влияние на эндотелиальные клетки. Эти результаты демонстрируют, что упросертиб является мощным ингибитором ангиогенеза в сетчатке мышей.

Способность предотвращать образование АВМ у мышей Eng-iKO

Мышам *Eng-iKO* осуществляли двукратные инъекции упросертиба на P3 и P5 (Фиг. 8A). Однако, обнаружили, что две инъекции упросертиба приводили к гибели большинства детенышей (Фиг. 8B), что препятствовало дальнейшему изучению способности упросертиба предотвращать образование АВМ у мышей в исследуемых дозах.

Профиль VAD044

Соединение VAD044 уже продемонстрировало хороший профиль безопасности в предыдущих доклинических исследованиях на моделях с ксенотрансплантатами опухолей, таким образом дополнительные исследования безопасности/токсичности не проводились.

Способность предотвращать образование АВМ у мышей Eng-iKO

Исследуемые концентрации были сопоставимы с концентрациями, использовавшимися для упроектирования (Фиг. 9А). При таких концентрациях, при концентрациях лекарственного средства в диапазоне от 1,25 до 10 мг/кг массы тела, при двукратной инъекции VAD044 новорожденным мышам *Eng-iKO* на P3 и P5 побочных эффектов не наблюдалось (Фиг. 9В). VAD044 эффективно предотвращал формирование АВ шунта у мышей *Eng-iKO* в концентрациях 2,5 мг/кг и выше (Фиг. 10А-В). Доза 1,25 мг/кг оказалась неэффективной в предотвращении формирования АВ шунта (Фиг. 10А-В). VAD044 также был способен нормализовать плотность сосудистой сети сетчатки мышей *Eng-iKO* (Фиг. 10D) с небольшим влиянием на ангиогенез, незначительно уменьшая радиальное разрастание (Фиг. 10С) и число точек ветвления сосудистой сети у *Eng-iKO* (Фиг. 10Е). Экспозиция свободному основанию VAD044 в крови, измеренная в плазме новорожденных мышей при помощи биоанализа LC/MS/MS при дозе 2,5 мг/кг, соответствует C_{avg} 22,9 нг/мл (или 55,1 нМ) в течение 48 часового интервала между введениями препарата.

Делеция белка эндоглина в первичных эндотелиальных клетках мыши предпочтительно индуцирует активацию АКТ

Первичные эндотелиальные клетки выделяли из легких детенышей *Engflox/flox* на 7 день после рождения (P7) при помощи ферментативного расщепления коллагеназой I с последующим сортированием клеток с применением микрочастиц, покрытых PECAM1 (Фиг. 11А). Покрытые CD45 микрочастицы использовали для истощения популяции иммунных клеток CD45+/PECAM1+ (Фиг. 11А). Выделенные популяции клеток CD45-/PECAM1+ были схожи с эндотелиальными клетками и поддавались культивированию по меньшей мере в течение трех пассажей. Окрашивание на PECAM1 и VE-кадгерин подтверждало принадлежность к эндотелиальным клеткам (Фиг. 11В).

Используя возможности системы Cre-Lox, культуры первичных эндотелиальных клеток инфицировали рекомбинантными аденовирусами, кодирующими рекомбиназу Cre, для вырезания гена *Eng*. Аденовирусная инфекция была высоко эффективной и не оказывала влияния на жизнеспособность клеток. Почти во всех клетках рекомбинация генов происходила в течение первых 10 часов, и поскольку эндоглин представляет собой относительно стабильный белок с временем полужизни, оцениваемым приблизительно в 17

часов, гомогенные культуры эндотелиальных клеток получали в течение первых 60 часов после инфицирования с уровнями эндоглина, варьирующими от нормального и в половину сниженного до полной потери, о чем свидетельствовало окрашивание и анализ методом вестерн-блоттинг (Фиг. 11C-D).

Затем в эндотелиальных клетках легких с истощенной экспрессией белка Eng исследовали активацию сигнальных путей Akt и Smad1. Клетки обрабатывали VEGF, TGF- β 1 и BMP9 в течение 30 мин в разное время после инфицирования, соответствовавшее различным уровням экспрессии эндоглина. Как ранее опубликовано лабораторией Jakobsson (Jin et al., 2017 – см. выше), авторам изобретения удалось подтвердить, что снижение экспрессии белка эндоглина связано с усилением фосфорилирования Akt (Фиг. 12A). Наибольший интерес вызывает то, что фосфорилирование АКТ более чувствительно к снижению белка Eng, поскольку снижение белка Eng на 50% индуцирует усиление фосфорилирования Akt по сравнению с эндотелиальными клетками, экспрессирующими нормальные уровни эндоглина (Фиг. 12A), тогда как фосфорилирование Smad1 не изменяется (Фиг. 12B). Этот результат позволяет предположить, что снижение экспрессии эндоглина наполовину индуцирует усиленный ответ VEGF и усиленную передачу сигнала АКТ (усиливая пролиферацию и миграцию и способствуя сосудистым мальформациям), тогда как классическая передача сигнала BMP/SMAD остается нормальной.

Измерение IC50 VAD044 в эндотелиальных клетках контрольных мышей и мышей Eng-iKO

Затем исследовали влияние VAD044 на выделенные первичные эндотелиальные клетки легких мышей Eng-iKO. Как ожидалось, аденовирусная инфекция Cte приводила к полной утрате экспрессии эндоглина через 60 часов (Фиг. 13A). ЭК от контролей с нормальным уровнем экспрессии Eng были высоко чувствительны к VAD044, измеренное значение IC50 составляло 55 нМ, тогда как значение IC50 VAD044 в эндотелиальных клетках легких мышей, демонстрирующих полную утрату экспрессии Eng, составляло 93 нМ (Фиг. 13B). Этот ~2-кратный сдвиг IC50 может объясняться усилением активации АКТ (~2-4-кратной) при полном нокдауне белка Eng (Фиг. 12A). Параллельно анализировали фосфорилирование p42/p44 в качестве контроля селективности и подтверждали, что VAD044 не оказывал влияния на путь MAPK (Фиг. 13C).

Результаты/обсуждение

Упосертиб является конкурентным ингибитором АКТ, который связывается с АТФ-связывающимся карманом АКТ киназ изоформ 1, 2 и 3. Данное соединение является типичным низкомолекулярным каркасом с мощным ингибированием пан-киназ, имеющих

АТФ-карман (Dumble et al., 2014). Однако, между АТФ-связывающими карманами АКТ и протеинкиназы А (РКА), протеинкиназы С (РКС) или протеинкиназы G (РКГ) существует высокая степень гомологии. Таким образом, упроертиб демонстрирует выраженное ингибирование РКА, РКГ, РКС, а также ROCK киназ. Данная нецелевая киназная активность часто связана с увеличением побочных эффектов (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>).

Напротив, аллостерические ингибиторы, очевидно, обладают более высокой специфичностью в отношении АКТ. Например, VAD044 является новым аллостерическим ингибитором АКТ, который обладает профилем с наибольшей селективностью в данном классе ингибиторов с выраженной активностью в отношении АКТ1 и 2 (*US9221838B2*). Перифосин является необычным аллостерическим ингибитором, воздействующим на плекстрин-гомологичный домен АКТ, тем самым предупреждая ее транслокацию на плазматическую мембрану, необходимую для активации.

Биохимическая и клеточная активность VAD044 в отношении ингибирования АКТ киназы сопоставима с таковой упроертиба. Например, исходя из аналогичного биохимического анализа киназной активности, упроертиб и VAD044 демонстрируют IC_{50} в отношении АКТ1, равные 180 и 125 нМ, соответственно (см. Pachl, et al (2013). "Characterization of a chemical affinity probe targeting Akt kinases", Journal of Proteome Research, <https://doi.org/10.1021/pr400455j>; и Пример 3 выше, относящийся к VAD044). Аналогично, обе молекулы демонстрируют сопоставимый диапазон IC_{50} в отношении ингибирования АКТ киназы в линиях клеток, мутантных по $Pi3K\alpha$ или PTEN (например, MCF7, BT474 или LnCAP), составляющие от 34 до 143 нМ для упроертиба и от 50 до 130 нМ для VAD044. Напротив, перифосин обладает меньшей активностью по сравнению как с VAD044, так и с упроертибом, при этом клеточная ингибирующая активность в отношении АКТ в аналогичной линии клеток находится в микромолярном диапазоне (Gradziel et al., 2014; Kondapaka et al., 2003; Ríos-Marco et al., 2017 - см. выше).

Приведенные выше результаты демонстрируют, что для перифосина и упроертиба невозможно установить окно терапевтических доз, обладающее как приемлемой безопасностью, так и желаемой ингибиторной эффективностью. Для перифосина даже при высоких дозах, где можно ожидать полное ингибирование АКТ киназ, влияние на нормальный ангиогенез и АВМ шунт было лишь умеренным. При самой высокой переносимой дозе (25 и 50 мг/кг) существенного влияния на формирование шунта на модели НГТ1 у мышей не наблюдалось. При ежедневной инъекции 10 мг/кг наблюдалась

тенденция в отношении эффективности, однако статистическая значимость не достигалась. Напротив, упроертиб демонстрировал выраженные антиангиогенные свойства при однократной инъекции на P3. Доза 5 мг/кг хорошо переносилась и была выбрана для исследования эффективности. Однако, при двукратной инъекции на P3 и P6 доза 5 мг/кг приводила к высоким уровням смертности детенышей, что делало невозможной дальнейшую оценку его эффективности в предупреждении формирования АВМ шунта. Это может быть следствием нецелевого ингибиторного влияния упроертиба на PKA, PKG и ROCK киназы, которые могут участвовать в развитии детенышей между P3 и P7 (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>).

Две инъекции VAD044 в аналогичной дозе 5 мг/кг хорошо переносились, при этом летальность не наблюдалась. При 2,5 мг/кг VAD044 был способен полностью предотвращать формирование АВМ шунта. Неожиданно, указанная доза оказывала незначительное влияние или не влияла на нормальный ангиогенез, при этом будучи полностью эффективной в предотвращении формирования шунта.

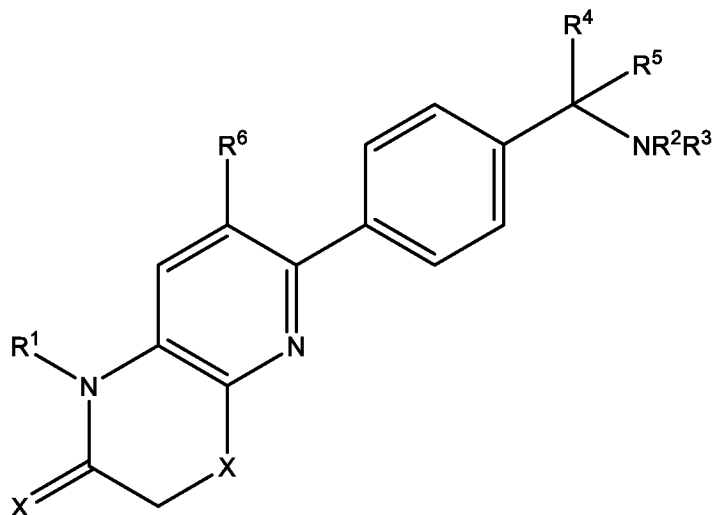
Данный результат позволяет предположить, что VAD044 может быть способен лечить сосудистые дефекты, наблюдающиеся при НГТ, благодаря механизму ингибирования пути АКТ. Это также позволяет предположить, что частичное ингибирование пути может быть достаточно для лечения сосудистых дефектов, наблюдающихся при НГТ. Во-первых, приведенные выше результаты подтверждают, что делеция Eng в эндотелиальных клетках предпочтительно вызывает гиперактивацию передачи сигналов АКТ в 2 - 4 раза, тогда как передача сигналов SMAD остается нормальной. Согласно приведенным выше результатам, минимальная эффективная доза 2,5 мг/кг соответствует экспозиции свободному основанию VAD044 в крови C_{avg} 22,9 нг/мл (или 55,1 нМ). Указанная концентрация является низкой и эквивалентна IC₅₀ VAD044 в отношении ингибирования АКТ в нормальных эндотелиальных клетках и IC₃₀₋₄₀ VAD044 в отношении ингибирования АКТ в эндотелиальных клетках с делецией белка Eng. Неожиданно, минимальная эффективная доза VAD044 на модели НГТ гораздо ниже, чем при онкологических показаниях. Несмотря на то, что IC₅₀ VAD044 в опухолевых клетках MCF7 *in vitro* является схожей (~50 нМ), минимальная эффективная доза *in vivo* на модели с ксенотрансплантатом опухоли составляет 30 мг/кг, то есть приблизительно в 10 раз выше, чем в вышеупомянутой модели НГТ1 у мышей. На основании различного фармакокинетического моделирования прогнозируется, что у человека данная эффективная концентрация, соответствующая C_{avg} 22,9 мг/мл, будет достигаться при однократной

базовой дозе (свободного основания VAD044) от 20 до 40 мг ежедневно. Указанная доза рассчитана для взрослого человека 70 кг с прогнозируемой биодоступностью VAD044 от 50 до 75%.

