

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091524** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.09.16

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. *A61K 31/5025* (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ИНГИБИТОРЫ РЕЦЕПТОРА, АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕАЗОЙ 2**

(31) 2017905084

(32) 2017.12.20

(33) AU

(86) PCT/JP2018/047988

(87) WO 2019/124567 2019.06.27

(71) Заявитель:

**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Аурелио Луиджи, Баннет Найджел,
Флинн Бернард Люк, Джианг Ле (AU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение в основном относится к соединениям, способным ингибировать рецептор, активируемый протеазой 2 (PAR₂), и их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к ингибиторам PAR₂, их получению и применению при лечении заболеваний и расстройств, опосредованных передачей сигнала PAR₂.

A1

202091524

202091524

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 563723EA/026

ИНГИБИТОРЫ РЕЦЕПТОРА, АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕАЗОЙ 2

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к соединениям, способным ингибировать рецептор, активируемый протеазой 2 (PAR₂), и их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к ингибиторам PAR₂, их получению и их применению для лечения заболеваний и расстройств, опосредованных сигнализацией PAR₂.

Предпосылки изобретения

Рецепторы, активируемые протеазами (PAR), включая PAR-1, -2, -3 и -4, представляют собой семейство рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), с уникальным механизмом активации. PAR непосредственно не активируются эндогенными лигандами, а косвенно активируются протеолитическим действием ферментов, таких как тромбин, тканевые факторы, катепсин S, триптаза или трипсин. Обычно протеолитические ферменты отщепляют часть от N-концов PAR, обнажая новые N-концы, которые сворачиваются назад и активируют рецепторы как эндогенные связанные лиганды. Специфические сайты расщепления PAR отличаются по аминокислотной последовательности и, следовательно, распознаются различными ферментами, обеспечивающими селективность активации. Тромбин, например, является активирующим ферментом для PAR₁, тогда как PAR₂ более легко активируется трипсином или триптазой. Было показано, что короткие синтетические пептиды, соответствующие последовательности привязанного лиганда, способны активировать соответствующие PAR, за исключением PAR₃.

PAR₂ широко экспрессируется в различных органах, включая легкие, почки, сердце, печень, кожу, гладкие мышцы и желудочно-кишечный тракт. Присутствие PAR₂ было обнаружено в эпителиальных и эндотелиальных клетках и особенно в воспалительных клетках, таких как T-клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и эозинофилы. Ряд сериновых протеаз хозяина и патогенов, включая трипсин, триптазу тучных клеток, тканевые калликреины, члены коагуляционного каскада TF-FVIIa и FVa-FXa, катепсин S, эластазу, акрозин, НАТ, TMPRSS2, хитиназу, бактериальный гингипаин, Der P1-3, Pen C 13 и тестизин, могут распознавать и обрабатывать N-конец PAR₂. При расщеплении в каноническом сайте (R³⁶S³⁷) вновь обнаженный N-конец действует как привязанный лиганд, индуцирующий активацию PAR₂. Расщепление в неканонических сайтах, например, катепсином S, приводит либо к инактивации PAR₂ либо к снятию маскировки с другого связанного лиганда, что приводит к различным профилям передачи сигналов. Синтетические пептиды, имитирующие каноническую последовательность, такие как SLIGKV-NH₂ или SLIGRL-NH₂, могут избирательно активировать PAR₂ человека с умеренной эффективностью. Эффективность пептидов может быть улучшена путем модификации N-концевого серинового (S) остатка,

ярким примером которого является мощный пептидный агонист 2-флуорил-LIGRLO-NH₂ (2F-агонист).

На сегодняшний день в литературных данных показано, что активация PAR₂ связана с многочисленными физиологическими и патофизиологическими процессами, такими как воспаление, метастазирования опухоли, моторика желудочно-кишечного тракта, боль и зуд. Было показано, что активация PAR₂ в моноцитах и макрофагах приводит к высвобождению воспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL6, IL8 и IL1β (Johansson, U. et al., *Journal of Leukocyte Biology*, 2005, **78**(4): 967-975; Colognato, R. et al., *Blood* 2003, **102**(7): 2645-2652; Steven, R. et al., *Innate Immunity* 2013, **19**(6): 663-672; и Cho, N.-C. et al., *Bioorg Med Chem* 2015, **23**(24): 7717-7727). Кроме того, было показано, что введение агонистов PAR₂ in vivo вызывает воспалительные реакции. В частности, ряд исследовательских групп продемонстрировали, что интраплантарное введение протеаз или синтетических агонистов PAR₂ у грызунов вызывает реакцию отека и механическую гипералгезию, которые значительно снижаются при лечении антагонистами PAR₂ или делецией PAR₂ (например, Lieu, T. et al., *British Journal of Pharmacology* 2016, **173**(18): 2752-2765). Дальнейшие исследования также показали, что PAR₂ может функционировать как медиатор нейрогенного воспаления, ноцицепции и передачи боли (например, Tillu, D.V. et al., *Pain* 2015, **156**(5): 859-867; Zhao, P., et al., *Journal of Biological Chemistry* 2014, **289**(39): 27215-27234). Опять же, лечение с помощью GB88, селективного антагониста PAR₂, приводит к снижению воспалительных и ноцицептивных действий, опосредованных через PAR₂ (Lieu, T., et al., *British Journal of Pharmacology*, 2016, **173**(18): 2752-2765).

Повышенная экспрессия PAR₂ и активация ферментов задействованы в кожных заболеваниях, таких как атопический дерматит (Steinhoff, M. et al., *Journal of Neuroscience* 2003, **23**(15): 6176-6180; Frateschi, S. et al., *Nat Commun.* 2011, **2**: 161). Внутриочаговое применение агонистов PAR₂ вызывало длительные ихтиозы, а трансгенная экспрессия PAR₂ вызывала эпидермальную гиперплазию кожи мыши.α

Экспрессия PAR₂ была идентифицирована в эпителиальных клетках и фибробластах в легких, и, как полагают, она участвует в гомеостазе тканей посредством регуляции последующей транскрипционной активации (Adams, M.N. et al., *Pharmacology & Therapeutics* 2011, **130**(3): 248-282). Кроме того, несколько исследований показали, что активация PAR₂ способствует миграции, инвазии и метастазированию раковых клеток (например, Yau, M.-K., L. Liu, and Fairlie, D.P., *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, **56**(19): 7477-7497; Zeeh, F. et al., *Oncotarget* 2016, **7**(27): 41095-41109; и Yang, L. et al., *Journal of Biological Chemistry* 2015, **290**(44): 26627-26637).

Было показано, что PAR₁ и PAR₂ участвуют в регуляции моторики и секреции желудочно-кишечного тракта в физиологических и патологических условиях. PAR₂, по-видимому, играет двойную роль, поскольку агонисты PAR₂ могут вызывать либо расслабляющие, либо сокращающие эффекты в зависимости от условий экспериментов. Точная роль и механизм PAR₂ в регуляции моторики ЖКТ все еще изучаются. Однако

недавние литературные данные показали, что агонисты PAR₂ могут стимулировать у грызунов сокращение мышц толстой кишки и двенадцатиперстной кишки (Kawabata, A., M. Matsunami, and F. Sekiguchi, *British Journal of Pharmacology* 2008, **153**: S230-S240; Browning, K. N., *Neurogastroenterology and Motility* 2010, **22**(4): 361-365). В цельной мышечной ткани толстой кишки мышцы трипсин, эндогенный активатор PAR₂, вызывает двухфазные реакции: кратковременную гиперполяризацию и расслабление с последующей реполяризацией и возбуждением (Sung, T. S. et al., *Journal of Physiology-London* 2015, **593**(5): 1169-1181).

Результаты многочисленных экспериментов с использованием мышей с дефицитом PAR₂, ингибирования функций антителами или антагонистами, такими как GB88, выявили значительную роль активации PAR₂ в патофизиологии различных заболеваний, включая алиментарное ожирение, воспаление жировой ткани, астму, ревматоидный артрит, периодонтит, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, кожные заболевания, злокачественное новообразование, фиброзные заболевания, метаболическое нарушение, хронические боли и неврологическое заболевание (Adams, M.N. et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2011, **130**(3): 248-282).

Также имеются данные, свидетельствующие о том, что таргетирование передачи сигналов эндосомальным PAR₂ может предложить новые терапевтические методы. Растет осознание того, что рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), которые ранее считались функционирующими главным образом на поверхности клеток, могут продолжать передавать сигналы от эндосом (Murphy, J. E. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**(42): 17615-17622). Хотя передача сигналов GPCR начинается на плазматической мембране, активированные рецепторы ассоциируются с β-аррестинами (βARR), которые опосредуют десенсбилизацию рецепторов и эндоцитоз (DeWire, S. M. et al., *Annu Rev Physiol* 2007, **69**: 483-510). Эти процессы эффективно прекращают передачу сигналов GPCR на плазматической мембране. Обнаружение сигнальных комплексов GPCR в эндосомах и обнаружение того, что нарушение эндоцитоза может подавлять передачу сигналов, позволяет предположить, что GPCR передают сигналы от эндосом (например, May, V. & Parsons, R. L., *J Cell Physiol* 2017, **232**(4): 698-706). GPCR в эндосомах могут генерировать постоянные сигналы в субклеточных компартментах, которые контролируют транскрипцию генов и возбуждение нейронов (Tsvetanova, N. G. & von Zastrow M., *Nat Chem Biol* 2014, **10**(12): 1061-1065). Обнаружено, что эндосомная передача сигналов GPCR регулирует важные физиологические процессы, включая передачу боли (Yarwood, R. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2017, **114**(46): 12309-12314).

Протеазы и PAR₂ участвуют в гиперчувствительности сенсорных нервов в толстой кишке, что может быть причиной хронической боли у пациентов с синдромом раздраженного кишечника (IBS) (Azpiroz, F. et al., *Neurogastroenterol Motil* 2007, **19**(1 Suppl): 62-88). Биопсия слизистой оболочки толстой кишки пациентов с СРК высвобождает протеазы, в том числе триптазу и трипсин-3, которые вызывают PAR₂-зависимую гипервозбудимость ноцицепторов и ноцицепцию толстой кишки у мышей

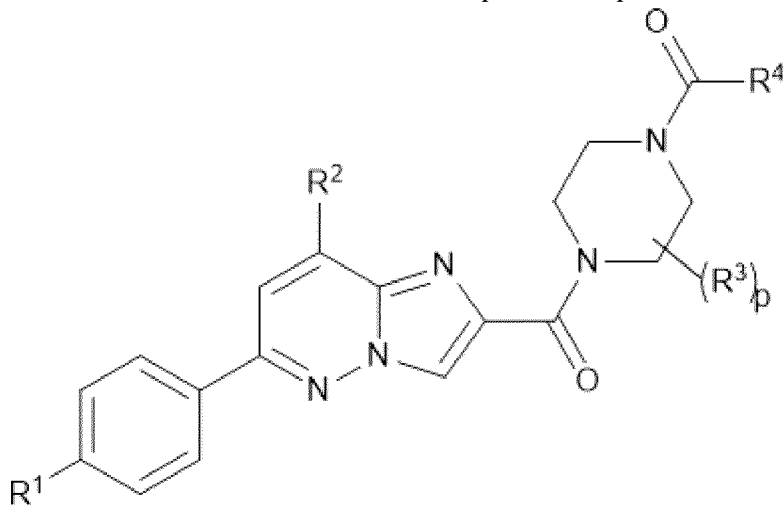
(Barbara, G. et al., *Gastroenterology* 2007, **132**(1): 26-37; Cenac, N. et al., *The Journal of Clinical Investigation* 2007, **117**(3):636-647; и Valdez-Morales, E. E. et al., *Am J Gastroenterol* 2013, **108**(10): 1634-1643). Агонисты PAR₂ вызывают удивительно длительную гипервозбудимость нейронов неизвестными механизмами (Reed, D.E. et al., *J Physiol* 2003, **547**(Pt 2): 531-542).

Следовательно, очевидно, что разработка сильнодействующих и селективных ингибиторов передачи сигналов PAR₂ очень желательна и представляет значительный прогресс в медицине для улучшения лечения воспаления, ноцицепции, моторики желудочно-кишечного тракта, фиброза и раковой инвазии.

Сущность изобретения

Предложены новые соединения, которые могут ингибировать PAR₂. Соединения по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения и профилактики заболеваний и расстройств, опосредованных этим рецептором. Ингибиторы PAR₂, описанные в настоящем документе, содержат фрагмент, который ограничивает их абсорбцию, что делает их пригодными для использования при лечении заболеваний и расстройств желудочно-кишечного тракта, а также для адресной доставки соединения.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R¹ представляет собой H, C₁-C₆ алкил или галоген;

R² представляет собой C₁-C₆ алкил, C₃-C₆ циклоалкил или C₁-C₆ арил, каждый необязательно замещенный от 1 до 3 галогенами;

R³ представляет собой оксо или C₁-C₆ алкил;

p обозначает целое число от 0 до 3;

R⁴ представляет собой -C₁-C₆ алкилS(O)₂OH, -1,2,3-триазол-1-уксусную кислоту, -NHR⁷, -бицикло[2.2.2]октанC(O)OR⁶, -C₄-C₈ циклоалкил-R⁵, 4-6-членную гетероциклическую или гетероарильную группу, замещенную -C₁-C₆ алкил-R⁵, или -(CH₂)₂C(O)NHC₂-C₁₀ алкил, где C₂-C₁₀ алкил замещен от 2 до 10 -NH₂ или -OH;

R⁵ представляет собой -C(O)NHR⁷ или -NHC(O)R⁷;

R⁶ представляет собой H или R⁷;

R^7 представляет собой $-R^8$, $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_1-C_{20}$ алкилC(O)NH₂ или $-C_1-C_{20}$ алкилC(O)NR⁸, где $-C_1-C_{20}$ алкил, $-C_1-C_{20}$ алкилC(O)NH₂ и $-C_1-C_{20}$ алкилC(O)NR⁸ независимо замещены от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$, и где один или несколько атомов углерода в алкильной группе независимо заменены азотом или кислородом;

R^8 представлен формулой:



где

L представляет собой линкерный фрагмент длиной от 1 до 50 нм; и

LA представляет собой липидный якорь, который способствует введению соединения в плазматическую мембрану.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ ингибирования передачи сигналов PAR₂, включающий контактирование рецептора с соединением формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В следующем аспекте в настоящем изобретении предложен способ ингибирования передачи сигналов PAR₂ у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении предложено также соединение формулы (I), определенное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль для профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении медицинского препарата для профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

В настоящем изобретении, кроме того, предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I), определенное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут более понятными для квалифицированного пользователя после прочтения следующего подробного описания в связи с прилагаемыми примерами, фигурами и формулами изобретения.

Краткое описание фигур

Фигура 1: Индуцированная протеазой механическая ноцицепция. **А.** Локализация иммунореактивностей PAR₂ и Na_v1.8 в DRG мышей WT или Par₂-Na_v1.8. Белые стрелки: нейроны, совместно экспрессирующие PAR₂ и Na_v1.8 у мышей WT. Желтые стрелки: нейроны, экспрессирующие Na_v1.8, но не PAR₂ у мышей Par₂-Na_v1.8. **В.** Общее количество и количество трипсин (100 нм)-чувствительных нейронов DRG (<25 мкм) от мышей WT и Par₂-Na_v1.8. **С-Е.** Реакции отмены филаментами фон Фрея у мышей WT и Par₂-Na_v1.8 после интраплантарной инъекции трипсина (**С**, Труп), NE (**Д**) или CS (**Е**). **Ф-К.** Реакции отмены филаментами фон Фрея у мышей WT после интраплантарной инъекции Ду4 или неакт. Ду4 (**Ф-Н**, ингибитор динамина), PS2 или неакт. PS2 (**Ж-К**, ингибитор клатрина) или несущей среды (Veh) с последующим 30 минутами спустя интраплантарным введением трипсина (**Ф**, **И**), NE (**Г**, **Л**) или CS (**Н**, **К**). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001. Числа в скобках обозначают количество мышей (N).

Фигура 1А: Индуцированная протеазой механическая ноцицепция. **А.** Локализация иммунореактивностей PAR₂ и Na_v1.8 в DRG мышей WT или Par₂-Na_v1.8. Белые стрелки: нейроны, совместно экспрессирующие PAR₂ и Na_v1.8 у мышей WT. Желтые стрелки: нейроны, экспрессирующие Na_v1.8, но не PAR₂ у мышей Par₂-Na_v1.8. **В-Д.** Реакции отмены фон Фрея у мышей WT и Par₂-Na_v1.8 после интраплантарной инъекции трипсина (**В**, Труп), NE (**С**) или CS (**Д**). **Е-Г.** Реакции отмены фон Фрея у мышей WT после интраплантарной инъекции Ду4 или неакт. Ду4 (**Е-Г**, ингибитор динамина), PS2 или неакт. PS2 (**Ж-Л**, ингибитор клатрина) или несущей среды (Veh) с последующим 30 минутами спустя интраплантарным введением трипсина (**Е**, **Н**), NE (**Ф**, **И**) или CS (**Г**, **Л**). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001. Числа в скобках обозначают количество мышей (N).

Фигура 2: Индуцированная протеазой гипервозбудимость ноцицепторов. Порог гальванической возбудимости (реобазы) DRG нейронов мышей, предварительно инкубированных с Ду4 (**А**, **В**, **Д**, **Ф**, ингибитор динамина), PS2 (**С**, **Е** и **Г**, ингибитор клатрина) или с контролем в виде несущей среды (Con). Нейроны заражали трипсином (**А-С**), NE (**Д**, **Е**) или CS (**Ф**, **Г**), промывали и спустя 0 или 30 мин определяли порог гальванической возбудимости. **А.** Характерные следы. Rh, реобазы. **В-Г.** Среднее количество ответов. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N).

Фигура 2А: Индуцированная протеазой гипервозбудимость ноцицепторов. Порог гальванической возбудимости DRG нейронов мышей, предварительно инкубированных с Ду4 (**А**, **В**, **Д**, **Ф**, ингибитор динамина), PS2 (**С**, **Е**, **Г**, ингибитор клатрина) или контролем в виде буфера (Con). Нейроны заражали трипсином (**А-С**), NE (**Д**, **Е**) или CS (**Ф**, **Г**), промывали и спустя 0 или 30 мин определяли порог гальванической возбудимости. **А.** Характерные следы. Rh, реобазы. **В-Г.** Среднее количество ответов. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N).

Фигура 3: Механизмы индуцированной протеазой гипервозбудимости ноцицепторов. Порог гальванической возбудимости DRG нейронов мышей,

предварительно инкубированных с I-343 (**A-D**, PAR₂ антагонист), PD98059 (**E**, MEK1 ингибитор) или GF109203X (**F**, GFX, PKC ингибитор). Нейроны заражали трипсином (**A**, **E** и **F**, Труп), NE (**B**, **D**) или CS (**C**), промывали и спустя 0 или 30 мин определяли порог гальванической возбудимости. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N).

Фигура 4: Эндоцитоз PAR₂, рекрутирование βARR2 и компартиментализированная передача сигналов в ноцицепторах. А-С. Эндоцитоз. А. Репрезентативные изображения (число экспериментов n=3) влияния трипсина (Труп) на распределение mPAR₂-GFP в DRG нейронах мышей. Стрелки (**A**, слева) показывают PAR₂-GFP в эндосомах. **B**, **C**. Соотношение цитозоль/плазматическая мембрана mPAR₂-GFP в DRG нейронах мышей после 30 минут инкубации с трипсином, NE или CS (**B**), после предварительной инкубации с Ду4 или неакт. Ду4 и затем с трипсином (**C**). **D.** PAR₂-RLuc8/βARR2-YFP BRET в DRG нейронах мышей, подвергнутых воздействию трипсина, NE или CS. AUC, площадь под кривой (25 мин) *P<0,05 для контроля. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения. **E-J.** Компартиментализированная передача сигналов. Влияние трипсина на активность PKC на плазматической мембране (**E** и **F**) и в цитозоле (**G**) и на активность ERK в цитозоле (**H** и **I**) и ядре (**J**) DRG нейронов крыс: индуцированная трипсином активация PKC на плазматической мембране (**E**, **F**) но не цитозоле (**G**), и ERK в цитозоле (**H**, **I**) и ядре (**J**) DRG нейронов крыс. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N). *P<0,05, **P<0,01 по сравнению с несущей средой.

Фигура 5: Эндоцитоз PAR₂ и компартиментализированная передача сигналов ERK в клетках HEK293. А-D. BRET анализы эндоцитоза. PAR₂-RLuc8/RIT-Venus BRET (A, C) и PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (B, D). E-K. FRET анализы цитозольной (E, G, H, J) и ядерной (F, G, I, K) активности ERK. AUC, площадь под кривой. *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,00001 по сравнению с одним трипсином. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения.**

Фигура 6: Гипервозбудимость ноцицепторов, индуцированная IBS-D. А-D. Порог гальванической возбудимости ноцицепторов мышей через 30 мин после воздействия супернатанта из биопсий слизистой оболочки толстой кишки от субъектов HC и IBS-D. А. Характерные следы нейронов, обработанных несущей средой или I-343. **B-D.** Среднее количество ответов нейронов, предварительно инкубированных с I-343 (**B**, антагонист PAR₂), Ду4 (**C**, ингибитор динамина) или PD98059 (**D**, ингибитор MEK1). **E.** PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET в клетках HEK293, измеренные после 60-минутной инкубации с супернатантом биопсии HC или IBS-D, или трипсином. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001; нз, незначимый. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N).

Фигура 7: Таргетирование PAR₂ в эндосомах ноцицепторов. Репрезентативные изображения (из трех экспериментов) переноса трехчастных зондов Су5 и mPAR₂-GFP в сому (A) и нейриты (B) DRG нейронов мышей. Масштабная шкала (5 мкм) в изображении светлого поля применяется ко всем панелям в одном ряду, кроме вставки, которая

является увеличением пунктирной рамки в панелях слияния. Стрелки показывают близость к везикулам, содержащим mPAR₂-GFP и Cy5-Chol.

Фигура 8: Антагонизм эндосомального PAR₂ и гипервозбудимость ноцицепторов.
А, В. Гипервозбудимость, индуцированная трипсином, DRG нейронов мышей. Нейроны предварительно инкубировали с соединением **10** или несущей средой (контроль, con) в течение 60 мин, промывали и восстанавливали в течение 170 или 140 мин. Затем нейроны подвергали воздействию трипсина (10 мин). Порог гальванической возбудимости измеряли через 0 или 30 мин после трипсина и 180 мин после соединения **10**. **С.** Гипервозбудимость, индуцированная IBS, DRG нейронов мышей. Нейроны предварительно инкубировали с соединением **10** или несущей средой (контроль, con) в течение 60 мин, промывали и восстанавливали в течение 60 мин. Затем нейроны подвергали воздействию супернатанта НС или IBS-D в течение 30 мин, промывали и определяли порог гальванической возбудимости через 30 мин (Т 30 мин), через 120 мин после соединения **10**. *P<0,05, **P<0,01. Числа в столбцах обозначают количество нейронов (N).

Фигура 9: Сенсбилизация афферентов толстой кишки и ноцицепция толстой кишки. **А-Н.** Механосенсорные ответы у здоровых контрольных мышей на стимуляцию слизистой оболочки толстой кишки 2 г VFF в базальных условиях и после воздействия рецептивных полей на трипсин (**А, В, и Е-Н, Tryp**), NE (**С и Е**) или CS (**Д и Е**). **А.** Репрезентативные результаты. **В-Д и F-Н.** Среднее количество ответов. **Е.** Ответы в процентах от базальных. Числа в столбцах обозначают количество афферентов. **И и J.** VMR на CRD у здоровых нормальных мышей. Цифры в скобках обозначают число мышей. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Фигура 10: Механизмы гипервозбудимости ноцицепторов, индуцированной протеазой и PAR₂. После активации каноническими механизмами PAR₂ подает сигнал на плазматической мембране активировать РКС, что опосредует начальную гипервозбудимость (**1**). PAR₂ затем подвергается клатрин-, динамин- и βARR-зависимому эндоцитозу (**2**). PAR₂ продолжает передавать сигналы от эндосом с помощью βARR- и Gαq-опосредованных механизмов, чтобы активировать ERK, который опосредует постоянную гипервозбудимость. После активации с помощью объективных механизмов PAR₂ подает сигнал от плазматической мембраны, чтобы активировать аденилатциклазу (AC) и PKA, которые опосредуют начальную и постоянную гипервозбудимость (**3**). Киназы могут регулировать активность TRP-каналов и потенциал-управляемых ионных каналов, чтобы контролировать гипервозбудимость ноцицепторов (**4**).

Фигура 11: Экспрессия функционального PAR₂ в DRG нейронах и PAR₂-зависимое воспаление. **А, В.** Характерные следы воздействия трипсина (100 нМ) на [Ca²⁺]_i в DRG нейронах от мышей WT (**А**) и Par₂-Na_v1.8 (**В**). Показаны следы от 25 нейронов; следы от чувствительных к трипсину нейронов показаны красным цветом. У мышей WT 20/65 (31%) нейронов ответили на трипсин. У мышей Par₂-Na_v1.8 3/51 (6%) нейронов ответили на трипсин. Нейроны были собраны от 4 мышей на группу. **С.** Влияние интраплантарной

инъекции трипсина на толщину лапы мышей WT и Par₂-Nav1.8. ***P<0,001, ****P<0,0001. Числа в скобках обозначают количество мышей. **D.** Влияние интраплантарной инъекции трипсина на инфильтрацию нейтрофилов через 4 ч в лапу мышей WT и Par₂-Nav1.8. Стрелки показывают приток нейтрофилов у мышей WT.

Фигура 12: Индуцированная протеазой механическая ноцицепция и отек. **A, B.** Реакция отмены VFF контралатеральной (правой) лапы после интраплантарных инъекций в ипсилатеральную (левую) лапу Du4 или неакт. Du4 (**A**), PS2 или неакт. PS2 (**B**) или несущей среды (Veh), затем NE. **C-H.** Толщина ипсилатеральной лапы. Du4 или неакт. Du4 (**C, E, G**), PS2 или неакт. PS2 (д, **F, H**) или несущую среду (Veh) вводили путем интраплантарной инъекции в лапу мыши. Через 30 мин вводили трипсин (Tryp) (**C, D**), NE (**E, F**) или CS (**G, H**). Измеряли толщину лап (отек). Числа в скобках обозначают количество мышей.

Фигура 13: Ингибиторы эндочитов и исходная гипервозбудимость ноцицепторов. Порог гальванической возбудимости DRG нейронов мышей, предварительно инкубированных с контролем в виде буфера (Con), несущей среды (Veh, 0,3% ДМСО), Du4 (**A**) или PS2 (**B**). Порог гальванической возбудимости определяли при T 0 мин или T 30 мин после промывания. Числа в столбцах обозначают количество нейронов.

Фигура 14: Характеристика антагониста PAR₂ I-343. **A.** Структура I-343. **B-D.** Анализ концентрация-ответ эффектов I-343 на 2F- и трипсин-индуцированное накопление IP1 в клетках HT-29 (**B**), HEK293 (**C**) и KNRK-hPAR2 (**D**). **E.** Влияние I-343 на АТР-индуцированное накопление IP1 в клетках HEK. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения.

Фигура 15: Трипсин- и тромбин-индуцированная гипервозбудимость ноцицепторов. Порог гальванической возбудимости DRG нейронов мышей, предварительно инкубированных с I-343 (**A**, антагонист PAR₂) или SCH79797 (**B, C**, антагонист PAR₁). Нейроны заражали трипсином (**A, C**) или тромбином (**B**), промывали и определяли порог гальванической возбудимости через 0 мин. *P<0,05, **P<0,01. Числа в столбцах обозначают количество нейронов.

Фигура 16: PAR₂ эндочитоз в клетках HEK293. PAR₂-RLuc8/RIT-Venus BRET (**A, B, E, G**) и PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (**C, D, F, H**) в клетках HEK293. n, экспериментальная копия, тройные наблюдения.

Фигура 17: PAR₂-компартиментализированная передача сигналов ERK в клетках HEK293. FRET-анализы цитозольной (**A-C, G, I, K**) и ядерной (**D-F, H, J, L**) ERK-активности в клетках HEK293. **B, E.** Датчик локализации. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения.

Фигура 18: Перенос PAR₂, βARR1 и Gα_q на ранние эндосомы в клетках HEK293. **A, B.** βARR1-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (**A**) и Gα_q-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (**B**) в клетках HEK293. *P<0,05, ***P<0,001 по сравнению с несущей средой. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения. **C.** Локализация EEA1, Gα_q, и PAR₂ в эндосомах после обработки несущей средой или трипсином в течение 30 мин. Острия стрелок показывают

совместную локализацию EEA1, $G\alpha_q$ и PAR₂ в эндосомах клеток, обработанных трипсином.