В целом, эти результаты позволяют предположить, что сосуды и эндотелиальные клетки, несущие делецию генов НГТ, очень чувствительны к ингибированию АКТ. Следовательно, низкие дозы VAD044 могут быть эффективны в борьбе с сосудистыми мальформациями при гиперактивации пути, возможно, вследствие подавления передачи сигналов BMP9, что наблюдается при НГТ, а также вследствие мутации с приобретением функции, что наблюдается при синдроме избыточного роста или венозной мальформации, возникающих в результате соматической мутации PI3Kalpha или TIE2 (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>).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении наследственной геморрагической телеангиэктазии (НГТ) у субъекта, где:

каждый X независимо представляет собой O или S;

R¹ выбран из водорода и C₁-C₁₀алкила, где каждый C₁-C₁₀алкил, возможно замещен одним или более заместителями, выбранными из галогена, -CN, -OR⁷ или 3-6-членного циклоалкила;

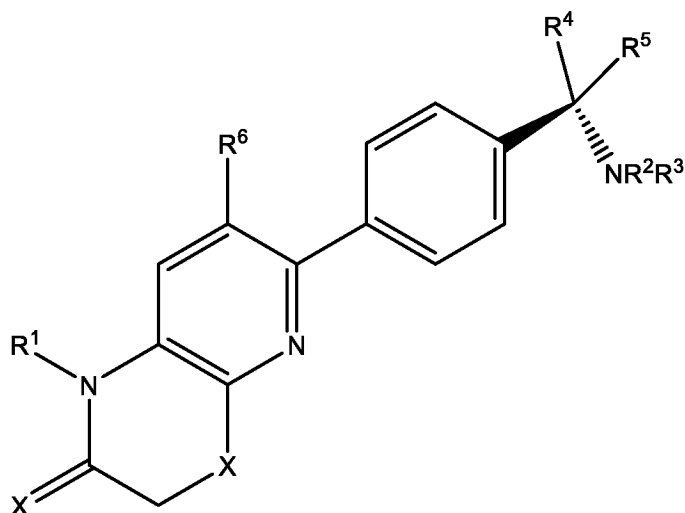
каждый из R² и R³ независимо выбран из водорода и C₁-C₁₀алкила; или R² и R³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное гетероциклическое кольцо;

каждый из R⁴ и R⁵ независимо выбран из C₁-C₆алкила, C₂-C₆алкенила или C₂-C₆алкинила; или R⁴ и R⁵ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное циклоалкильное или гетероциклическое кольцо, которое возможно замещено одним или более заместителями, выбранными из C₁-C₁₀ алкила, -CN, -OR⁷, галогена, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ и -NR⁷₂;

R⁶ представляет собой 5-7-членное арильное или гетероарильное кольцо, которое возможно замещено одним или более заместителями, выбранными из C₁-C₁₀ алкила, -CN, -OR⁷, галогена, -COR⁷, CO₂R⁷, CONR⁷₂ и -NR⁷₂; и

каждый R⁷ независимо выбран из водорода и C₁-C₁₀алкила.

2. Соединение для применения по п. 1, где соединение формулы (I) имеет структуру:



3. Соединение для применения по п. 1 или п. 2, где R^6 представляет собой незамещенный фенил.

4. Соединение для применения по любому из п.п. 1-3, где R^4 и R^5 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклобутильное кольцо.

5. Соединение для применения по любому из п.п. 1-4, где каждый X представляет собой O.

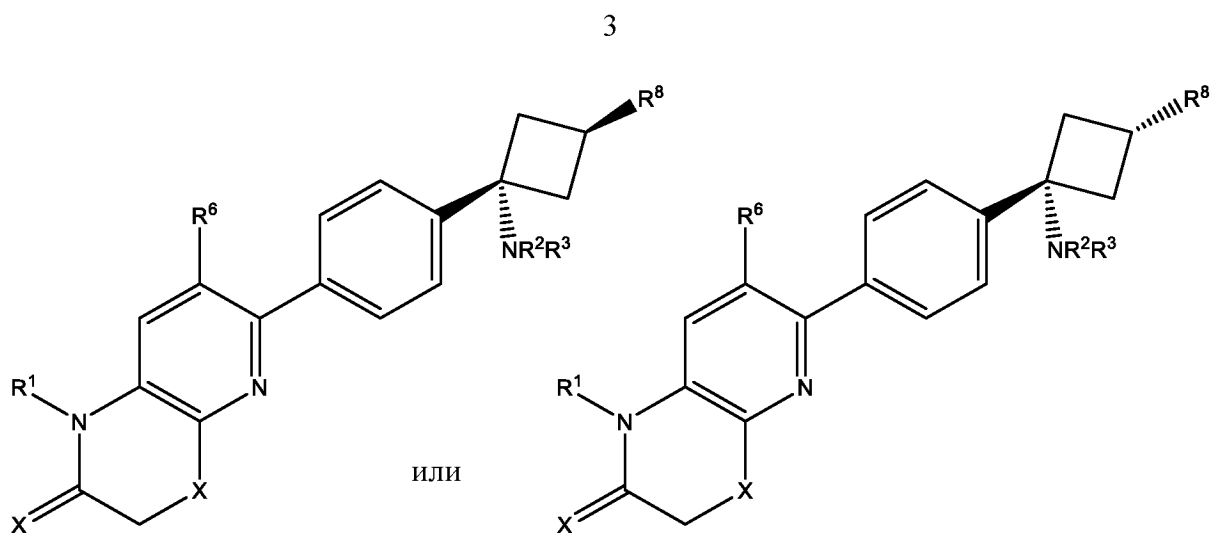
6. Соединение для применения по любому из п.п. 1-5, где R^1 представляет собой C_1 - C_6 алкил.

7. Соединение для применения по п. 6, где R^1 представляет собой метил или этил.

8. Соединение для применения по любому из п.п. 1-7, где R^1 представляет собой $-(CH_2)_nCN$, где n представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5.

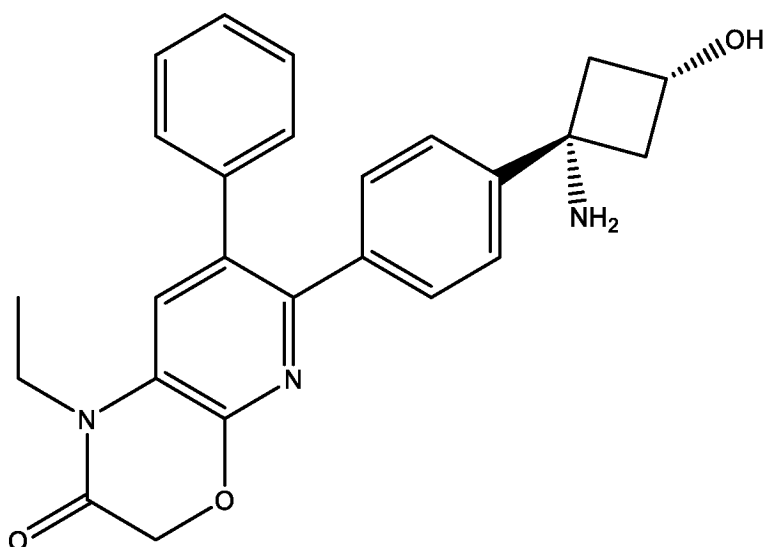
9. Соединение для применения по любому из п.п. 1-8, где каждый из R^2 и R^3 представляет собой водород.

10. Соединение для применения по любому из п.п. 1-9, где соединение формулы (I) представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^8 выбран из -OH, -CN, галогена и C_1 - C_6 алкила.

11. Соединение для применения по любому из п.п. 1-10, где соединение формулы (I) представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

12. Соединение для применения по любому из п.п. 1-11, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль, мезилатную соль или фосфатную соль.

13. Соединение для применения по п. 12, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой тартратную соль.

14. Соединение для применения по п. 13, где тартратная соль представляет собой L-тартратную соль.

15. Соединение для применения по любому из п.п. 1-14, где соединение приготовлено в виде композиции для перорального введения субъекту.

16. Соединение для применения по любому из п.п. 1-15, где субъектом является человек.

17. Соединение для применения по п. 16, где субъектом является взрослый человек.

18. Соединение для применения по п. 17, где соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 20 до 75 мг ежедневно.

19. Соединение для применения по п. 17, где соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 10 до 50 мг ежедневно.

20. Соединение для применения по п. 19, где соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 20 до 40 мг ежедневно.

21. Соединение для применения по п. 20, где соединение формулы (I) вводят субъекту в дозе от 20 до 30 мг ежедневно.

22. Соединение для применения по любому из п.п. 1-21, где лечение НГТ включает уменьшение частоты, продолжительности или интенсивности кровотечения, связанного с НГТ.

23. Соединение для применения по п. 22, где кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение.

24. Соединение для применения по п. 22, где кровотечение, связанное с НГТ, представляет собой носовое кровотечение.

25. Соединение для применения по любому из п.п. 1-24, где лечение НГТ включает повышение уровней гемоглобина у субъекта.

26. Соединение для применения по любому из п.п. 1-25, где лечение НГТ включает уменьшение количества телеангиэктазий у субъекта.

27. Соединение для применения по любому из п.п. 1-26, где лечение НГТ включает уменьшение размера телеангиэктазий у субъекта.

28. Соединение для применения по п. 26 или 27, где телеангиэктазии представляют собой кожные телеангиэктазии.

29. Соединение для применения по п. 26 или 27, где телеангиэктазии представляют собой назальные телеангиэктазии.

30. Соединение для применения по п. 26 или 27, где телеангиэктазии представляют собой телеангиэктазии полости рта.

31. Соединение для применения по п. 26 или 27, где телеангиэктазии представляют собой желудочно-кишечные телеангиэктазии.

32. Соединение для применения по любому из п.п. 1-31, где лечение НГТ включает уменьшение количества артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта.

33. Соединение для применения по любому из п.п. 1-32, где лечение НГТ включает уменьшение размера артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта.

34. Соединение для применения по любому из п.п. 1-33, где лечение НГТ включает предупреждение образования артериовенозных мальформаций (АВМ) у субъекта.

35. Соединение для применения по любому из п.п. 32-34, где артериовенозные мальформации представляют собой легочные АВМ.

36. Соединение для применения по любому из п.п. 32-34, где артериовенозные мальформации представляют собой церебральные (мозговые) АВМ.

37. Соединение для применения по любому из п.п. 32-34, где артериовенозные мальформации представляют собой висцеральные АВМ.

38. Соединение для применения по любому из п.п. 1-37, где лечение НГТ включает уменьшение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

39. Соединение для применения по любому из п.п. 1-38, где лечение НГТ включает предупреждение сердечной недостаточности и легочной артериальной гипертензии (ЛАГ).

40. Соединение для применения по любому из п.п. 1-29, где лечение НГТ включает предупреждение шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ у субъекта.

41. Соединение для применения по любому из п.п. 1-40, где лечение НГТ включает уменьшение степени шунтирования справа налево, вызванного легочной АВМ у субъекта.

42. Соединение для применения по любому из п.п. 1-41, где лечение НГТ включает уменьшение потребности субъекта в железосодержащих добавках.

43. Соединение для применения по любому из п.п. 1-42, где лечение НГТ включает уменьшение количества переливаний крови, необходимых субъекту.