Фигура 19: PAR₂-компартиментализированная передача сигналов РКС и цАМФ в клетках HEK293. FRET-анализы цитозольной РКС (**A**, **E** и **G**), плазматической мембраны РКС (**B**, **E** и **G**), цитозольного цАМФ (**C**, **F** и **H**) и плазматической мембраны цАМФ (**D**, **F** и **H**) в клетках HEK293. **I-L**. Датчик локализации. AUC, площадь под кривой. *P<0,05, **P<0,01 по сравнению с контролем. n, экспериментальные копии, тройные наблюдения.

Фигура 20: Трехсторонний антагонист PAR₂. **A**. Принцип нацеливания на PAR₂ в эндосомах с использованием трехстороннего зонда. **B**. Структура соединения **10** трехстороннего антагониста PAR₂. **C**. Анализ концентрация-ответ эффектов I-343 и соединения **10** на 2F-индуцированное накопление IP₁ в клетках HT-29.

Фигура 21: Сенситализация афферентов толстой кишки и податливость толстой кишки. **A-D**. Механосенсорные ответы мышей измеряли через 28 дней после воздействия TNBS. Слизистую оболочку толстой кишки стимулировали 2 г филаментов фон Фрея в базальных условиях и после воздействия рецептивных полей на трипсин (**A**, **D**, Труп), NE (**B**, **D**) или CS (**C**, **D**). **D**. Ответы в виде базальных %. Числа в столбцах обозначают количество афферентов. **E**, **F**. Податливость толстой кишки у здоровых контрольных мышей. Соотношение давление/объем не изменялось ни протеазным коктейлем (**E**), ни I-343 (**F**), что указывает на то, что податливость толстой кишки не изменялась. Числа в скобках обозначают количество мышей. *P<0,05, **P<0,01.

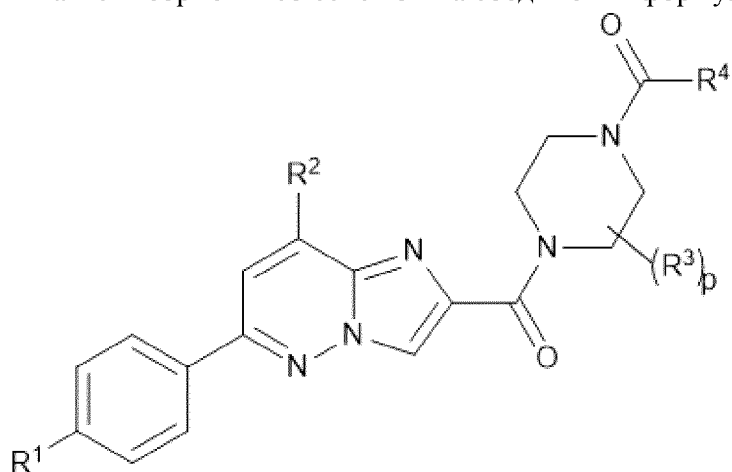
Подробное описание изобретения

Описан новый ряд соединений, которые наиболее существенно отличаются от известных модуляторов PAR₂ тем, что они включают фрагмент, специально предназначенный для контроля доставки ингибитора. Фрагмент предназначен либо для контроля абсорбции соединения через просвет кишечника и последующего системного воздействия соединений, либо для обеспечения целевой доставки соединения.

Неабсорбированные или несистемные фармацевтические агенты, действующие в просвете кишечника, нашли широкое применение при лечении системных нарушений обмена веществ, а также при лечении заболеваний и нарушений желудочно-кишечного тракта (Charmot, D., Current Pharmaceutical Designs 2012, **18**, 1434-1445). Неабсорбирующие агенты также имеют преимущество в том, что они сводят к минимуму системные отклонения от цели и тем самым предлагают благоприятные профили токсичности с уменьшенными побочными эффектами. Предусматривается, что соединения по изобретению могут быть особенно полезны при лечении заболеваний и расстройств системы ЖКТ, связанных с нежелательной активностью PAR₂, включая, но не ограничиваясь этим, моторику желудочно-кишечного тракта, алиментарное ожирение, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника и боль, связанную с синдромом раздраженного кишечника.

Абсорбция системных агентов обычно происходит путем пассивного или активного транспорта внутри энтероцитов, выстилающих просвет кишечника, или путем

пассивного параклеточного транспорта через плотные соединения клеток. Не желая ограничиваться теорией и со ссылкой на соединения формулы (I):



в настоящее время было обнаружено, что добавление определенных групп с переменной R^4 ограничивает люминальную абсорбцию полученного соединения при сохранении ингибирующей активности в отношении PAR_2 . Эти группы включают, но не ограничиваются ими, $-C_1-C_6$ алкил $S(O)_2OH$, 1,2,3-триазол-1-уксусную кислоту, $-NHR^7$, бицикло[2,2,2]октан $C(O)OR^6$, $-C_4-C_8$ циклоалкил- R^5 , 4-6-членную гетероциклическую или гетероарильную группу, замещенную $-C_1-C_6$ алкил- R^5 или $-(CH_2)_2C(O)NHC_2-C_{10}$ алкил, где C_2-C_{10} алкил замещен от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$.

В другом варианте осуществления определенные группы в R^4 действуют для обеспечения целевой доставки соединений по изобретению к рецепторам PAR_2 , которые были эндоцитозированы в ранние эндосомы.

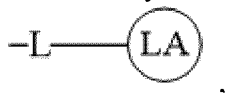
Эндосомная передача сигналов PAR_2 была оценена на предмет ее роли в боли, которой страдают пациенты с синдромом раздраженного кишечника (IBS). Трипсин, эластаза и катепсин S, которые активируются в слизистой оболочке толстой кишки пациентов с IBS и у экспериментальных животных с колитом, вызывают постоянную PAR_2 -зависимую гипервозбудимость ноцицепторов, сенсibilизацию афферентных нейронов толстой кишки к механическим раздражителям и соматическую механическую аллодинию. Ингибиторы клатрин- и динамин-зависимого эндоцитоза и митоген-активируемой протеинкиназы предотвращали индуцированную трипсином гипервозбудимость, сенсibilизацию и аллодинию. Тем не менее, они не влияли на вызванную эластазой или катепсином S гипервозбудимость, сенсibilизацию или аллодинию. Трипсин стимулировал эндоцитоз PAR_2 , который передавал сигнал от эндосом активировать внеклеточную сигнальную регулируемую киназу. Эластаза и катепсин S не стимулировали эндоцитоз PAR_2 , который передавал сигнал с плазматической мембраны активировать аденилатциклазу. Биопсия слизистой оболочки толстой кишки от пациентов с IBS выпускала протеазы, которые индуцировали постоянную PAR_2 -зависимую гипервозбудимость ноцицепторов и ассоциацию PAR_2 с β -аррестинами, которые опосредуют эндоцитоз. Соединения по изобретению, включающие липидный якорь, такой как холестеранол, способствуют доставке и удержанию соединения в

эндосомах, содержащих PAR₂. Соединение по изобретению предотвращало устойчивую индуцированную трипсином и IBS протеазой гипервозбудимость ноцицепторов. Эти результаты показывают, что передача сигналов PAR₂ от эндосом лежит в основе устойчивой гипервозбудимости ноцицепторов, которая опосредует хроническую боль при IBS. Ингибиторы передачи сигнала эндосомальным PAR₂ могут, следовательно, обеспечить новую терапию для боли IBS.

Термин «передача сигнала эндосомальным PAR₂», как используется в настоящем документе, относится к сигналу, трансдуцированному активированным PAR₂, который был эндоцитозирован в эндосому, предпочтительно, раннюю эндосому.

Термин «ингибирование передачи сигнала эндосомальным PAR₂», как используется в настоящем документе, относится к антагонистам или ингибиторам PAR₂, которые действуют (или продолжают действовать) на рецептор после того, как он был эндоцитозирован в эндосому.

Для нацеливания на передачу сигналов эндосомальным PAR₂ соединения по изобретению получают в виде «трехсторонних соединений», включающих фрагмент:



где

L представляет собой линкерный фрагмент длиной от 1 до 50 нм; и

LA представляет собой липидный якорь, который способствует введению соединения в плазматическую мембрану.

Термин «трехстороннее соединение», как используется в настоящем документе, относится к соединениям формулы (I), описанным в настоящем документе, или фармацевтически приемлемым солям, содержащим ингибитор PAR₂, ковалентно связанный с линкерной группой, причем линкерная группа ковалентно связана с липидным якорем, способным прикреплять ингибитор PAR₂ к липидному бислою клеточной мембраны и, в конечном счете, к мембране ранней эндосомы.

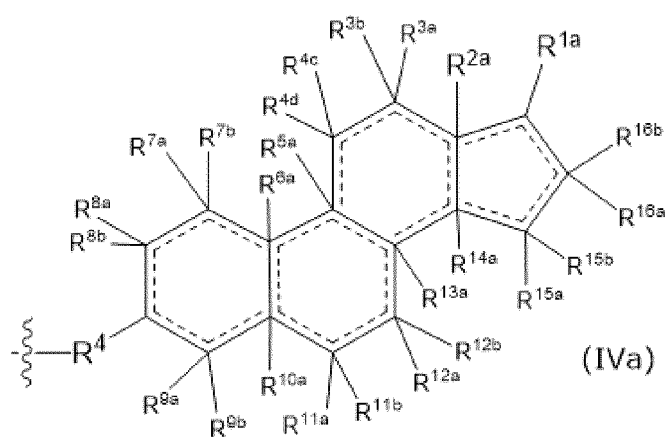
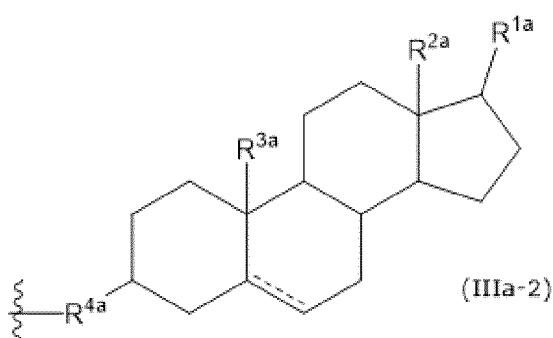
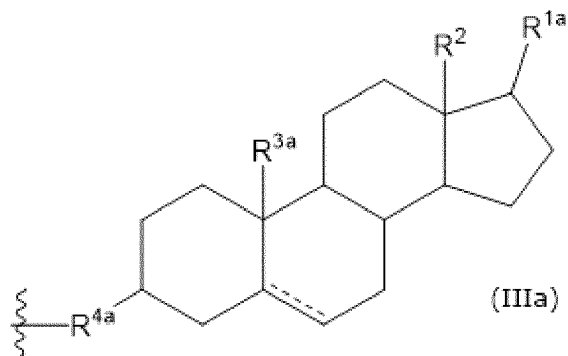
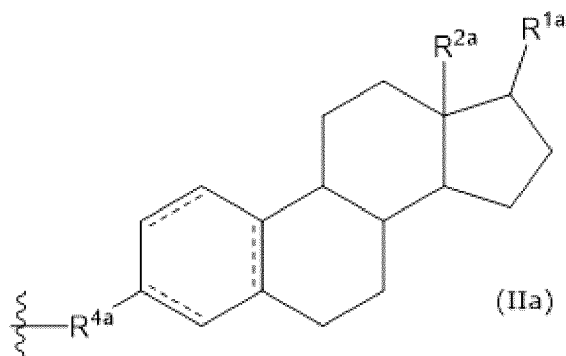
Термин «липидный якорь» (LA), как используется в настоящем документе, обозначает фрагменты, которые способны расщепляться в липидных мембранах и тем самым закреплять соединение формулы (I) в липидной мембране. Распределение в липидной мембране может происходить непосредственно из внеклеточного или везикулярного просветного пространства или может происходить латерально из липидного бислоя.

В одном предпочтительном варианте осуществления липидный якорь может характеризоваться своей способностью к распределению в липидных мембранах, посредством чего указанные липидные мембраны характеризуются нерастворимостью в неионных моющих средствах при температуре 4°C.

Примеры подходящих липидных якорей включают, но не ограничиваются ими, холестерин, холестанол, сфинголипид, GPI-якорь или производные насыщенных жирных кислот. Многие такие липидные якоря были описаны в данной области техники,

например, в WO2005/097199, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления изобретения липидный якорь представляет собой фрагмент, выбранный из формул (IIa), (IIIa), (IIIa-2) и (IVa):



где

R^{1a} представляет собой, независимо, замещенный C_{1-12} алкил, алкенил, алкинил или алкокси группу;

R^{2a} и R^{3a} , R^{3b} , R^{4b} , R^{4c} , R^{5a} , R^{6a} , R^{7a} , R^{7b} , R^{8a} , R^{8b} , R^{9a} , R^{9b} , R^{10a} , R^{11a} , R^{11b} , R^{12a} , R^{12b} , R^{13a} , R^{14a} , R^{15a} , R^{15b} , R^{16a} и R^{16b} независимо представляют собой H, C_{1-3} алкил, гидроксил, C_{1-3} алкокси или amino; или

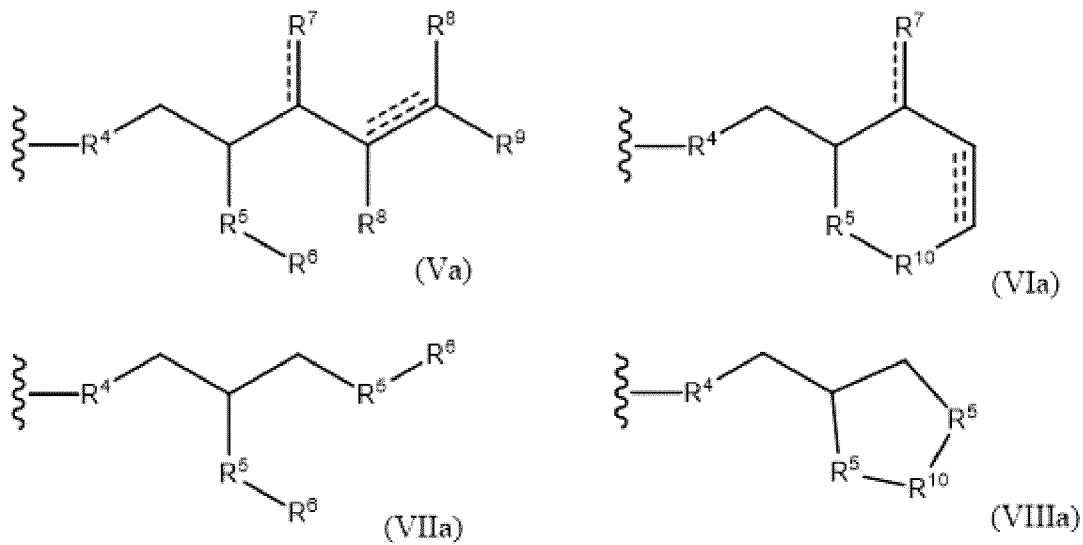
необязательно, R^{3a} , R^{3b} и/или R^{4b} , R^{4c} , и/или R^{7a} , R^{7b} и/или R^{8a} , R^{8b} и/или R^{11a} , R^{11b} и/или R^{12a} , R^{12b} и/или R^{15a} , R^{15b} и R^{16a} , R^{16b} взяты вместе с образованием =O (двойная связь с кислородом);

R^{4a} представляет собой C, O, NH или S;

==== обозначает одинарную или двойную связь; или

его фармацевтически приемлемую соль.