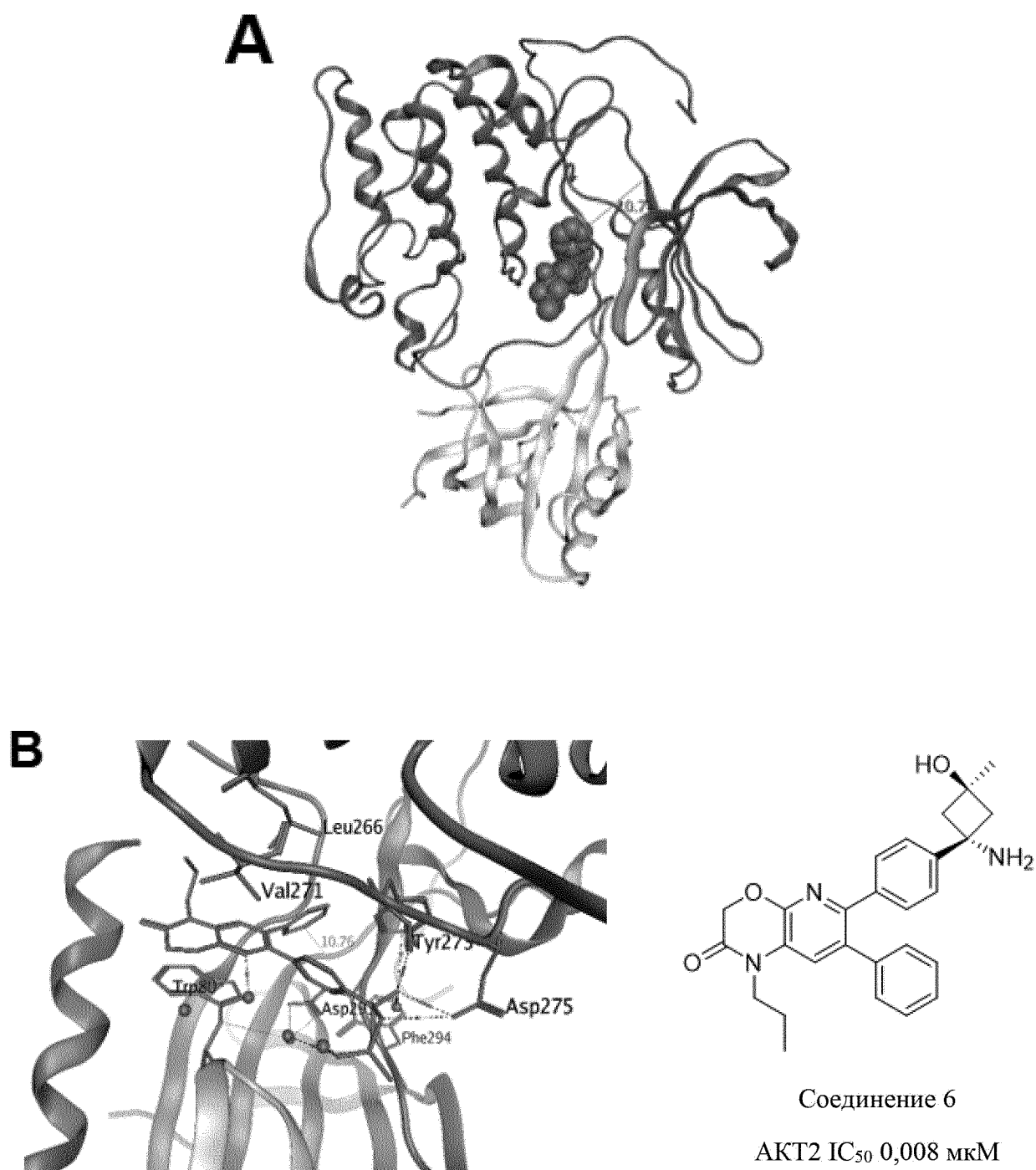
44. Соединение для применения по любому из п.п. 1-43, где лечение НГТ включает уменьшение печеночного кровотока.

45. Соединение для применения по любому из п.п. 1-44, где лечение НГТ уменьшает необходимость трансплантации печени субъекту.

46. Соединение для применения по любому из п.п. 1-45, где лечение НГТ включает уменьшение частоты и/или тяжести дополнительных симптомов НГТ.

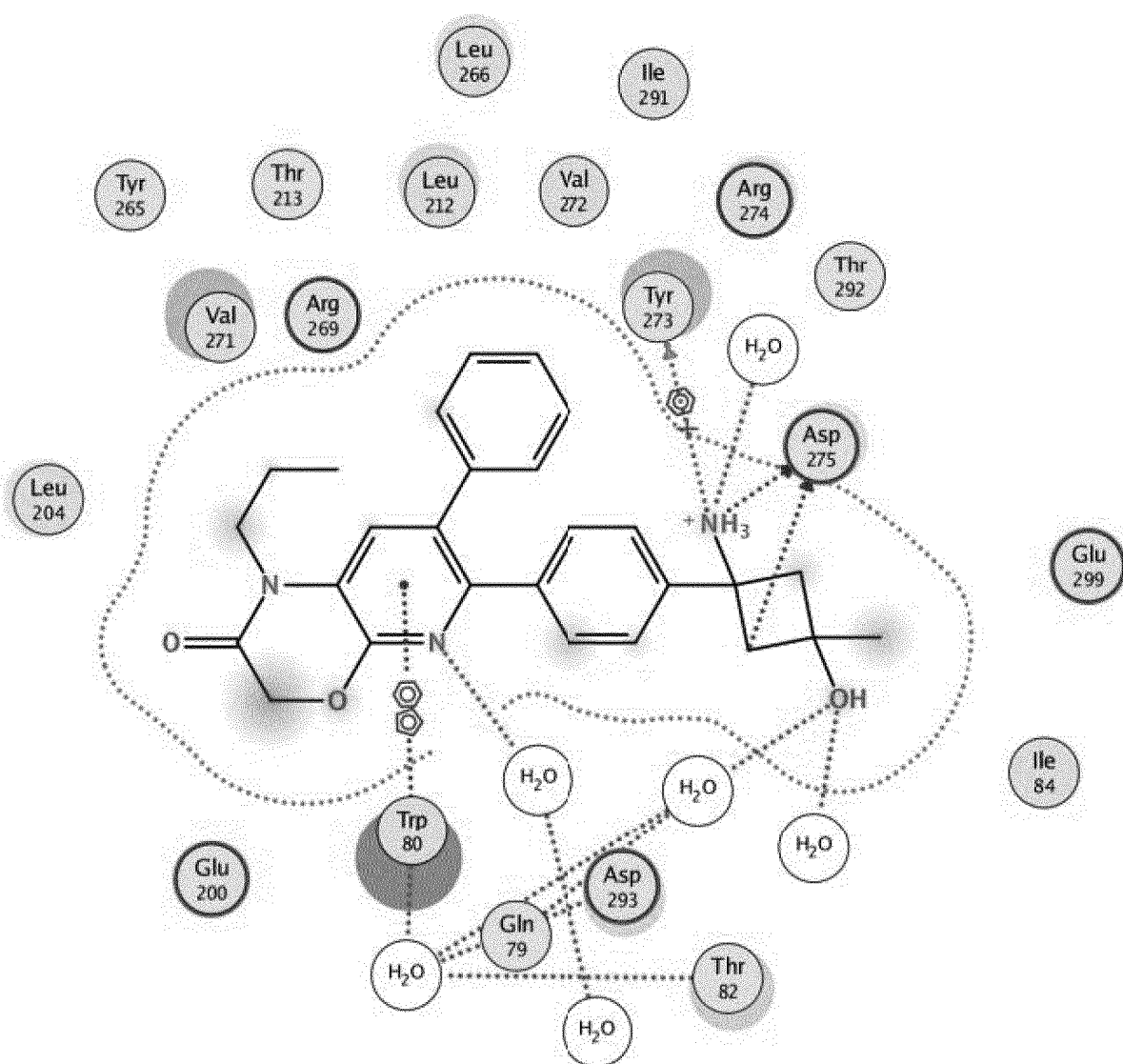
47. Соединение для применения по п. 46, где дополнительные симптомы представляют собой одышку, мигрень, усталость, неврологические события и/или эмболические события.