В других вариантах осуществления изобретения липидный якорь представляет собой фрагмент, выбранный из формул (Va), (VIa), (VIIa) или (VIIIa):



где

R^4 определен выше;

----- обозначает одинарную или двойную связь;

==== обозначает одинарную, двойную и тройную связь;

каждый R^5 , независимо, представляет собой $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$, $-NHCONH-$, $-NHC(O)O-$ или $-NHS(O_2)-$;

каждый R^6 , независимо, представляет собой C_{14-30} алкильную группу, необязательно замещенную фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора;

каждый R^7 представляет собой, независимо, NH_2 , $NHCH_3$, OH , H , галоген или O , при условии, что, когда R^7 представляет собой NH_2 , $NHCH_3$, OH , H или галоген, тогда ----- обозначает одинарную связь, и, когда R^7 представляет собой O , тогда ----- обозначает двойную связь;

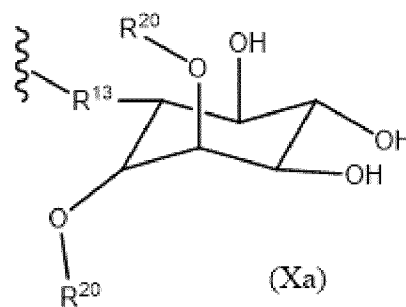
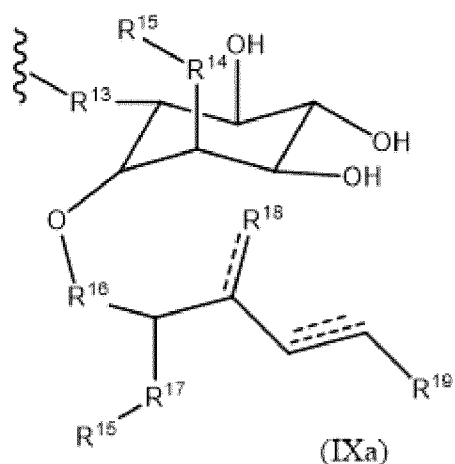
каждый R^8 , независимо, представляет собой H , OH или отсутствует, когда ===== обозначает тройную связь;

R^9 представляет собой C_{10-30} алкильную группу, необязательно замещенную фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора; и

каждый R^{10} , независимо, представляет собой C_{24-40} алкиленовую группу, C_{24-40} алкениленовую группу или C_{24-40} алкиниленовую группу, необязательно замещенную фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора; или

его фармацевтически приемлемую соль.

В следующих вариантах осуществления изобретения липидный якорь представляет собой фрагмент, выбранный из формул (IXa) или (Xa):



где

----- обозначает одинарную или двойную связь;

===== обозначает одинарную, двойную и тройную связь;

каждый R^{13} , независимо, представляет собой $-O-$ или $-CO(CH_2)_a(CO)_bO-$, где a обозначает целое число от 1 до 3 и b обозначает целое число от 0 до 1;

R^{14} представляет собой $-O-$ или $-OC(O)-$;

каждый R^{15} , независимо, выбран из C_{16-30} алкильной группы, необязательно замещенной фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора;

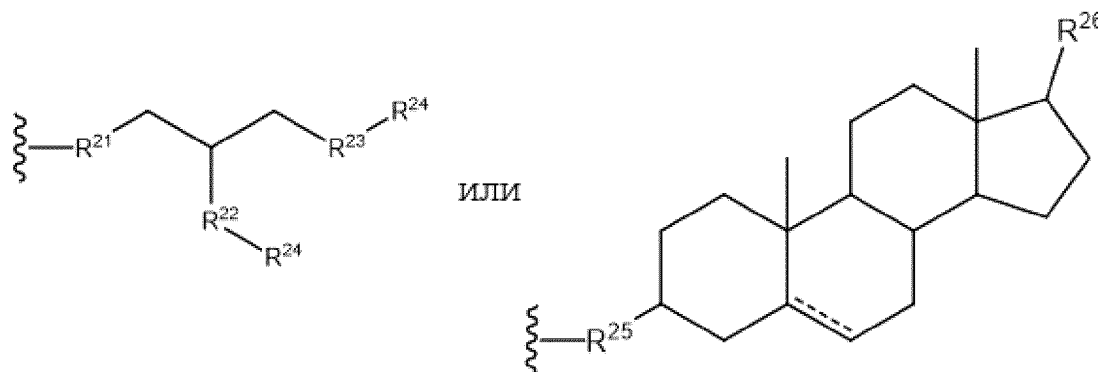
R^{16} представляет собой $-PO_3^-CH_2-$, $-SO_3CH_2-$, $-CH_2-$, $-CO_2CH_2-$ или прямую связь;

R^{17} представляет собой $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$, $-NHCONH-$, $-NHC(O)O-$ или $-NHS(O_2)-$;

R^{18} представляет собой NH_2 , $NHCH_3$, OH , H , галоген или O ;

R^{19} представляет собой C_{16-30} алкильную группу, необязательно замещенную фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора; и

каждый R^{20} представляет собой $C(O)C_{13-25}$ алкильную группу, необязательно замещенную группой следующих формул:



где

----- обозначает одинарную или двойную связь;

R^{21} представляет собой $-PO_3^-CH_2-$, $-SO_3CH_2-$, $-CH_2-$, $-CO_2CH_2-$ или прямую связь;

R^{22} представляет собой $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$, $-NHCONH-$, $-NHC(O)O-$ или $-NHS(O_2)-$;

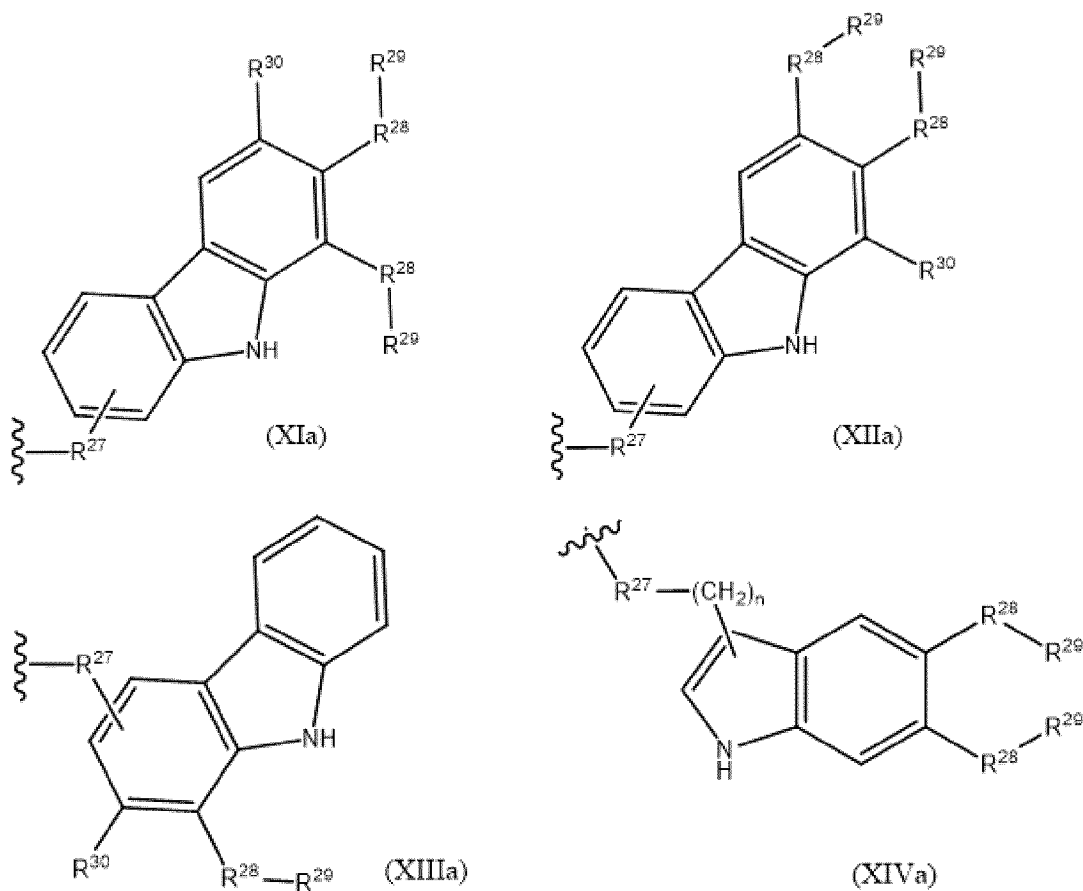
R^{23} представляет собой $-O-$ или $-OC(O)-$;

каждый R^{24} , независимо, выбран из C_{16-30} алкильной группы, необязательно замещенной фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора;

R^{25} представляет собой $-CO(CH_2)_a(CO)_bO-$ или $-CO(CH_2)_a(CO)_bNH-$, где a обозначает целое число от 1 до 3 и b обозначает целое число от 0 до 1; и

R^{26} представляет собой C_{4-20} алкильную группу, необязательно замещенную фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора; или его фармацевтически приемлемую соль.

В следующих вариантах осуществления изобретения липидный якорь представляет собой фрагмент, выбранный из формул (XIa), (XIIa), (XIIIa) или (XIVa):



где

каждый R^{27} , независимо, выбран из $-NH-$, $-O-$, $-NH(CH_2)_cOPO_3^-$, $-NH(CH_2)_cSO_2NH-$, $-NHCONH-$, $-NHC(O)O-$, $-CO(CH_2)_b(CO)_aNH-$, $-CO(CH_2)_b(CO)_aO-$, $-CO(CH_2)_bS-$, $-CO(CH_2)_bOPO_3^-$, $-CO(CH_2)_bSO_2NH-$, $-CO(CH_2)_bNHCONH-$, $-CO(CH_2)_bOCONH-$, $-CO(CH_2)_bOSO_3^-$ или $-CO(CH_2)_bNHC(O)O-$, где a обозначает целое число от 0 до 1, b обозначает целое число от 1 до 3 и c обозначает целое число от 2 to 3;

каждый R^{28} , независимо, представляет собой $-CH_2-$ или $-O-$;

каждый R^{29} , независимо, выбран из H или C_{16-30} алкильной группы, необязательно замещенной фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора;

каждый R^{31} , независимо, выбран из H, или C_{1-15} алкильной группы, необязательно замещенной фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора, или C_{1-15} алкокси группы, необязательно замещенной фтором, предпочтительно, от 1 до 4 атомами фтора; и

n обозначает целое число от 1 до 2; или его фармацевтически приемлемую соль.

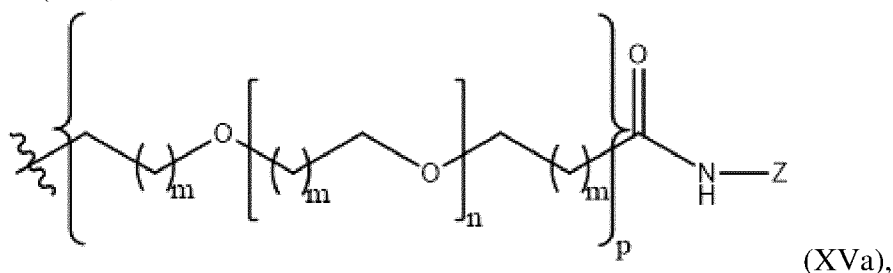
В еще других вариантах осуществления липидный якорный фрагмент представляет собой C_{10-20} алкил (например, C_{16} алкил).

Термин «линкер», как используется в настоящем документе, относится к части соединения, которая связывает ингибитор PAR_2 с липидным якорем. Понятно, что линкер следует выбирать таким образом, чтобы он не конкурировал с ингибитором PAR_2 в сайте связывания лиганда. Также линкер не должен распределяться в липидной мембране.

Линкерная группа должна иметь длину от 1 до 50 нм, чтобы позволить ингибитору PAR_2 взаимодействовать с рецептором, когда липидный якорь закреплен в мембране эндосомы.

В одном варианте осуществления линкерная группа будет содержать одно или несколько звеньев полиэтиленгликоля. В другом варианте осуществления предусматривается, что линкер или субъединицы линкера могут представлять собой аминокислотные остатки, дериватизированные или функционализированные аминокислотные остатки, простые полиэфиры, мочевины, карбаматы, сульфонамиды или другие субъединицы, которые обеспечивают достаточное расстояние между ингибитором PAR_2 и липидным якорем, не влияя на функцию любой группы.

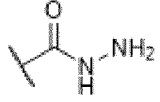
В одном варианте осуществления изобретения линкер представлен фрагментом формулы (XVa):



где

Z обозначает присоединенную группу между линкером и липидным якорем и представляет собой $-C_1-C_{10}$ алкил-, $-C_2-C_{10}$ алкенил-, $-C_2-C_{10}$ алкинил-, $-C_1-C_{10}$ алкил $C(O)-$, $-C_2-C_{10}$ алкенил $C(O)-$ или $-C_2-C_{10}$ алкинил $C(O)-$; или

Z вместе с соседним амином представляет собой необязательно модифицированную C-концевую аминокислоту (например, C-конец амидирован или C-

конец представляет собой ацилгидразин (например, , выбранную из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина,

цистеина, лизина, аргинина, серина или треонина; где аминокислота присоединена к липидному якорю через его боковую функциональную группу;

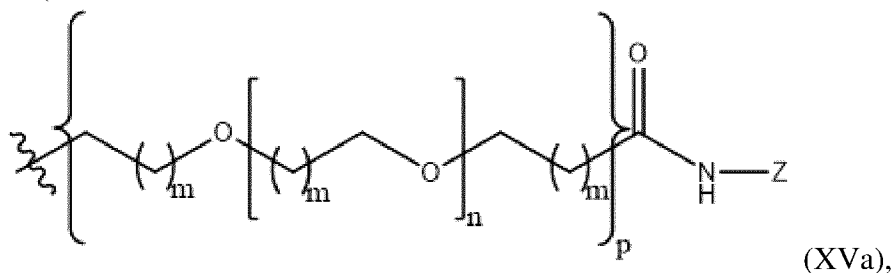
m обозначает 1 или 2;

n обозначает от 1 до 20; и

p обозначает от 1 до 8; или

его фармацевтически приемлемой солью.

В одном варианте осуществления изобретения линкер представлен фрагментом формулы (XVa):



где

Z обозначает присоединенную группу между линкером и липидным якорем и представляет собой $-C_1-C_{10}$ алкил-, $-C_2-C_{10}$ алкенил-, $-C_2-C_{10}$ алкинил-, $-C_1-C_{10}$ алкилC(O)-, $-C_2-C_{10}$ алкенилC(O)- или $-C_2-C_{10}$ алкинилC(O)-; или

Z вместе с соседним амином представляет собой необязательно C-концевую амидированную аминокислоту, выбранную из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, цистеина, лизина, аргинина, серина или треонина; где аминокислота присоединена к липидному якорю через его боковую функциональную группу;

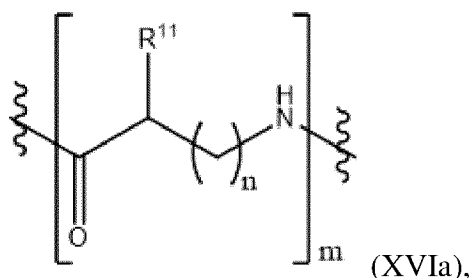
m обозначает 1 или 2;

n обозначает от 1 до 20; и

p обозначает от 1 до 8; или

его фармацевтически приемлемой солью.

В другом варианте осуществления линкер представлен фрагментом формулы (XVIa):



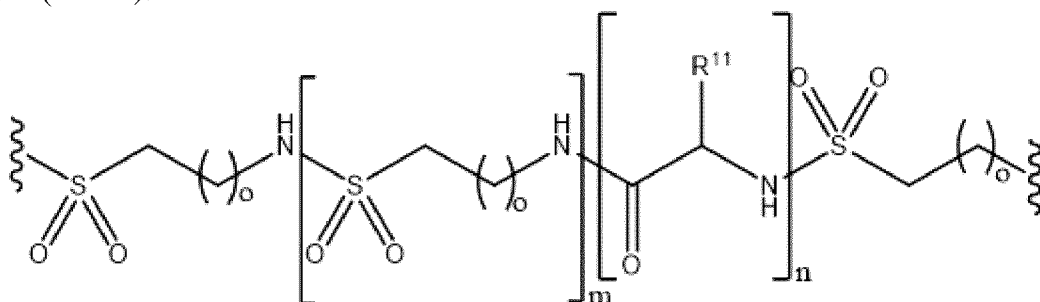
где

в каждом случае R^{11} , независимо, представляет собой любую боковую цепь остатка природной, дериватизированной или функционализированной аминокислоты;

m обозначает целое число от 3 до 80; и

n обозначает целое число от 0 до 1; или его фармацевтически приемлемой солью.

В других вариантах осуществления изобретения линкер представлен фрагментом формулы (XVIIa):



(XVIIa),

где

m обозначает целое число от 0 до 40;

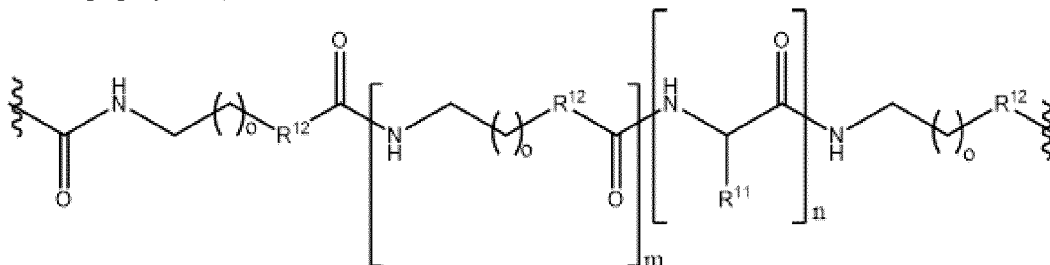
n обозначает целое число от 0 до 1;

каждый o, независимо, представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R¹¹, независимо, представляет собой любую боковую цепь остатка природной, дериватизированной или функционализированной аминокислоты; и

где конец SO₂ присоединен к липидному якорю.

В следующем варианте осуществления изобретения линкер представлен фрагментом формулы (XVIIIa):



(XVIIIa),

где

m обозначает целое число от 0 до 40;

n обозначает целое число от 0 до 1;

каждый o, независимо, представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый R¹², независимо, представляет собой NH или O;

каждый R¹¹, независимо, представляет собой любую боковую цепь остатка природной, дериватизированной или функционализированной аминокислоты; и

где C(O)-конец присоединен к липидному якорю и R¹²-конец присоединен к ингибитору эндосомальной сигнализации PAR₂.

Ряд подходящих линкерных фрагментов был описан в WO 2005/097199, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В данном описании используется ряд терминов, которые хорошо известны квалифицированному адресату. Тем не менее, для ясности будет определен ряд терминов.

Как используется в настоящем документе, термин «алкил», используемый отдельно или в сложных словах, обозначает алкил с прямой или разветвленной цепью. Префиксы, такие как «C₁₋₁₂», используются для обозначения числа атомов углерода в алкильной группе (в данном случае от 1 до 12). Примеры неразветвленного и разветвленного алкила включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, гексил, гептил, 5-метилгептил, 5-метилгексил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил и докозил (C₂₂).

Термин «алкенил», используемый отдельно или в сложных словах, обозначает углеводородные остатки с прямой или разветвленной цепью, содержащие по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, включая этиленовые моно-, ди- или полиненасыщенные алкильные группы, как определено выше. Префиксы, такие как «C₂₋₁₂», используются для обозначения числа атомов углерода в алкенильной группе (в данном случае от 2 до 12). Примеры алкенила включают винил, аллил, 1-метилвинил, бутенил, изобутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-пентенил, 1-гексенил, 3-гексенил, 1-гептенил, 3-гептенил, 1-октенил, 1-ноненил, 2-ноненил, 3-ноненил, 1-деценил, 3-деценил, 1,3-бутадиенил, 1,4-пентадиенил, 1,3-гексадиенил, 1,4-гексадиенил и 5-докосенил (C₂₂).

Термин «алкинил», используемый отдельно или в сложных словах, обозначает углеводородные остатки с прямой или разветвленной цепью, содержащие по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. Префиксы, такие как «C_{2-C₁₀}», используются для обозначения числа атомов углерода в алкинильной группе (в данном случае от 2 до 10).

Как используется в настоящем документе, термин «арил» обозначает необязательно замещенное моноциклическое или конденсированное полициклическое ароматическое карбоциклическое (кольцевая структура, содержащая атомы кольца, которые все представляют собой углерод) кольцо, предпочтительно имеющее от 5 до 12 атомов в кольце. Примеры арильных групп включают моноциклические группы, такие как фенил, конденсированные полициклические группы, такие как нафтил, и тому подобное.

Термин «гетероарил», как используется в настоящем документе, обозначает моноциклическое или бициклическое кольцо, обычно содержащее до 7 атомов в каждом кольце, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Гетероарильные группы в рамках этого определения включают, но не ограничиваются ими: бензимидазол, акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пиразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, хинолинил, изохинолинил, оксазолил, изоксазолил, индоил, пиразинил, пиридазинил, пиридинил, пиримидинил, пирролил, 1H-1,2,3-триазол, 2H-1,2,3-триазол, 1H-1,2,4-триазол и тетрагидрохинолин.

Как используется в настоящем документе, термин «гетероцикл» или «гетероциклил», используемый отдельно или в сложных словах, обозначает насыщенные

или частично ненасыщенные моноциклические, бициклические или конденсированные полициклические кольцевые системы, содержащие по меньшей мере один гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N и S. Префиксы, такие как «C₄-C₈», используются для обозначения числа атомов углерода в циклической части группы (в данном случае от 4 до 8). «Гетероцикл» включает дигидро и тетрагидро аналоги вышеуказанных гетероарильных групп. Примеры подходящих гетероциклических заместителей включают, но не ограничиваются ими, пирролин, пирролидин, пиперидин, пиперазин, пиразолин, пиразолидин, имидазолидин, тетрагидрофуран, пиран, дигидропиран, тетрагидропиран, диоксан, оксазолин, морфолин, тиоморфолин, тетрагидротиофен, оксатиан, дитиан, 4H-1,2,3-триазол и дитиазин, каждый из которых может быть дополнительно замещен 1-3 заместителями.

Термин «галоген», используемый в настоящем документе, относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин «оксо» обозначает атом кислорода, двухвалентно связанный с соседним атомом углерода. Понятно, что, когда переменной «R» является оксо, атом водорода, подразумеваемый для соседнего атома углерода в циклической структуре, будет отсутствовать из-за двухвалентной природы оксо.

Во всем этом описании и формуле изобретения, которая следует далее, если контекст не требует иного, будет подразумеваться, что слово «содержит» и варианты, такие как «включает» или «содержащий», подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Ссылка в данном описании на любую предшествующую публикацию (или информацию, полученную из нее) или на любой известный материал, не является и не должна восприниматься как подтверждение, или признание, или любая форма предположения о том, что эта предшествующая публикация (или информация, полученная из нее) или этот известный материал являются частью общих знаний в области деятельности, к которой относится данное описание.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения и со ссылкой на общую формулу (I) предпочтительными являются одно или несколько из следующих:

- a) R¹ представляет собой H, C₁-C₆ алкил или галоген.
- b) R¹ представляет собой галоген.
- c) R¹ представляет собой фтор.
- d) R² представляет собой C₁-C₆ алкил, C₃-C₆ циклоалкил или C₁-C₆ арил, каждый необязательно замещенный от 1 до 3 галогенами.
- e) R² представляет собой C₄ алкил.
- f) R² представляет собой трет-бутил.
- g) R³ представляет собой оксо или C₁-C₆ алкил, и p обозначает целое число от 0 до

h) R^3 представляет собой C_1 - C_6 алкил, и p обозначает 2.
 i) R^3 представляет собой метил, и p обозначает 2.
 j) R^4 представляет собой $-C_1$ - C_6 алкил $S(O)_2OH$, -1,2,3-триазол-1-уксусную кислоту, $-NHR^7$, -бицикло[2.2.2]октан $C(O)OR^6$, $-C_4$ - C_8 циклоалкил- R^5 , 4-6-членную гетероциклическую или гетероарильную группу, замещенную $-C_1$ - C_6 алкил- R^5 или $-(CH_2)_2C(O)NHC_2$ - C_{10} алкил, где C_2 - C_{10} алкил замещен от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$.

k) R^5 представляет собой $-C(O)NHR^7$ или $-NHC(O)R^7$;

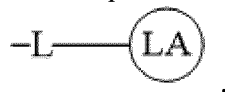
i) R^6 представляет собой H или R^7

j) R^7 представляет собой $-R^8$, $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ или $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$, где $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ и $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$ независимо замещены от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$, и где один или несколько атомов углерода в алкильной группе независимо заменены азотом или кислородом.

k) R^7 представляет собой $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ или $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$, где $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ и $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$ независимо замещены от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$, и где один или несколько атомов углерода в алкильной группе независимо заменены азотом или кислородом.

l) R^7 представляет собой $-R^8$.

m) R^8 представлен формулой:



где

L представляет собой линкерный фрагмент длиной от 1 до 50 нм; и

LA представляет собой липидный якорь, который способствует введению соединения в плазматическую мембрану

n) LA представляет собой липидный якорь, выбранный из холестерина, холестанола, сфинголипида, GPI-якоря или производного насыщенной жирной кислоты.

o) LA представляет собой липидный якорь, выбранный из фрагментов формул (IIa), (IIIa), (IVa), (Va), (VIa), (VIIa), (VIIIa), (IXa), (Xa), (XIa), (XIIa), (XIIIa) и (XIVa).

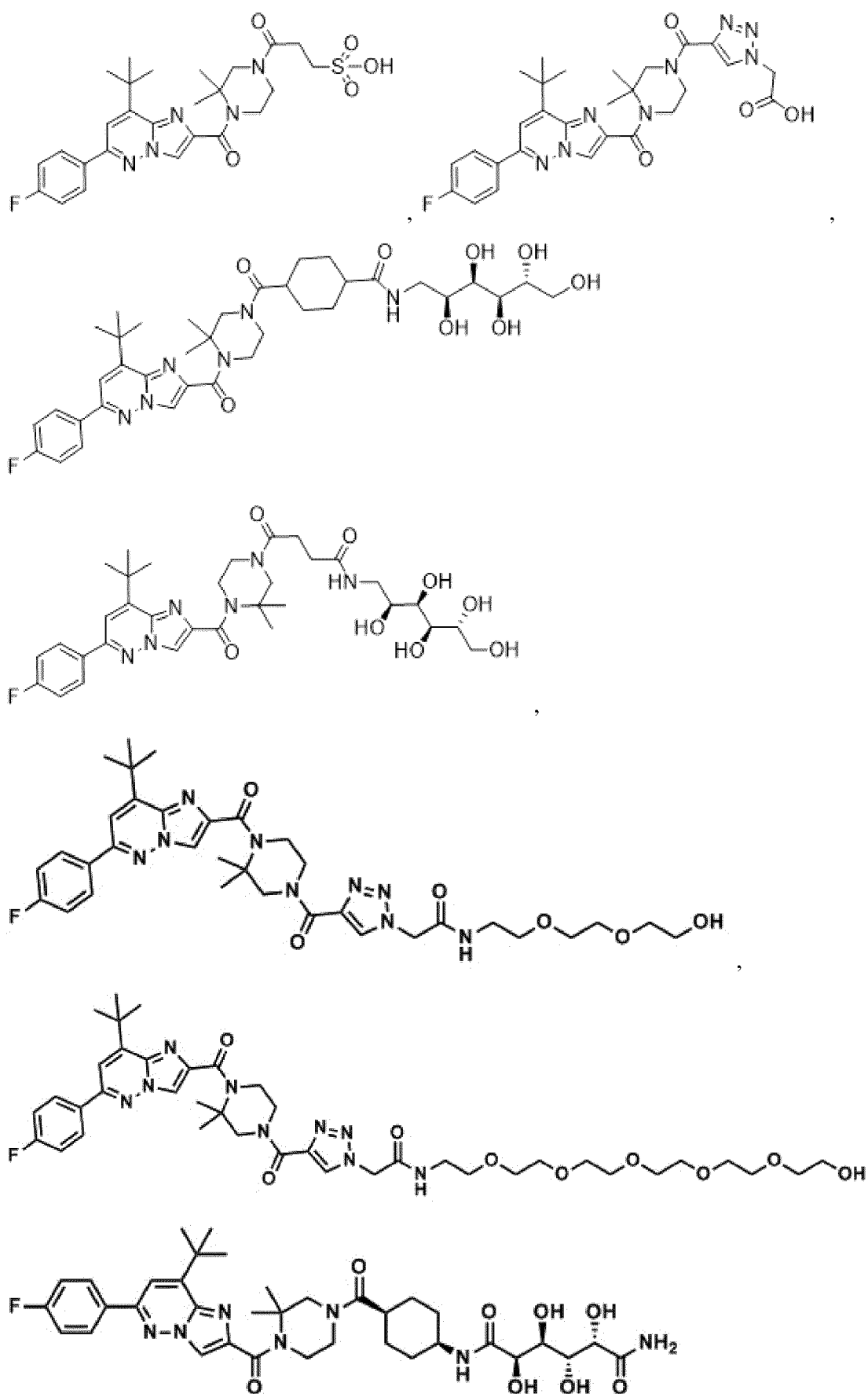
p) LA представляет собой липидный якорь, выбранный из фрагментов формул (IIa) или (IIIa).