1/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



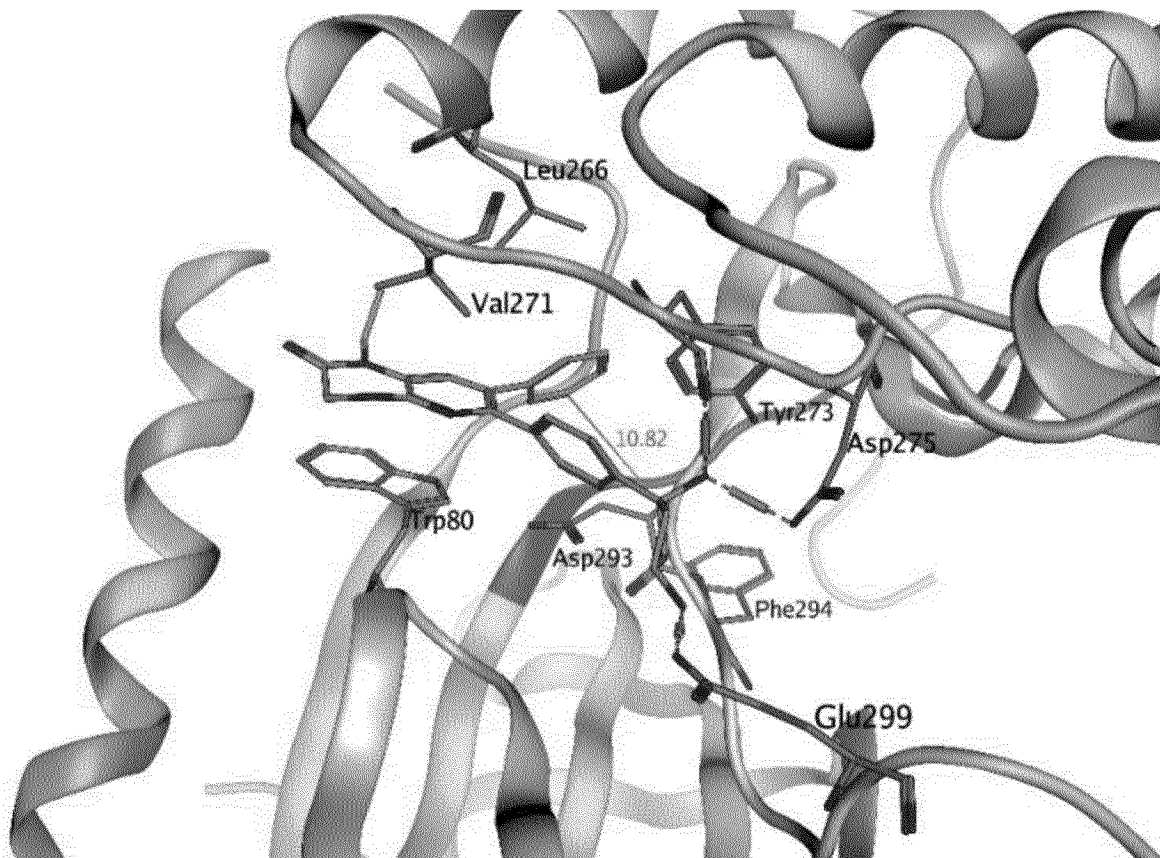
Фиг. 1Аа и 1В

2/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



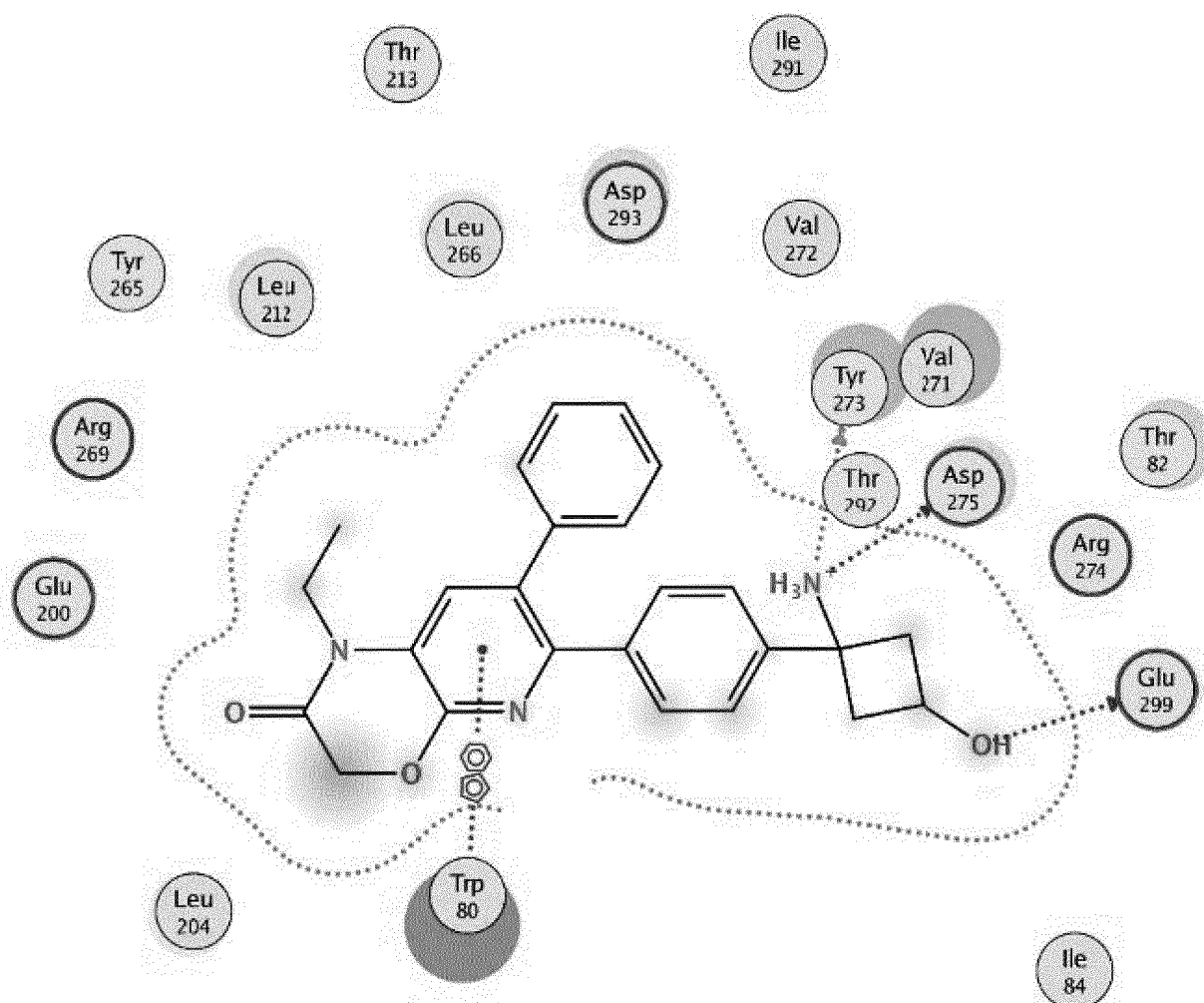
Фиг. 1С

3/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 1D

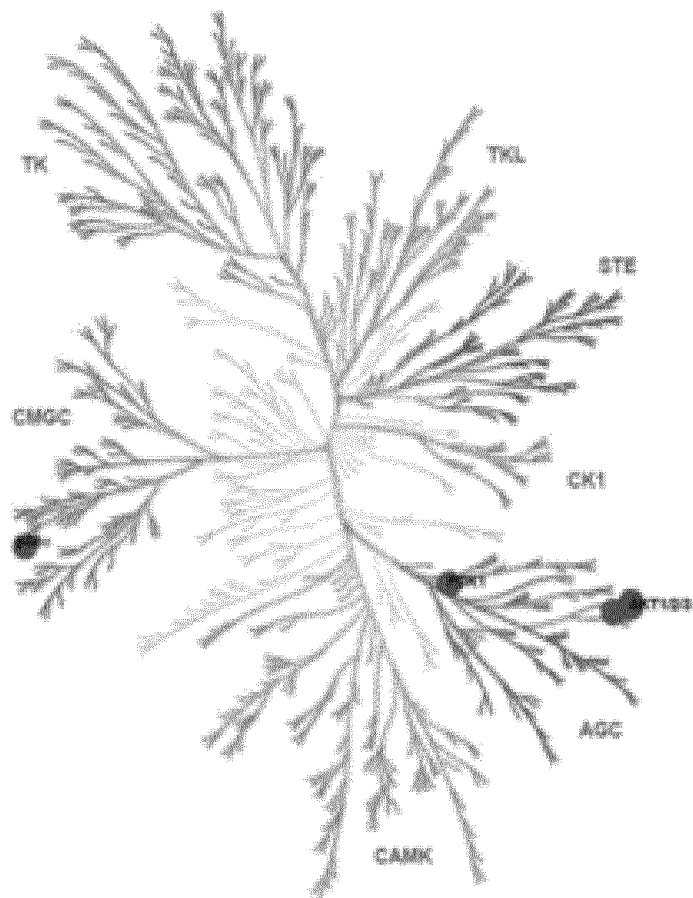
4/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 1Е