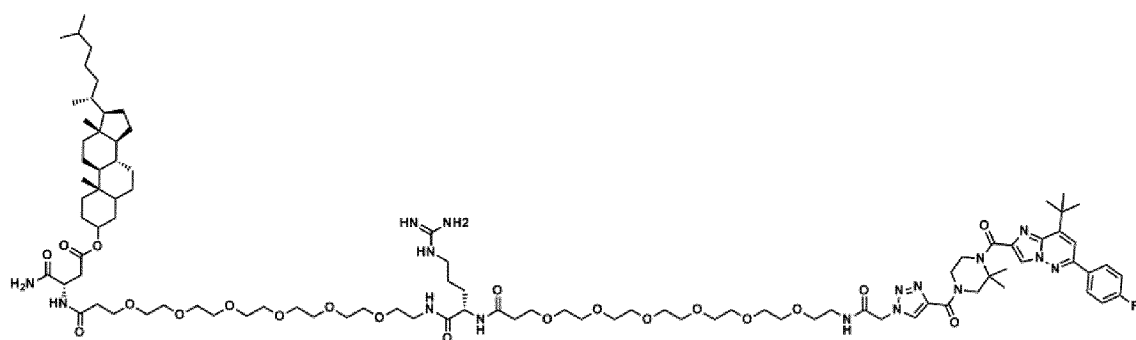
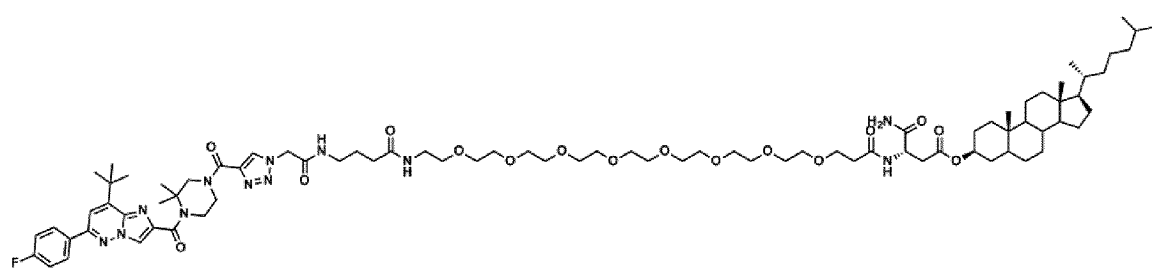
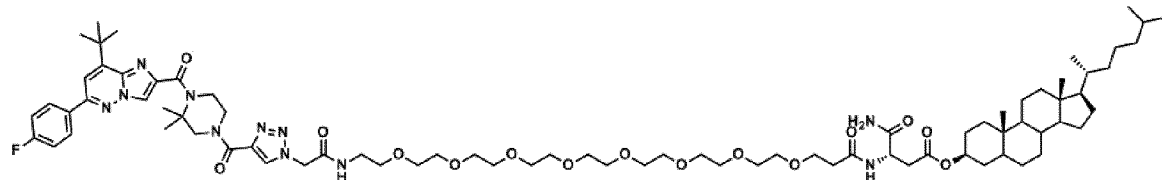
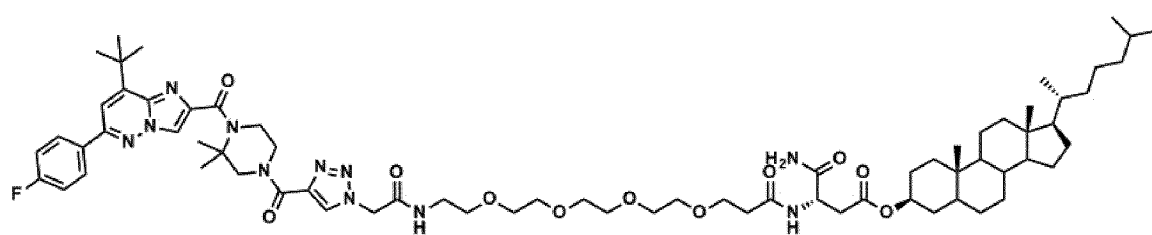
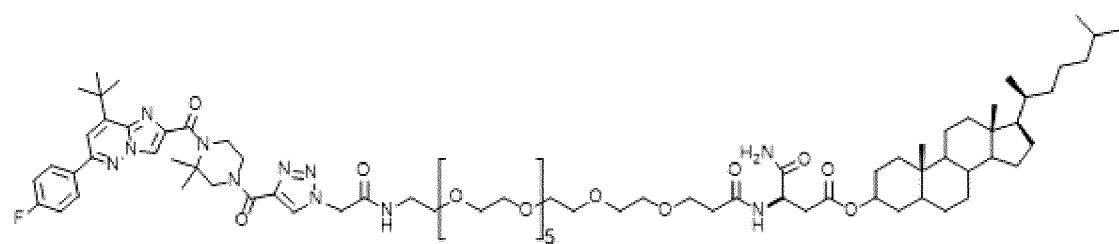
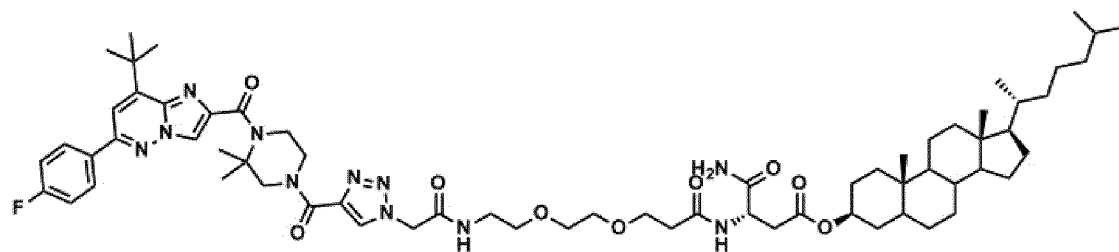
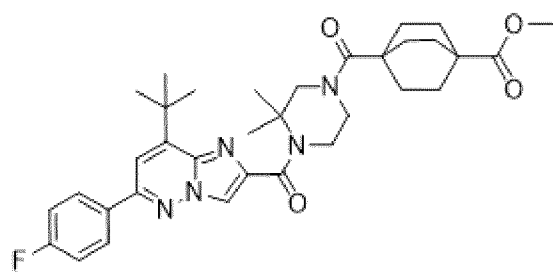
q) L представляет собой линкерный фрагмент, содержащий одну или несколько субъединиц, причем субъединицы включают единицы полиэтиленгликоля, аминокислотные остатки, дериватизированные или функционализированные аминокислотные остатки, простые полиэфиры, мочевины, карбаматы и/или сульфонамиды.

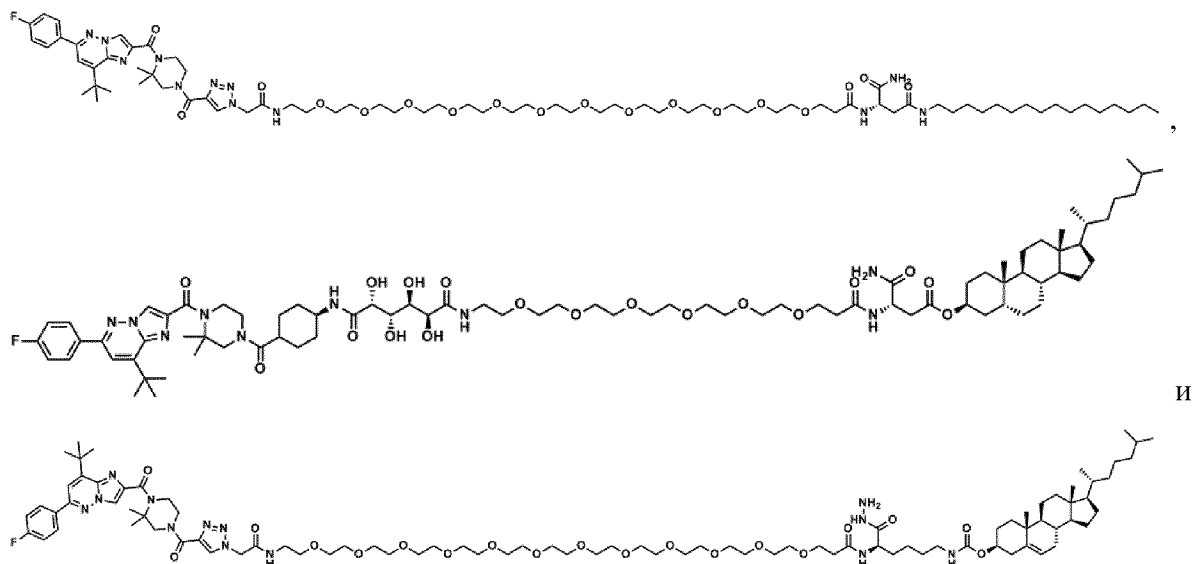
r) L представляет собой линкерный фрагмент, представленный формулами (XVa), (XVIa), (XVIIa) или (XVIIIa).

s) L представляет собой линкерный фрагмент, представленный формулой (XVa).

В предпочтительном варианте осуществления соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли выбраны из:







Понятно, что соединения по настоящему изобретению могут существовать в одной или нескольких стереоизомерных формах (например, диастереомерах). Настоящее изобретение включает в себя все эти стереоизомерные формы, либо выделенные (например, путем выделения энантиомеров), либо в комбинации (включая рацемические смеси и диастереомерные смеси).

Таким образом, изобретение относится также к соединениям в практически чистой стереоизомерной форме по отношению к асимметричным хиральным центрам, например, более чем около 90% ди (диастереомерный избыток), таким как от около 95% до 97% ди, или более 99% ди, а также к смесям, включая рацемические смеси. Такие диастереомеры могут быть получены асимметричным синтезом, например, с использованием хиральных промежуточных соединений, или смеси могут быть разделены обычными методами, например хроматографией или использованием разделительного агента.

Настоящее изобретение предусматривает использование аминокислот обеих форм, L и D, включая использование аминокислот, независимо выбранных из форм L и D, например, когда пептид содержит два остатка серина, каждый остаток серина может иметь одинаковую или противоположную абсолютную стереохимию. Если не указано иное, аминокислота принимается как имеющая L-конфигурацию.

Когда соединение содержит одну или несколько функциональных групп, которые могут быть протонированы или депротонированы (например, при физиологическом pH), соединение может быть получено и/или выделено в виде фармацевтически приемлемой соли. Понятно, что соединение может быть цвиттерионным при данном pH. Как используется в настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли данного соединения, где соль подходит для введения в качестве фармацевтического средства. Такие соли могут быть получены, например, путем реакции кислоты или основания с аминогруппой или группой карбоновой кислоты, соответственно.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть получены из неорганических и органических кислот. Примеры неорганических кислот включают

хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобное. Примеры органических кислот включают уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновою кислоту, этансульфоновою кислоту, *p*-толуолсульфоновою кислоту, салициловую кислоту и тому подобное.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований могут быть получены из неорганических и органических оснований. Соответствующие противоионы, полученные из неорганических оснований, включают соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния. Органические основания включают первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая природные замещенные амины, и циклические амины, в том числе изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диметиламиноэтанол, трометамин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидроламин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, *N*-алкилглюкамины, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин и *N*-этилпиперидин.

Кислотно-основные аддитивные соли имеют тенденцию быть более растворимыми в водных растворителях, чем соответствующие формы свободной кислоты/основания.

Соединения по изобретению могут быть в кристаллической форме или в виде сольватов (например, гидратов), и предполагается, что обе формы входят в объем настоящего изобретения. Термин «сольват» представляет собой комплекс переменной стехиометрии, образованный растворенным веществом (в данном изобретении пептидом по изобретению) и растворителем. Такие растворители не должны мешать биологической активности растворенного вещества. Растворителями могут быть, например, вода, этанол или уксусная кислота. Способы сольватации обычно известны в данной области.

Соединения по изобретению могут быть в виде пролекарства. Термин «пролекарство» используется в самом широком смысле и охватывает те производные, которые *in vivo* преобразуются в соединения по изобретению. Такие производные могут быть легко найдены специалистами в данной области и включают, например, соединения, в которых свободная гидроксигруппа преобразуется в сложноэфирное производное или кольцевой атом азота преобразуется в *N*-оксид. Примеры сложноэфирных производных включают алкиловые эфиры (например, ацетаты, лактаты и глутамины), сложные эфиры фосфатов и такие, которые образованы из аминокислот (например, валин). Любое соединение, которое является пролекарством соединения по изобретению, входит в объем и сущность изобретения. Обычные способы получения подходящих пролекарств согласно изобретению описаны в учебниках, таких как «Design of Prodrugs» Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования передачи сигналов PAR₂, включающий контактирование PAR₂ с соединением формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой солью. Воздействие на клетку соединения или его фармацевтически приемлемой соли может происходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Когда воздействие на клетку соединения происходит, например, *in vitro* или *ex vivo*, способ по настоящему изобретению можно использовать в качестве инструмента для биологических исследований или в качестве диагностического инструмента для определения эффективности некоторых соединений (по отдельности или в комбинация) для модуляции у субъекта активности PAR₂. В качестве примера, клетка, которая экспрессирует PAR₂, может быть удалена от субъекта и подвергнута воздействию одного или нескольких соединений по настоящему изобретению или их солей. Способность соединения (или соединений) модулировать активность PAR₂ может быть оценена путем измерения любого одного из ряда маркеров нисходящего потока с помощью метода, известного специалисту в данной области. Таким образом, можно установить, является ли определенное соединение более эффективным, чем другое, и адаптировать конкретный режим лечения для этого субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления предложен способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В конкретном предпочтительном варианте в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала эндосомальным PAR₂, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом предпочтительном варианте осуществления предложено соединение формулы (I), определенное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения при профилактике или лечении заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления предложено соединение формулы (I), определенное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения при профилактике или лечении заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала эндосомальным PAR₂.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления предложено применение соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении медицинского препарата для профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

Другое предпочтение касается применения соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении медицинского препарата для профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала эндосомальным PAR₂.

Термины «лечить» и «лечение», используемые в данном документе, охватывают любое лечение состояния или заболевания у животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно, человека, и включают лечение любого заболевания или расстройства, при которых полезным является ингибирование передачи сигналов PAR₂. Термины «предотвращать» и «предотвращение», используемые в данном документе, охватывают предотвращение или профилактику состояния или заболевания у животного, предпочтительно, млекопитающего, более предпочтительно, человека, и включают предотвращение любого заболевания или расстройства, при которых полезным является ингибирование передачи сигналов PAR₂.

В предпочтительном варианте осуществления профилактический или терапевтический способ включает стадии введения соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, у которого есть заболевание или расстройство, симптом заболевания или расстройства или предрасположенность к заболеванию или расстройству, связанному с нежелательной активностью PAR₂, как описано в настоящем документе, с целью лечения, исцеления, облегчения, ослабления, преобразования, излечения, купирования, улучшения или воздействия на заболевание или расстройство, симптомы заболевания или расстройства или предрасположенность к заболеванию или расстройству. Профилактическое лечение может снизить частоту заболеваний или расстройств, связанных с нежелательной активностью PAR₂.

Профилактические или терапевтические способы по настоящему изобретению могут также включать введение комбинации соединений по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемых солей субъекту, у которого есть заболевание или расстройство, симптом заболевания или расстройства, или предрасположенность к заболеванию или расстройству, связанному с нежелательной активностью PAR₂, как описано в настоящем документе, с целью лечения, исцеления, облегчения, ослабления, преобразования, излечения, купирования, улучшения или воздействия на заболевание или расстройство, симптомы заболевания или расстройства или предрасположенность к заболеванию или расстройству. Профилактическое лечение может снизить частоту заболеваний или расстройств, связанных с нежелательной активностью PAR₂. В некоторых вариантах осуществления комбинации соединений по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемых солей могут обеспечивать усиленное ингибирование активности PAR₂ по сравнению с профилактическими или терапевтическими способами, в которых используют только одно из соединений по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемые соли.

Специалисту в данной области также должно быть понятно, что профилактические или терапевтические способы, описанные в настоящем документе, могут использоваться в любом количестве комбинаций с другими способами лечения, применяемыми в настоящее время в данной области.

Состояния, при которых экспрессия и/или активность PAR₂ увеличиваются, и где желательно снизить указанную активность, могут быть определены специалистами в данной области с помощью любых диагностических или прогностических анализов или их комбинации, известных в данной области, например, биологический образец, полученный от субъекта (например, полученные от него кровь, сыворотка, плазма, моча, слюна, спинномозговая жидкость, жировая ткань, ткань и/или клетки мозга), может быть проанализирован на экспрессию и/или активность PAR₂. Такие состояния включают, но этим не ограничиваются, острые и хронические воспалительные заболевания, метастазирования опухоли, моторику желудочно-кишечного тракта, боль, зуд, кожные заболевания, такие как атопический дерматит, алиментарное ожирение, астму, ревматоидный артрит, периодонтит, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, злокачественное новообразование, фиброзные заболевания, метаболическое нарушение и неврологические заболевания.

В контексте настоящего изобретения термин «боль» включает хроническую воспалительную боль (например, боль, связанную с ревматоидным артритом, остеоартритом, ревматоидным спондилитом, подагрическим артритом и ювенильным артритом); мышечно-скелетную боль, боль в пояснице и шее, растяжение связок и деформации, невропатическую боль, симпатически поддерживаемую боль, миозит, боль, связанную со злокачественным новообразованием и фибромиалгией, боль, связанную с мигренью, боль, связанную с кластерной и хронической ежедневной головной болью, боль, связанную с гриппом или другими вирусными инфекциями, такими как насморк, ревматизм, боль, связанную с функциональными расстройствами кишечника, такими как язвенная диспепсия, некардиальную боль в груди и синдром раздраженного кишечника, боль, связанную с ишемией миокарда, послеоперационную боль, головную боль, зубную боль, дисменорею, невралгию, синдром фибромиалгии, комплексный регионарный болевой синдром (CRPS типов I и II), невропатические болевые синдромы (включая диабетическую невропатию, химиотерапевтически индуцированную невропатическую боль, ишиас, неспецифическую боль в пояснице, рассеянный склероз, невропатию, связанную с ВИЧ, постгерпетическую невралгию, невралгию тройничного нерва) и боль, возникающую в результате физической травмы, ампутации, злокачественного новообразования, токсинов или хронических воспалительных состояний. В предпочтительном варианте осуществления боль представляет собой соматическую боль или висцеральную боль.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу предотвращения или лечения боли, связанной с синдромом раздраженного кишечника, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного

количества соединения формулы (I), определенного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Считается, что вышеуказанные способы могут быть использованы для профилактического и терапевтического лечения любых видов, включая, но этим не ограничиваясь, всех млекопитающих, например, людей, собак, кошек, крупный рогатый скот, лошадей, свиней, овец, крыс и мышей, а также цыплят, птиц, рептилии и низшие организмы, такие как бактерии.

В настоящем изобретении предложена также фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения, определенного выше, или его фармацевтически приемлемую соль вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

Предполагается, что термин «композиция» охватывает состав активного ингредиента с инкапсулирующим веществом в качестве носителя, образуя капсулу, в которой активный ингредиент (с другим носителем или без него) окружен носителями.

Хотя соединения, описанные выше, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть единственным активным ингредиентом, вводимым субъекту, в объем изобретения входит введение вместе с соединением другого активного ингредиента(ов). В одном или нескольких вариантах осуществления предусматривается, что субъекту будет вводиться комбинация двух или более соединений по изобретению. Предполагается, что соединение(я) также можно вводить с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами в комбинации. Комбинация может допускать раздельное, последовательное или одновременное введение соединения(й), описанного выше, с другим активным ингредиентом(ами). Комбинация может быть представлена в виде фармацевтической композиции.

Термин «комбинация», как используется в настоящем документе, относится к композиции или набору частей, где партнеры по комбинации, определенные выше, могут дозироваться независимо или независимо, или путем использования различных фиксированных комбинаций с различными количествами партнеров по комбинации, то есть одновременно или в разные моменты времени. Партнеры по комбинации затем могут быть введены одновременно или в хронологическом порядке, то есть в разные моменты времени и с одинаковыми или разными интервалами времени для любой части набора частей. Соотношение общих количеств партнеров по комбинации, которые должны вводиться в комбинации, может варьироваться, например, для того, чтобы соответствовать потребностям популяции пациентов, подлежащих лечению, или потребностям отдельного пациента, разные потребности которых могут быть определяться возрастом, полом, весом тела и т. д. пациента.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, способ введения и природа фармацевтически приемлемого носителя будут зависеть от природы состояния и субъекта, подлежащего лечению. Полагают, что выбор конкретного носителя или системы доставки и пути введения может быть легко определен специалистом в данной области.

При приготовлении любого состава, содержащего активное соединение, следует позаботиться о том, чтобы активность соединения не нарушалась в процессе и чтобы соединение могло достигать своего места действия без разрушения. В некоторых обстоятельствах может потребоваться защита соединения с помощью известных в данной области средств, таких как, например, микрокапсуляция. Точно так же выбранный путь введения должен быть таким, чтобы соединение достигало своего места действия.

Специалисты в данной области могут легко определить подходящие составы для соединений по настоящему изобретению, используя традиционные подходы. Идентификация предпочтительных диапазонов pH и подходящих наполнителей, например антиоксидантов, является обычной в данной области. Для обеспечения значений pH желаемого диапазона обычно используются буферные системы, и они включают буферы на основе карбоновой кислоты, например ацетатный, цитратный, лактатный и сукцинатный. Для таких составов доступно множество антиоксидантов, включая фенольные соединения, такие как ВНТ или витамин Е, восстановители, такие как метионин или сульфит, и хелаторы металлов, такие как EDTA.

Предполагается, что, когда соединения по изобретению предназначены для контроля абсорбции соединения через просвет кишечника и последующего системного воздействия соединений, предпочтительным путем введения будет пероральное или энтеральное введение. Для пероральных и энтеральных составов по настоящему изобретению активное соединение может быть составлено с инертным разбавителем или с усвояемым съедобным носителем, или оно может быть заключено в желатиновую капсулу с твердой или мягкой оболочкой, или оно может быть спрессовано в таблетки, или оно может быть включено непосредственно в продукт питания. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть составлено с эксципиентами и использоваться в виде глотаемых таблеток, буккальных или сублингвальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и тому подобное. Количество активного соединения в таких терапевтически полезных композициях является таким, чтобы была получена подходящая дозировка.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и тому подобное также могут содержать компоненты, перечисленные ниже: связующее, такое как смола, камедь, кукурузный крахмал или желатин; наполнители, такие как дикальций фосфат; разрыхлитель, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и тому подобное; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; и может быть добавлен подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или ароматизатор, такой как мята перечная, масло грушанки или вишневый ароматизатор. Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель. Могут присутствовать различные другие материалы в качестве покрытий или для изменения иным образом физической формы дозированной единицы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или и тем, и другим. Сироп или эликсир может содержать активное соединение, сахарозу в

качестве подсластителя, метил и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Конечно, любой материал, используемый при приготовлении любой лекарственной формы, должен быть фармацевтически чистым и практически нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, соединения по изобретению могут быть включены в препараты и составы с замедленным высвобождением, включая такие, которые обеспечивают специфическую доставку активного пептида в конкретные области кишечника.

Жидкие препараты также можно вводить энтерально через желудок или пищеводную трубку. Энтеральные составы могут быть изготовлены в виде суппозиториев путем смешивания с соответствующими основами, такими как эмульгирующие основы или водорастворимые основы.

Предполагается, что, когда соединения по изобретению предназначены для направленной доставки к подвергнутому эндоцитозу PAR_2 , предпочтительным путем введения будет парентеральное введение. Соединения, описанные выше, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть представлены в виде парентеральных лекарственных форм, включая такие, которые подходят для внутривенной, интратекальной и интрацеребральной или эпидуральной доставки. Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные инъекционные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов. Они должны быть стабильными в условиях производства и хранения и могут быть защищены от восстановления или окисления и загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии или грибки.

Растворитель или дисперсионная среда для инъекцируемого раствора или дисперсии могут содержать любую из обычных систем растворителей или носителей для активного соединения и может содержать, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. При необходимости может быть осуществлена защита от действия микроорганизмов путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобное. Во многих случаях предпочтительным будет включение агентов для регулирования осмолярности, например, сахаров или хлорида натрия. Предпочтительно, состав для инъекции будет изотоническим с кровью. Пролонгированная абсорбция инъекцируемых композиций может быть достигнута путем использования в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина. Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, могут доставляться любым подходящим путем, включая внутривенную, внутримышечную, внутримозговую, интратекальную, эпидуральную инъекцию или инфузию.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения соединений по изобретению в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, такими как перечисленные выше, по мере необходимости, с последующей стерилизованной фильтрацией. Обычно дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка или лиофильная сушка предварительно стерильно отфильтрованного раствора активного ингредиента плюс любых дополнительных желательных ингредиентов.

Соединения по настоящему изобретению также возможно, но не обязательно, вводить местно, интраназально, интравагинально, интраокулярно и тому подобное. Соединения по настоящему изобретению также можно вводить путем ингаляции в виде аэрозольного распылителя из дозатора или контейнера под давлением, который содержит пропеллент, такой как газообразный диоксид углерода, дихлордифторметан, азот, пропан или другой подходящий газ или комбинацию газов. Соединения также можно вводить с использованием небулайзера.

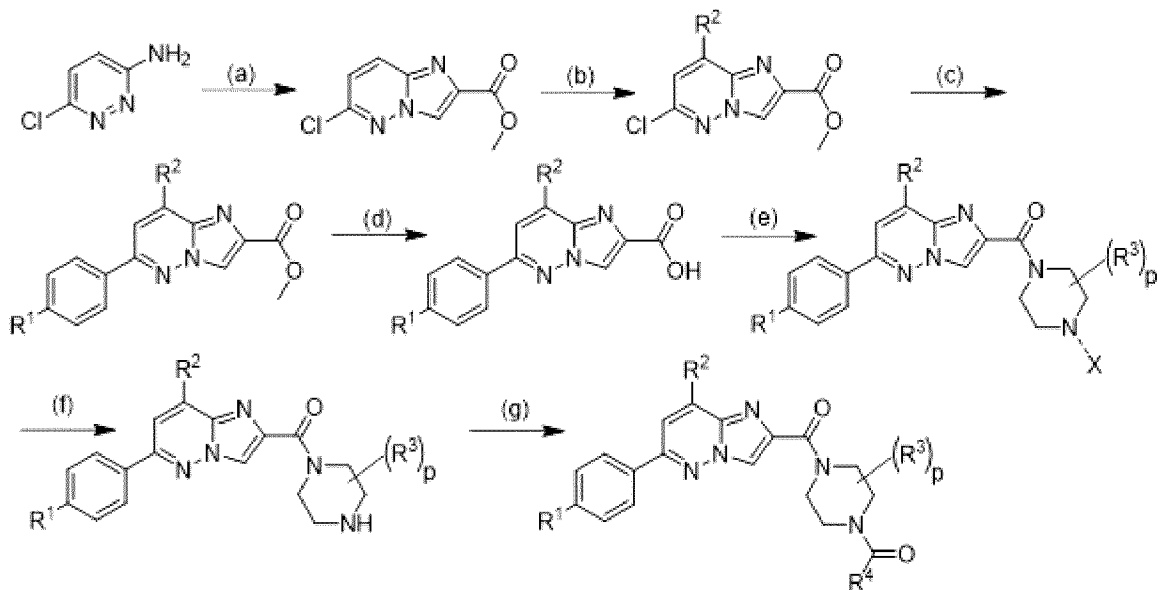
Фармацевтически приемлемые носители и/или разбавители включают любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным ингредиентом, предполагается их использование в терапевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

Особенно удобно составлять композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозировки. Единичная лекарственная форма, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для млекопитающих, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтически приемлемым носителем. Спецификация для новых стандартных лекарственных форм по изобретению предписана и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик активного вещества и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничений, присущих технике смешивания активных веществ для лечения заболевания у живых субъектов, имеющих болезненное состояние, при котором ухудшается физическое здоровье, как подробно описано в настоящем документе.