5/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

A



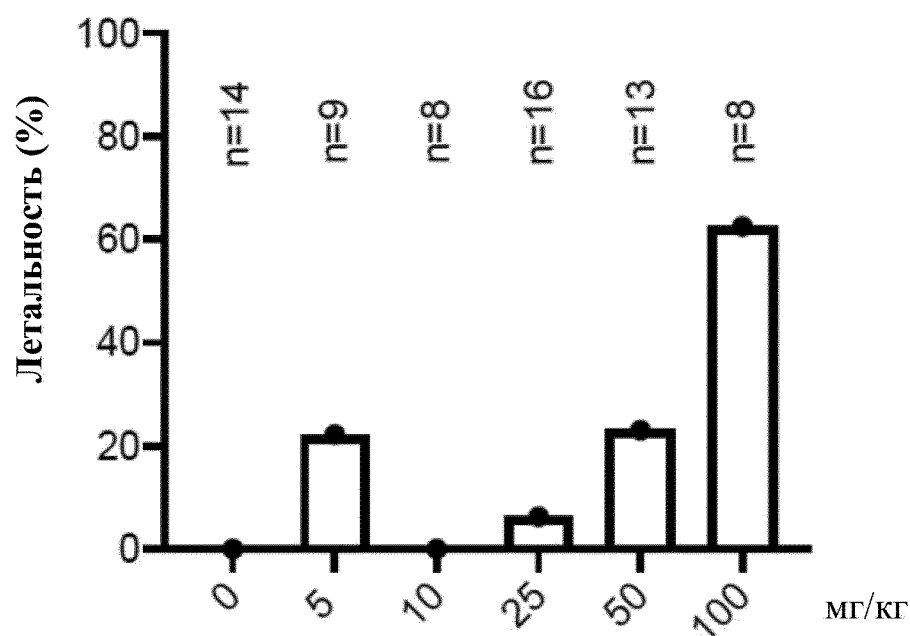
B

Киназа	% ингибирования при 10 мкМ
AKT2	95
AKT1	89
p38 α	84
PDK1	77
AKT3	72

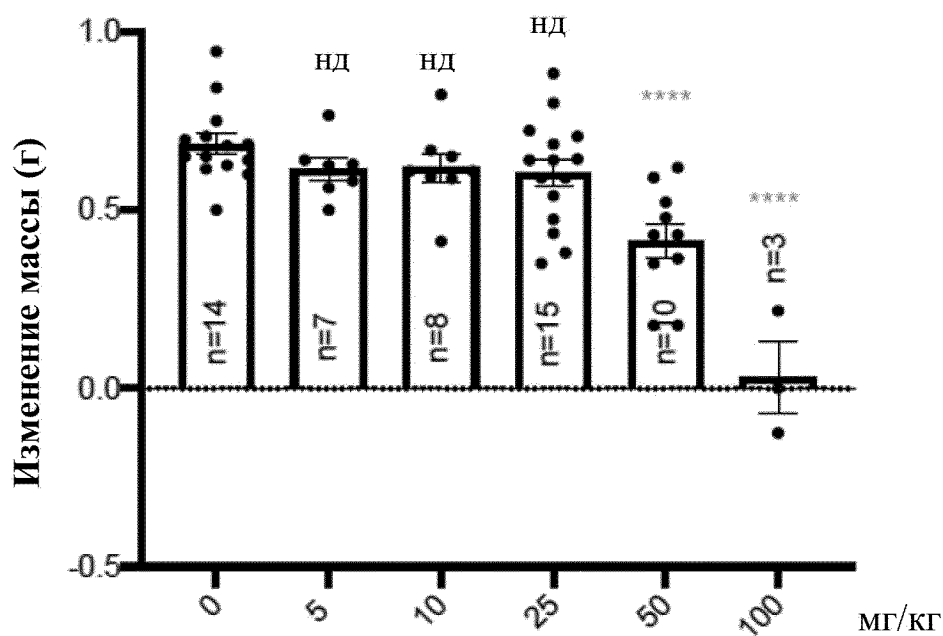
Фиг. 2

6/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

А-



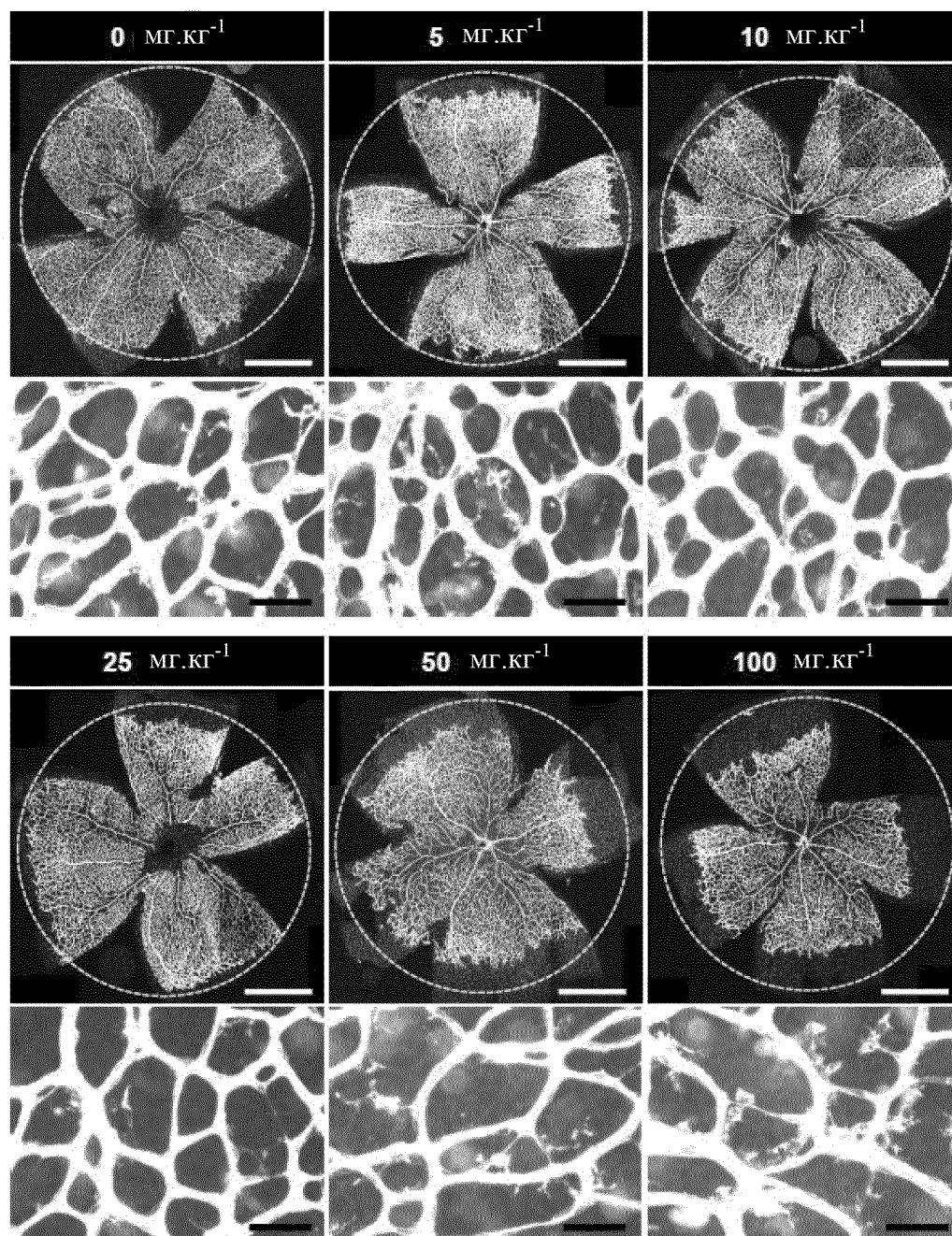
В-



Фиг. 3

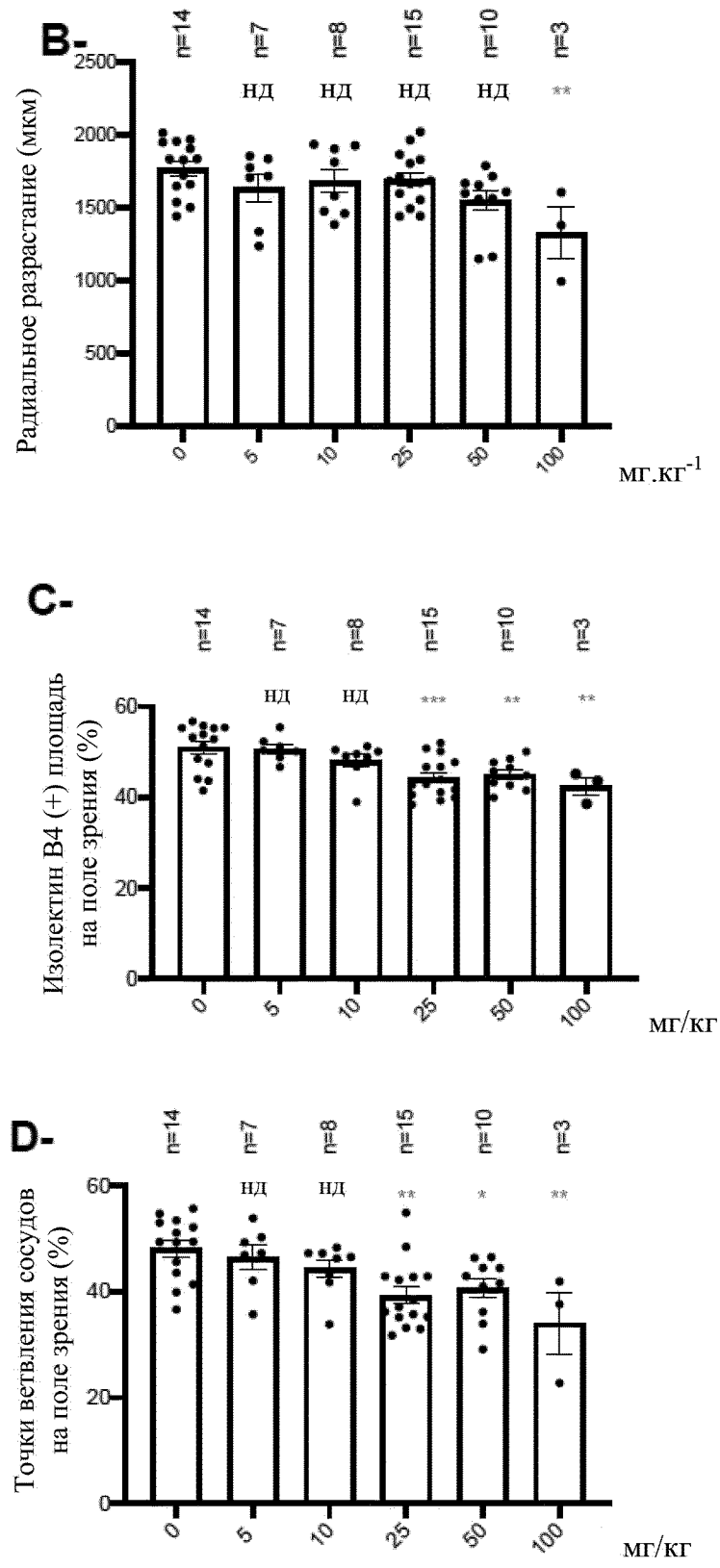
7/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

A-

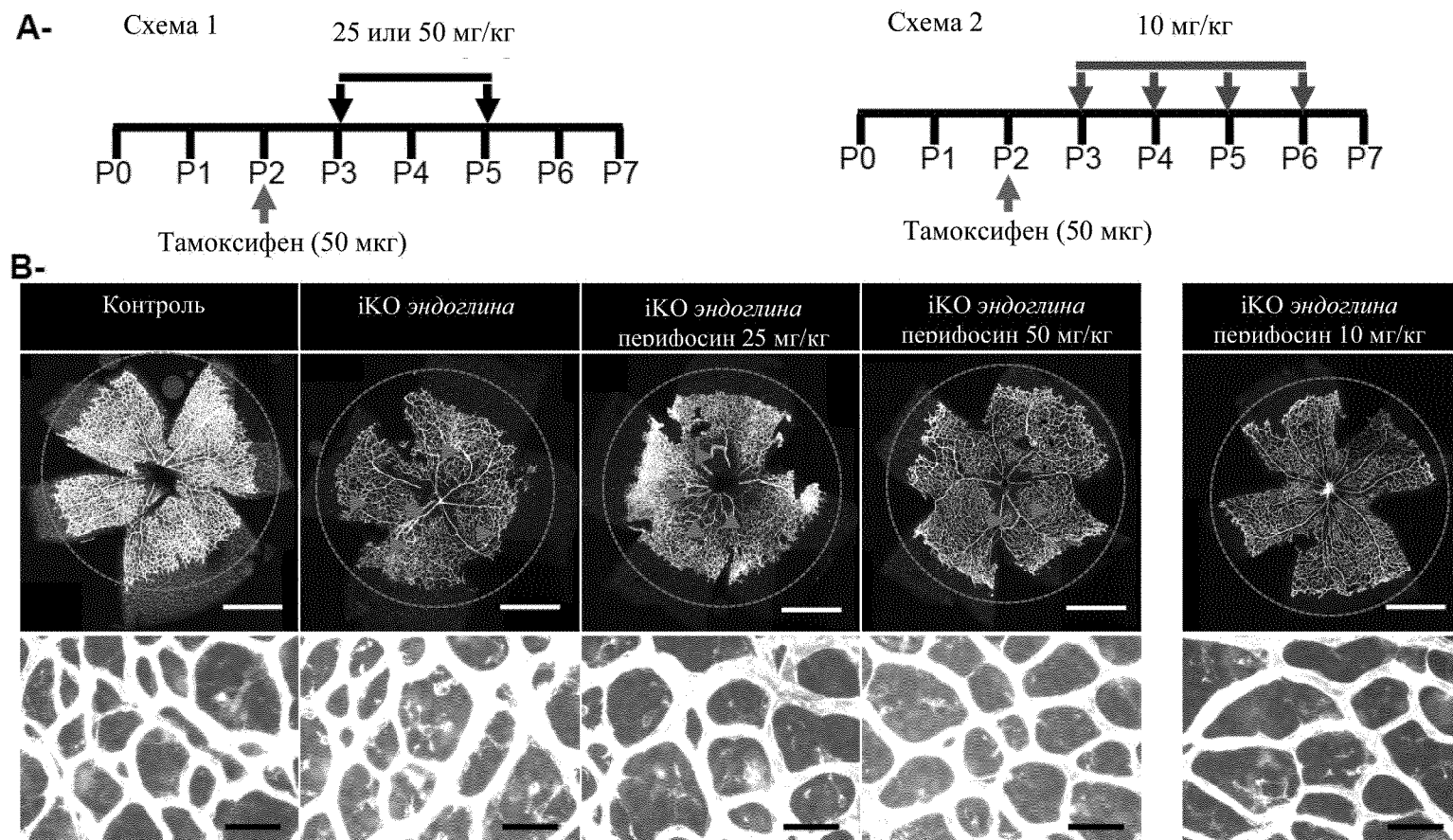


Фиг. 4А

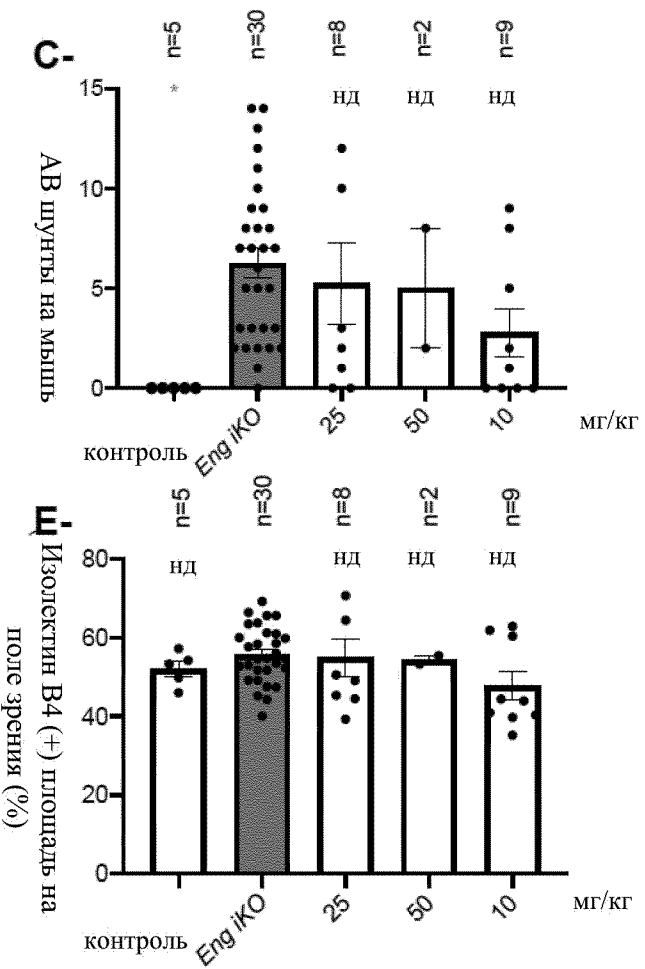
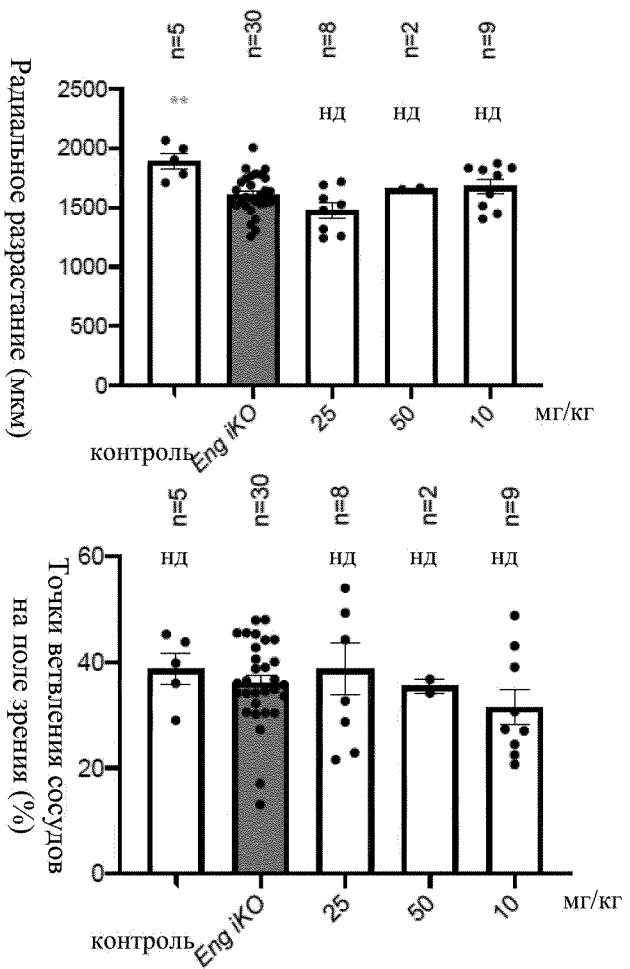
8/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 4В - 4D



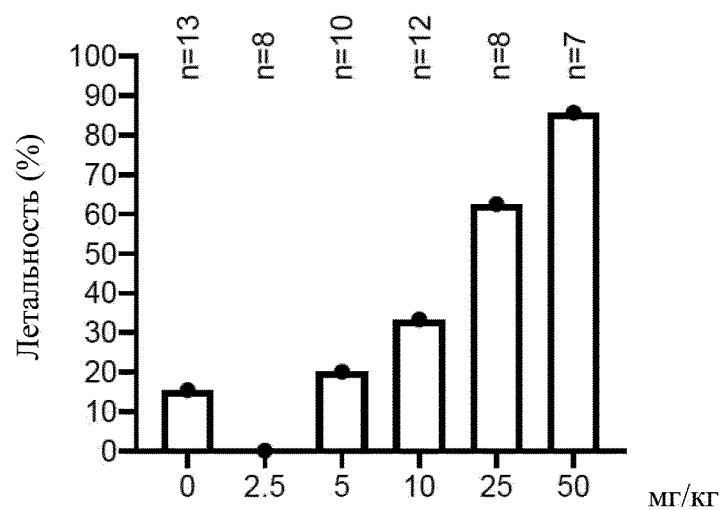
Фиг. 5A - 5B



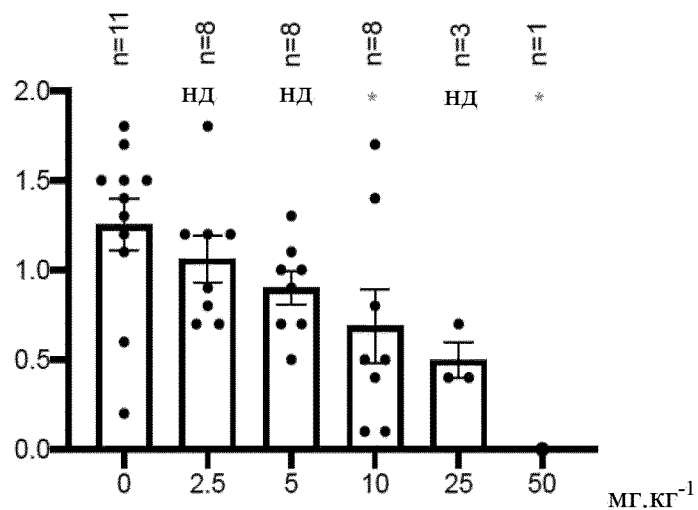
Фиг. 5С - 5Г

11/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

А-

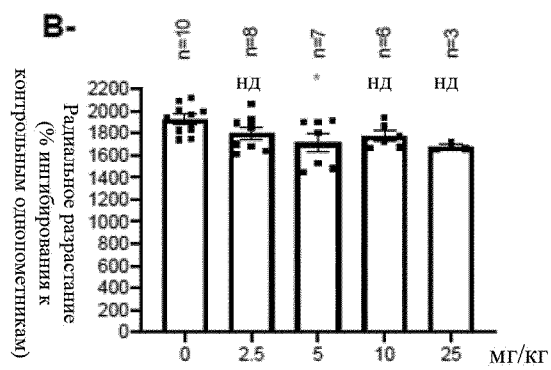
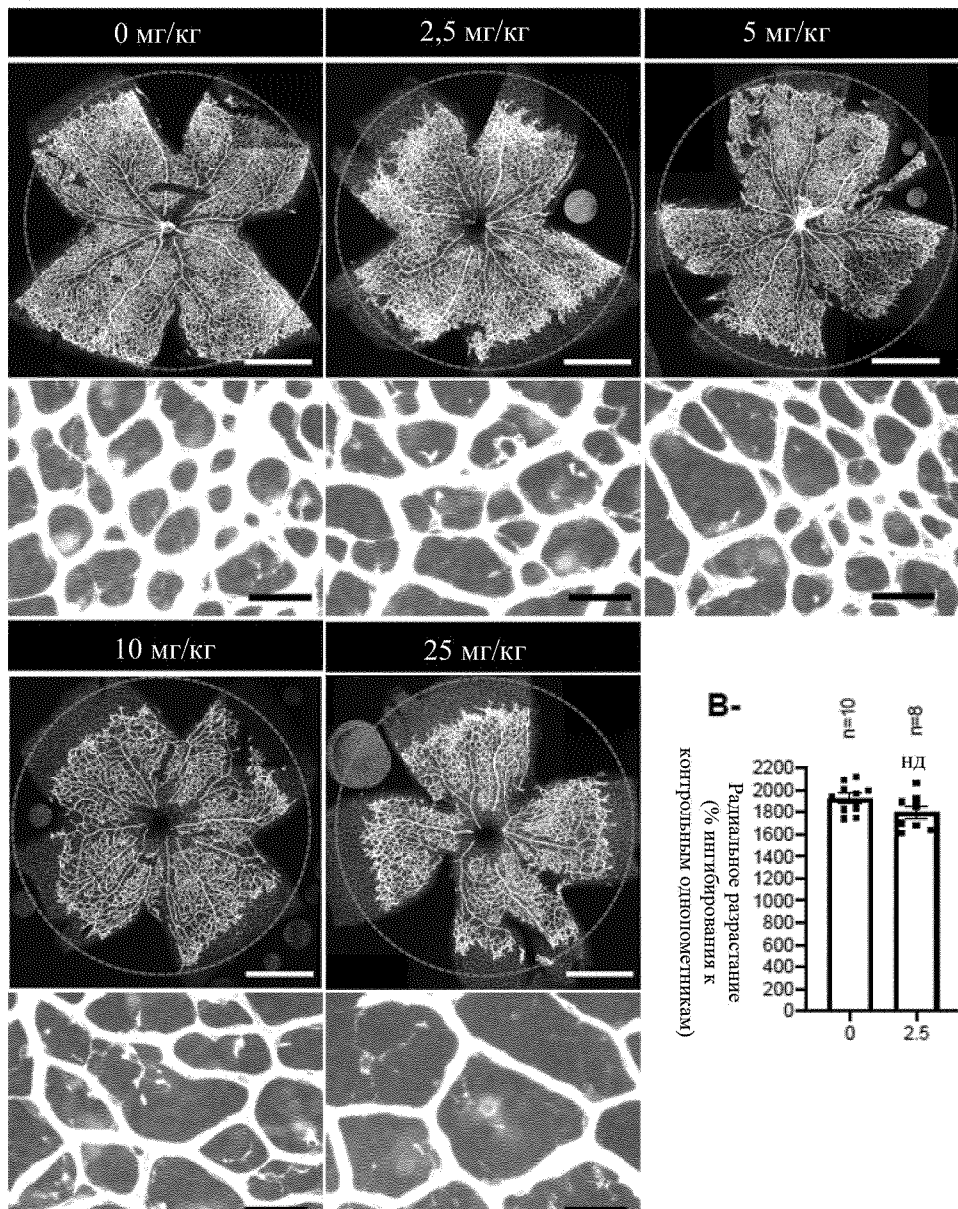


В-

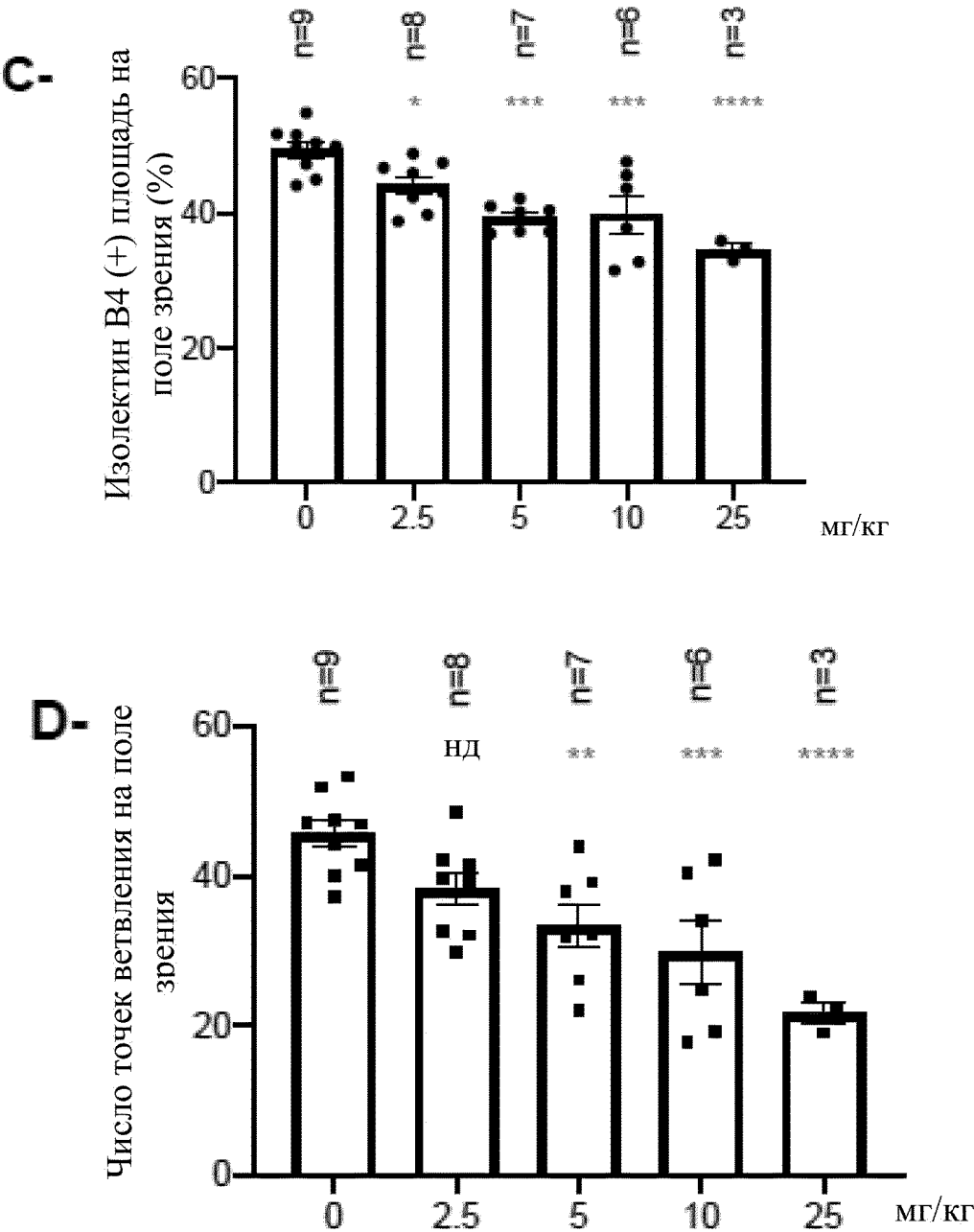


ФИГ. 6

А-



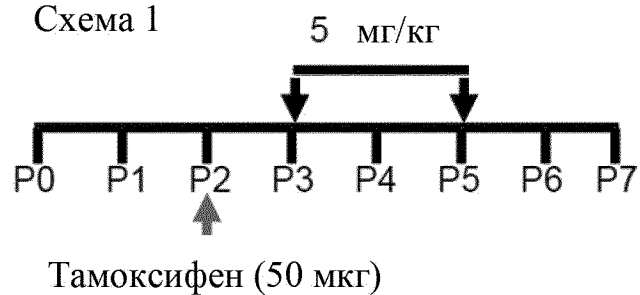
Фиг. 7А - 7В



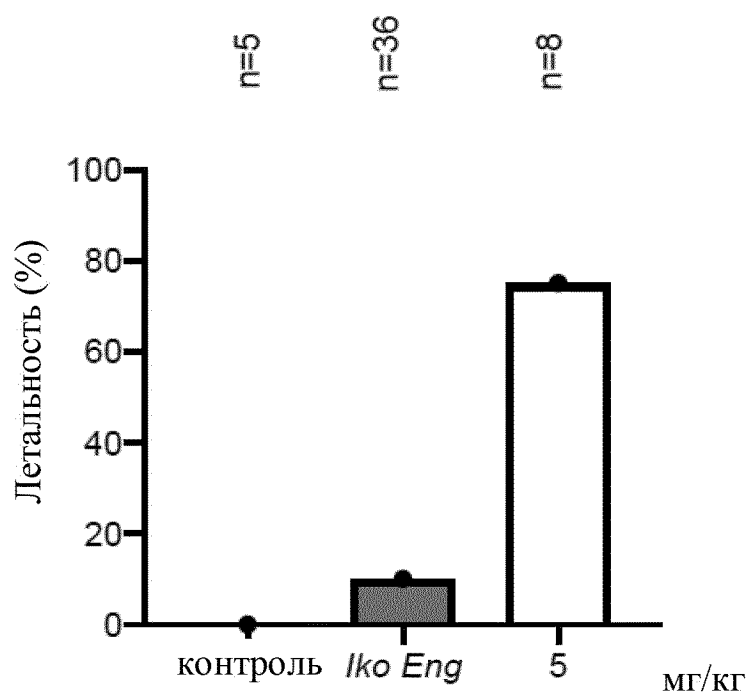
Фиг. 7C - 7D

14/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

A- Схема 1



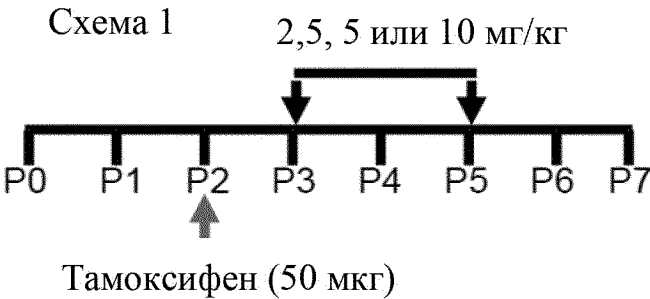
B-



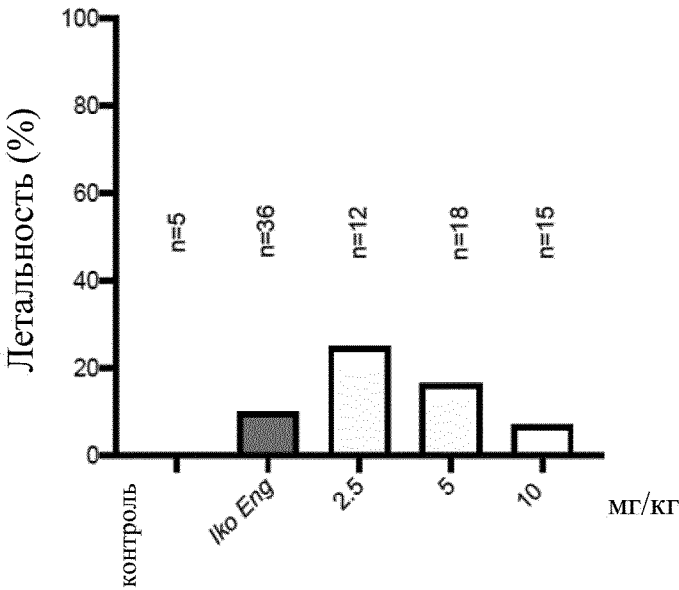
Фиг. 8

15/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

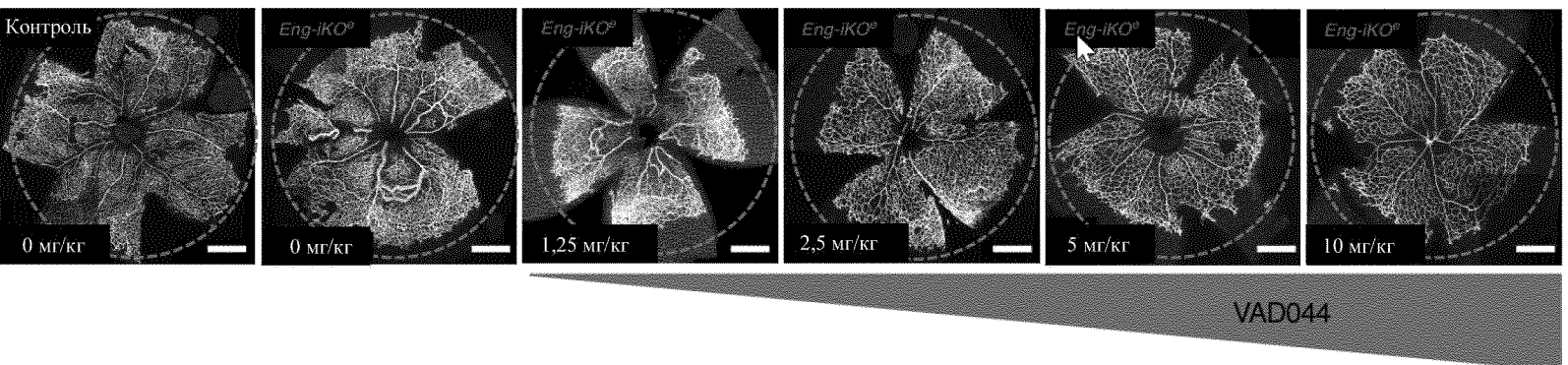
A-



В-

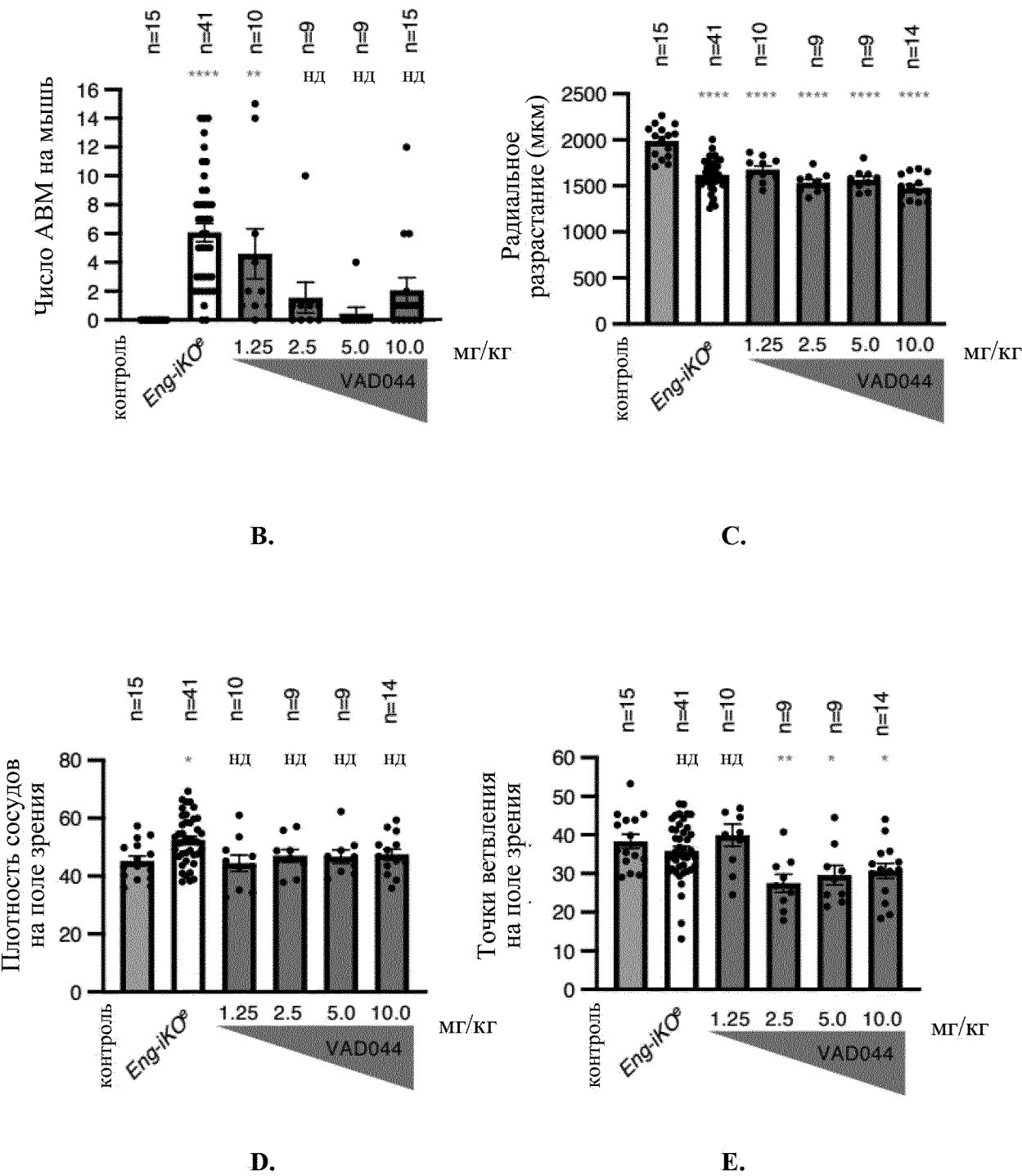


Фиг. 9

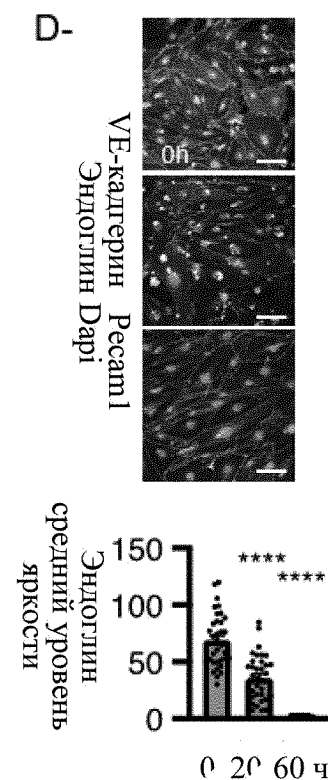
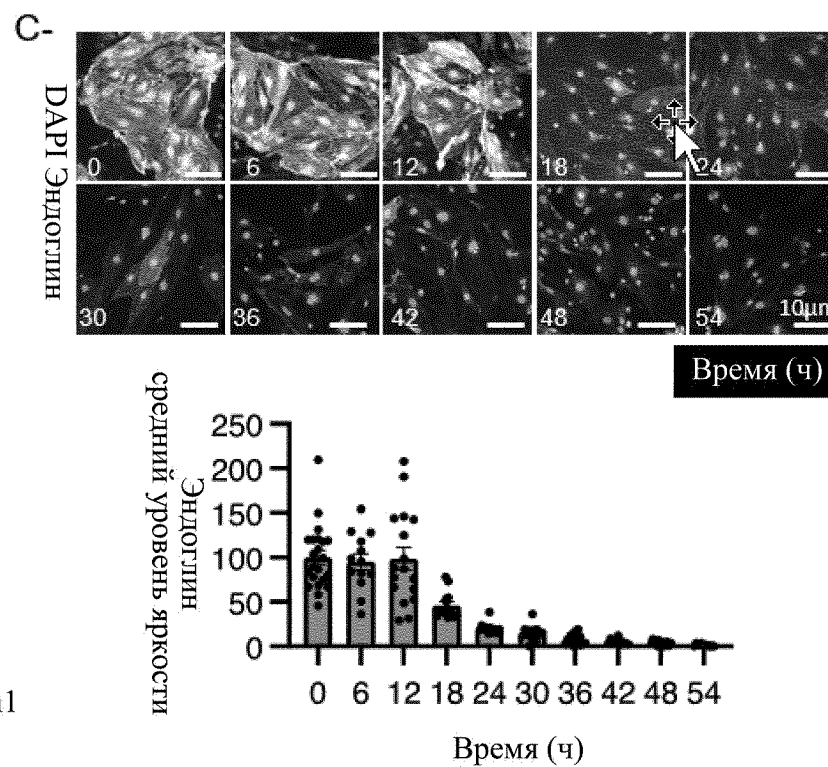
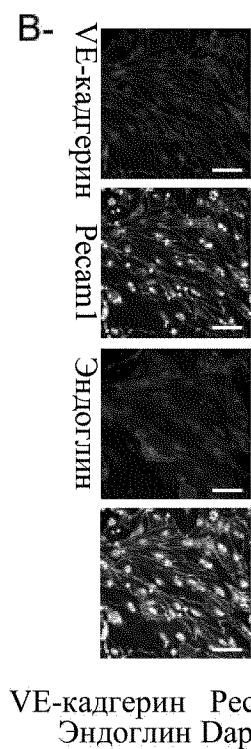
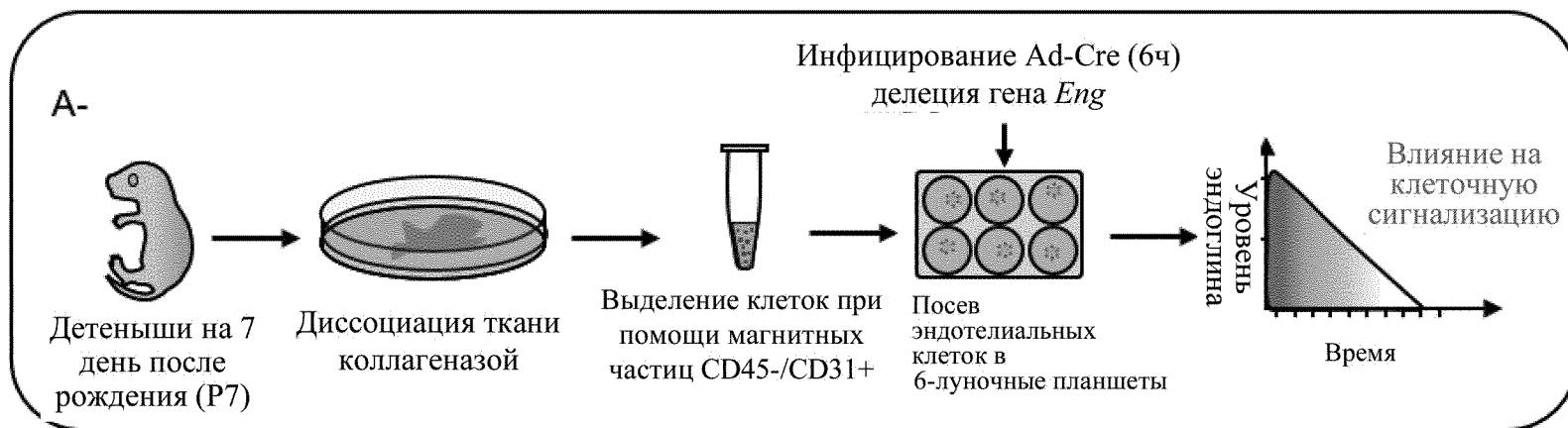


Фиг. 10А

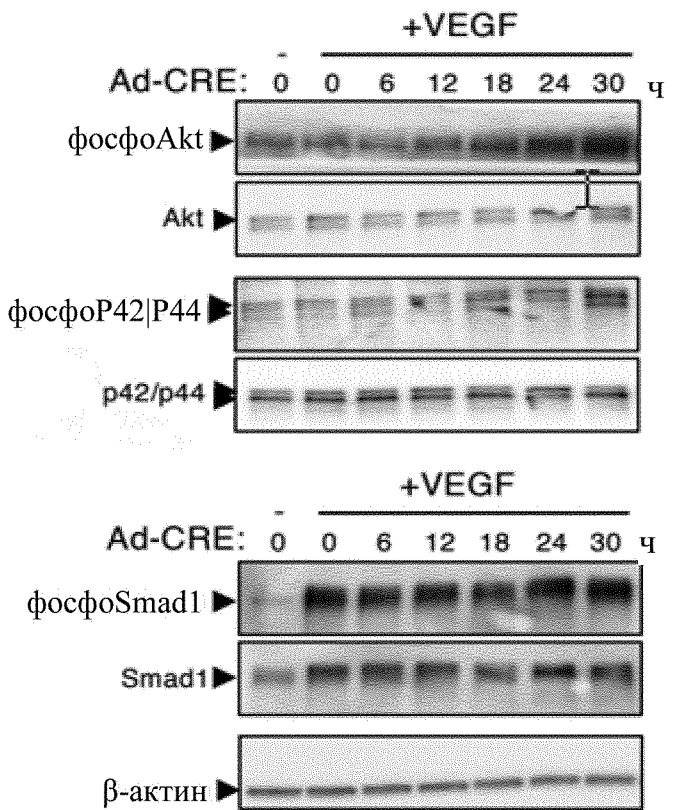
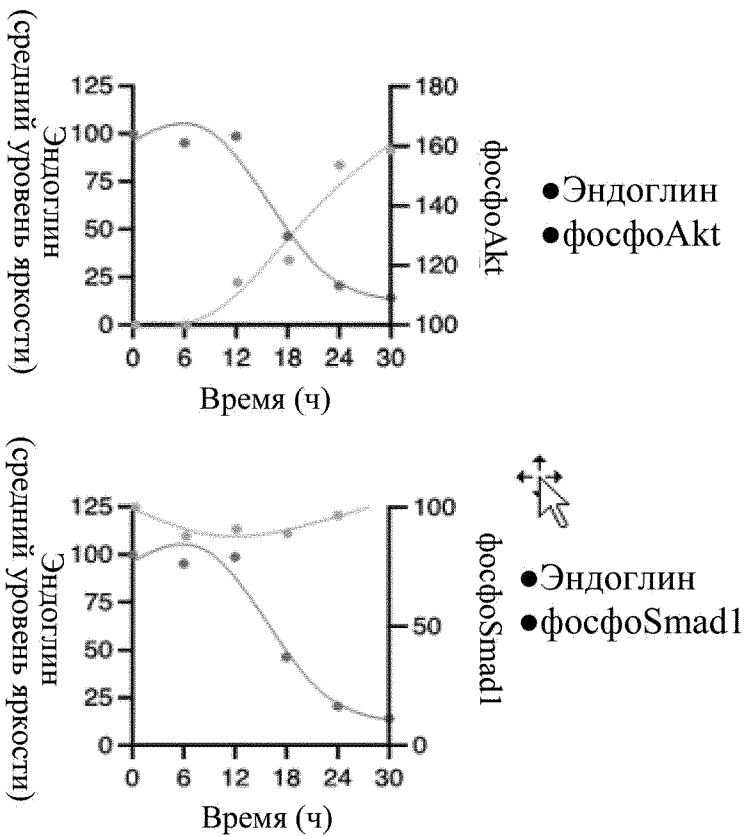
17/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 10В - 10Е

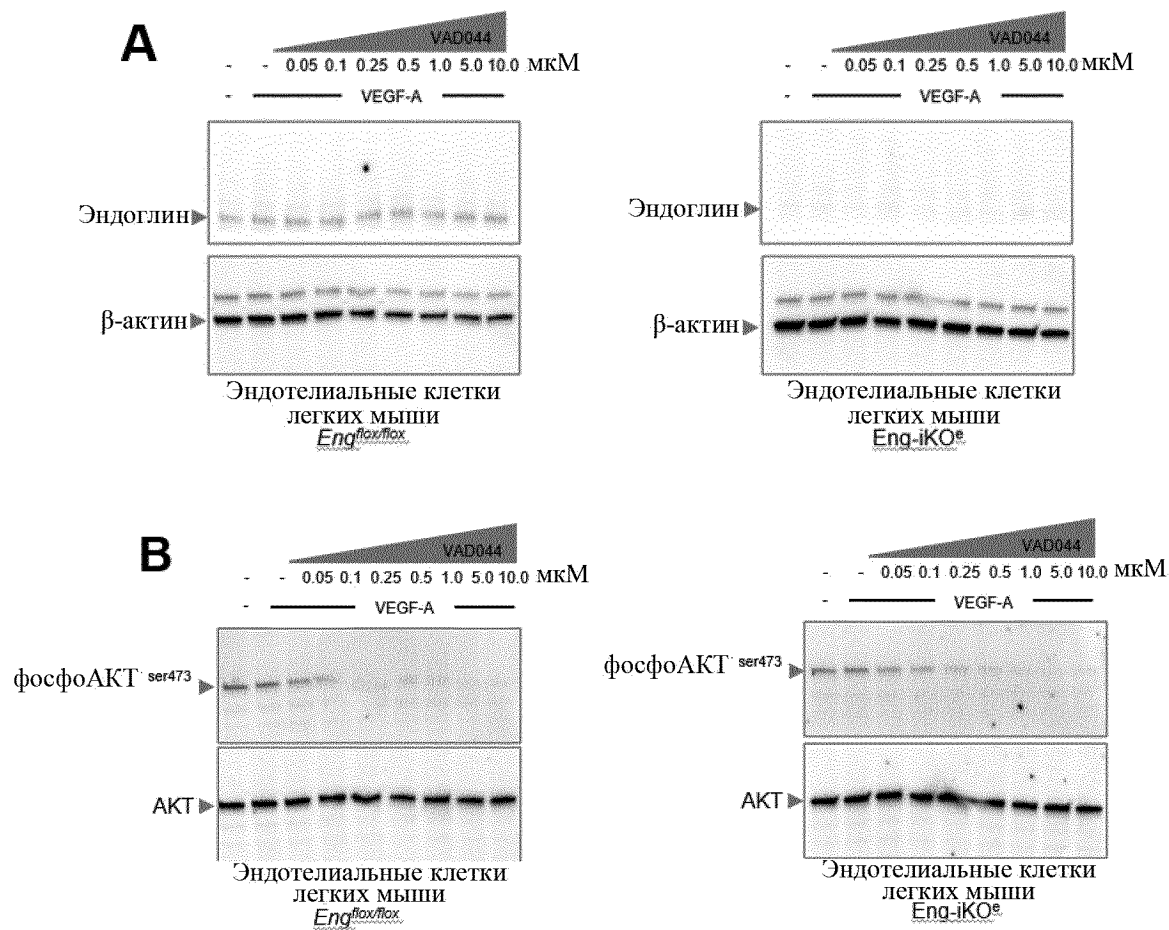


Фиг. 11



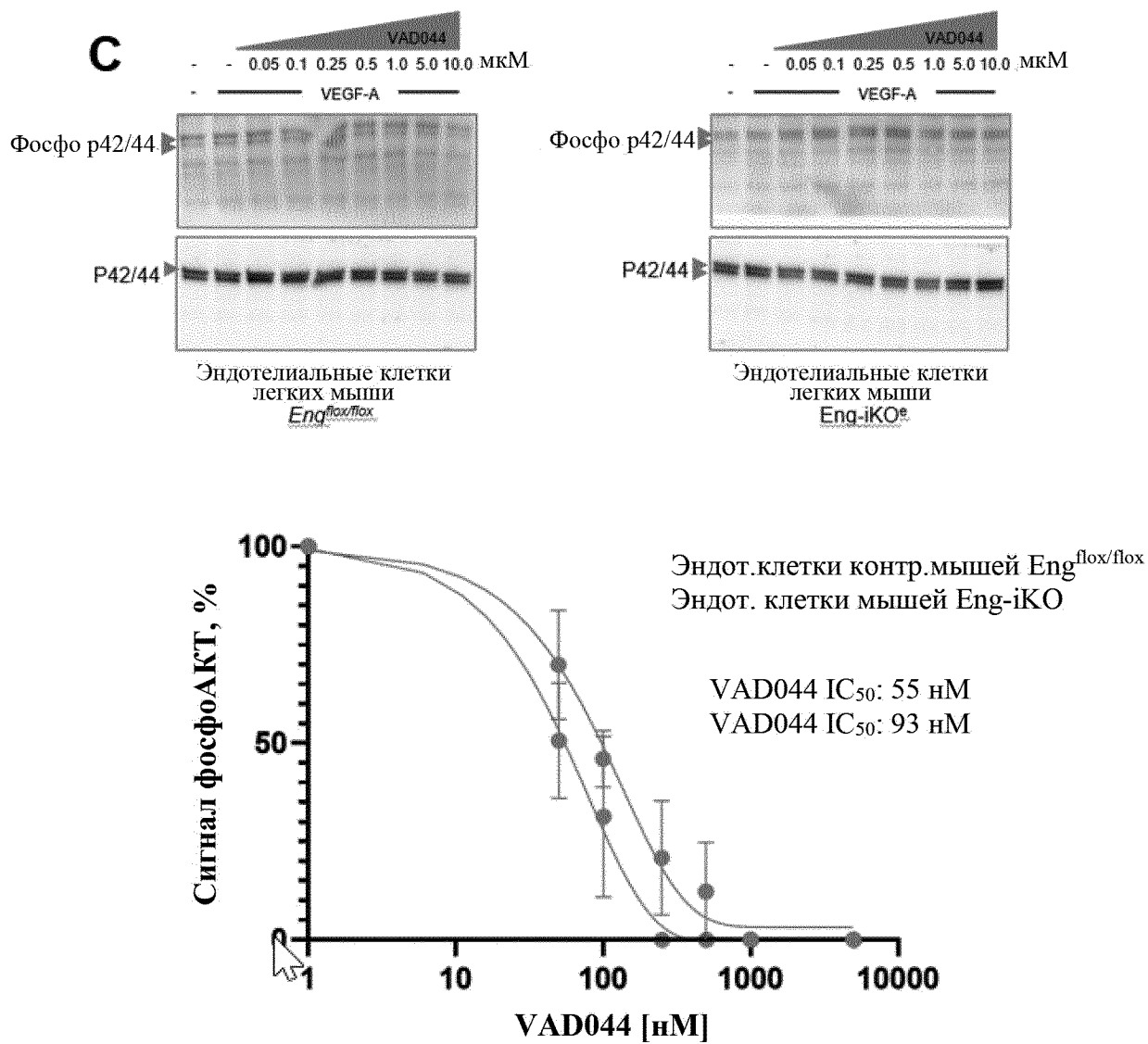
ФИГ. 12

20/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 13

21/21 АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ
АКТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ



Фиг. 13 (продолж.)