Как указано выше, основной активный ингредиент может быть составлен для удобного и эффективного введения в терапевтически эффективных количествах с подходящим фармацевтически приемлемым носителем в стандартной лекарственной форме. Стандартная лекарственная форма может, например, содержать основное активное соединение в количествах от 0,25 до 2000 мг. Выраженное в пропорциях, активное соединение может присутствовать в количестве от около 0,25 до около 2000 мг/мл носителя. В случае композиций, содержащих дополнительные активные ингредиенты, дозировки определяются исходя из обычной дозы и способа введения указанных ингредиентов.

Как используется в настоящем документе, термин «эффективное количество» относится к количеству соединения, которое при введении в соответствии с желаемой схемой дозирования обеспечивает желаемую терапевтическую активность. Дозирование может происходить один раз или с интервалами в несколько минут или часов или непрерывно в течение любого из этих периодов. Подходящие дозировки могут находиться в диапазоне около от 0,1 нг на кг массы тела до 1 г на кг массы тела на дозировку. Типичная дозировка находится в диапазоне от 1 мкг до 1 г на кг массы тела на дозировку, например, находится в диапазоне от 1 мг до 1 г на кг массы тела на дозировку. В одном воплощении дозировка может находиться в диапазоне от 1 до 500 мг на кг массы тела на дозировку. В другом осуществлении, дозировка может находиться в диапазоне от 1 до 250 мг на кг массы тела на дозировку. В еще одном варианте осуществления дозировка может находиться в диапазоне от 1 до 100 мг на кг массы тела на дозировку, например до 50 мг на массу тела на дозировку.

Общие стратегии синтеза соединений формулы (I) представлены на следующей общей схеме, в следующих общих способах синтеза и в конкретных вариантах синтеза промежуточных продуктов.



Общая схема 1

Общие способы синтеза:

Общий способ 1: Получение амида А

Соответствующую карбоновую кислоту (1,0 экв.) растворяют в ДМФА или ДМСО (0,15-0,3 М), затем добавляют HBTU или HATU (1,1-1,5 экв.), добавляют соответствующий амин (1,1-1,2 экв.) и DIPEA (2,5-3,5 экв.). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение от 45 минут до 16 ч. Может быть использован любой из указанных способов:

1) Добавляют воду и твердые вещества отфильтровывают и промывают, получая желаемый продукт; или

2) Добавляют воду вместе с EtOAc и фазы разделяют. Органическую фазу промывают еще 2 раза водой и насыщенным соевым раствором (смесь 1:1), сушат над MgSO₄, фильтруют и упаривают при пониженном давлении. Продукт очищают на силикагеле и/или препаративной ВЭЖХ.

Общий способ 2: Получение амида В

Соответствующую карбоновую кислоту (1,0 эквив.), соответствующий амин (1,1-1,2 эквив.) и DIPEA (от 2,5 до 3,5 эквив.) растворяют в ДМФ или ДМСО (0,15-0,3М), затем добавляют PyBOP или PyOxim (от 1,1 до 1,5 эквив.). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение от 45 минут до 16 ч. Может быть использован любой из указанных способов:

1) Добавляют воду и твердые вещества отфильтровывают и промывают, получая желаемый продукт; или

2) Добавляют воду вместе с EtOAc и фазы разделяют. Органическую фазу промывают еще 2 раза 1М HCl и затем насыщенным соевым раствором, сушат над MgSO₄, фильтруют и упаривают при пониженном давлении. Продукт очищают на силикагеле и/или препаративной ВЭЖХ.

Общий способ 3: Твердая фаза А

NH₂-PEG₁₂-Asp(OChol)-смола: Синтез спейсер-липидного конъюгата получают ручным синтезом пептидов со стандартной Fmoc химией на смоле NovaSyn®TG^R R (загрузка 0,18 ммоль/г от компании NovaBiochem). Связывание Fmoc-Asp(OChol)-ОН (1,5 эквив.) с (1Н-бензотриазол-1-илокси)(три-1-пирролидинил)фосфоний гексафторфосфатом (PyBOP, 2 эквив.) в дихлорметане (DCM) с активацией *in situ*, используя диизопропилэтиламин (DIPEA, 3 эквив.) в течение 3 ч. Удаление защитной Fmoc достигается с использованием 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде (ДМФ). Fmoc-PEG₁₂-ОН (2 эквив.) связывают со связанным со смолой NH₂-Asp(OChol) с PyBOP (2 эквив.) и DIPEA (3 эквив.) в DCM. Удаление защитной Fmoc достигается с использованием 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде (ДМФ). После окончательного снятия защиты антагонисты связывают с конъюгатом спейсер-липид на смоле. Кислота (2-3 экв.) связывается со связанным со смолой NH₂-PEG₁₂-Asp(OChol)-смола (250 мг) с PyBOP (2 эквив.) и DIPEA (3 эквив.) в DCM в течение ночи. Затем конструкцию отщепляют от смолы с использованием 95% трифторуксусной кислоты и очищают высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с обращенной фазой

(колонка Phenomenex Luna C8, Lane Cove, Australia) с 0,1% ТФУ/Н₂O и 0,1% ТФУ/АСN в качестве растворителей, предоставляя антагонисты липидов в виде вязких масел.

Общий способ 4: Твердофазный синтез липидных конъюгатов с антагонистами

Антагонист-PEG-спейсер-Asp(OChol)-смола: Синтез конъюгата спейсер-липид (PEG₂₋₁₂) с антагонистами, аминокислотами и муциновой кислотой проводили с использованием стандартного способа связывания, как описано в общем способе 11. Завершенные липидные конъюгаты затем расщепляли и очищали, как описано в общем способе 11.

Общие методы синтеза групп липидного якоря (LA) трехсторонних соединений формулы (I) изложены ниже

Синтез холестерилгликолевой кислоты, 3-холестериламина и холестерилглицина описан в литературе (Hussey, S. L. et al., J. Am. Chem. Soc. **2001**, 123, 12712-12713; Hussey, S. L. et al., Org. Lett. **2002**, 4, 415-418; Martin, S. E. et al., Bioconjugate Chem. **2003**, 14, 67-74). Липидные якоря формулы (Ша), имеющие амидную, сульфонамидную, мочевиновую или карбаматную функциональную группу в положении 3 стероидной структуры, могут быть получены из 3-холестериламина, например, 3-холестерилламин может взаимодействовать с янтарным ангидридом в присутствии DMAP с получением соответствующего сукцинилзамещенного соединения. Соответствующий сульфонамид может быть получен взаимодействием 3-холестериламина с хлорсульфонилюксусной кислотой, которую можно получить, как описано в литературе (Hinman, R. L. and Locatell, L. J. Am. Chem. Soc. **1959**, 81, 5655-5658). Соответствующая мочевина или карбамат могут быть получены согласно литературным методикам через соответствующий изоцианат (Knolker, H.-J. T. et al., Angew. Chem. Int. Ed. **1995**, 34, 2497; Knolker, H.-J. et al., Synlett **1996**, 502; Knolker, H.-J. and. Braxmeier, T. Tetrahedron Lett. **1996**, 37, 5861). Промежуточные соединения (Ша), имеющие фосфатный или карбоксиметилированный фосфат в положении 3 стероидной структуры, могут быть получены, как описано в литературе (Golebriewski, Keyes, Cushman, Bioorg. Med. Chem. **1996**, 4, 1637-1648; Cusinato, Habeler, et al., J. Lipid Res. **1998**, 39, 1844-1851; Himber, Missano, et al., J. Lipid Res. **1995**, 36, 1567-1585). Липидные якоря формулы (Ша), имеющие тиол в положении 3 стероидной структуры, могут быть получены, как описано в литературе (J. G. Parkes, J. G. et al., Biochim. Biophys. Acta **1982**, 691, 24-29), соответствующие карбоксиметилированные тиолы можно получить простым алкилированием, как описано для соответствующих аминов и спиртов. Липидные якоря формулы (Ша), имеющие производное дифторметиленсульфонона в положении 3 стероидной структуры, можно получить, как описано в литературе (Lapiene, J. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. **2004**, 14, 151-155). Введение различных боковых цепей в положение 17 липидных якорей формулы (Ша) может быть осуществлено путем использования литературных методик, исходя из дегидроизоандростерона или прегненолона (Bergmann, E. D. et al., J. Am. Chem. Soc. **1959**, 81, 1239-1243 и приведенные там ссылки). Липидные якоря формулы (Ша), которые получены из холестана, могут быть получены из соответствующих предшественников,

которые получены из холестерина, путем восстановления 5,6-двойной связи с использованием литературных методик, например, гидрированием в присутствии различных катализаторов переходных металлов.

Липидные якоря формулы (IIa), имеющие в положении 3 заместитель, содержащий кислород, получают аналогично тому, как описано для липидных якорей формулы (IIIa), исходя из эстрона. Липидные якоря формулы (IIa), имеющие заместитель в положении 3, содержащий азот, могут быть получены способом, подобным описанному для липидных якорей формулы (III), исходя из 3-аминоэстрона, который может быть получен, как описано в литературе (Zhang, X. and Sui, Z. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3071-3073; Woo, L. W. L. et al., *Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1996**, 57, 79-88). Липидные якоря формулы (IIa), имеющие в положении 3 заместитель, содержащий серу, могут быть получены способом, подобным описанному для липидных якорей формулы (III), исходя из 3-тиоэстрона, который может быть получен, как описано в литературе (Woo, L. W. L. et al., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1996**, 57, 79-88). Введение различных боковых цепей в положение 17 структуры эстрона может быть осуществлено с помощью метода Виттига с последующим гидрированием полученной двойной связи, как описано в литературе (Peters, R. H. et al., *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 24-26). Дальнейшие манипуляции внутри боковой цепи (например, образование двойных связей, введение циклоалкильных групп) могут быть осуществлены стандартными способами (конденсация по Suzuki и т. д.).

Липидные якоря формулы (Va), принадлежащие к классу церамидов, дегидроцерамидов и дигидроцерамидов, с различными углеводородными группами являются доступными, как указано в литературе (A.H. Merrill, Jr., Y.A. Hannun (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 311, Academic Press, 1999; Koskinen, P.M. and Koskinen, A.M.P. *Synthesis* **1998**, 1075). В частности, можно использовать сфингозиновое основание в качестве ключевого промежуточного соединения для всех липидных якорей формулы (Va), имеющих в положении 1 основной цепи сфингозина заместитель, содержащий кислород. Соответствующие аминокислотные производные можно получить путем замещения сульфонов, которые могут быть получены из спиртов в соответствии с известными методами. Алкилирование и ацилирование 1-амино или 1-гидрокси производных может быть осуществлено путем взаимодействия с бромуксусной кислотой и янтарным ангидридом, соответственно. Тиоацетилованное производное может быть получено путем замены сульфоната меркапто-уксусной кислотой. Фосфатные и сульфатные производные можно получить, как описано в литературе (A.H. Merrill, Jr., Y.A. Hannun (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 311, Academic Press, 1999; Koskinen, P.M. and Koskinen, A.M.P. *Synthesis* **1998**, 1075). Ацилирование, сульфонилирование, образование мочевины и карбамата может быть осуществлено стандартными способами. Липидные якоря формулы (Va), где R⁵ представляет собой амино или аминокислотную группу, могут быть получены исходя из сфингозинового основания, которое является доступным, как опубликовано Koskinen (Koskinen, P.M. and Koskinen, A.M.P. *Synthesis* **1998**, 1075), используя стандартные методики. Соответствующие 2-кислородзамещенные

сфинголипиды могут быть получены методом, опубликованным Yamanoi (Yamanoi, T. et al., *Chem. Lett.* **1989**, 335). Липидные якоря формулы (Va), где оба R⁸ представляют собой гидроксигруппу, можно получить путем бисгидроксилирования соответствующего алкена с использованием известных методик. Соответствующие моногидроксипроизводные могут быть получены, как описано в литературе (Howell, A.R. and Ndakala, A.J. *Curr. Org. Chem.* **2002**, 6, 365-391). Модификация заместителей R⁶ и R⁹ в липидных якорях формулы (Va) может быть осуществлена с помощью методов и стратегий, изложенных в различных обзорных статьях (Harwood, H.J. *Chem. Rev.* **1962**, 62, 99-154; Gensler, W.J. *Chem. Rev.* **1957**, 57, 191-280).

Липидные якоря формулы (VIa) можно получить с помощью методов, описанных в литературе (Müller, S. et al., *J. Prakt. Chem.* **2000**, 342, 779) и их комбинаций с методами, описанными для получения липидных якорей формулы (Va).

Липидные якоря формулы (VIIa), где R⁴ и R⁵ являются заместителями, содержащими кислород, могут быть получены исходя из коммерчески доступного (R)-(-)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанола, как указано выше (Schlueter, U. Lu, J. and Fraser-Reid, B. *Org. Lett.* **2003**, 5, 255-257). Вариация заместителей R⁶ в соединениях формулы (VIIa) может быть достигнута методами и стратегиями, изложенными в различных обзорных статьях (Harwood, H.J. *Chem. Rev.* **1962**, 62, 99-154; Gensler, W. J. *Chem. Rev.* **1957**, 57, 191-280). Липидные якоря формулы (VIIa), где R⁴ и R⁵ являются заместителями, содержащими азот, могут быть получены либо из соответствующих кислородзамещенных систем путем нуклеофильного замещения соответствующих сульфонов и дальнейших модификаций, как указано выше, либо исходя из 1,2,3-триаминопропана, который можно получить, как описано в литературе (Henrick, K. et al., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1982**, 225-227).

Липидные якоря формулы (VIIIa) можно получить аналогично липидным якорям формулы (VIa) или, альтернативно, путем метатезиса с замыканием кольца ω-этенилированных промежуточных соединений липидных якорей формулы (VIIa).

Липидные якоря формул (IXa) и (Xa) можно получить с помощью стратегий синтеза, описанных в литературе (Xue, J. and Guo, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2015-2018; Xue, J. and Guo, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 16334-16339; Xue, J. et al., *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 4020-4029; Shao, N., Xue, J. and Guo, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1569-1573) и их комбинаций с методами, описанными выше для получения липидных якорей формул (Va) и (VIIa).

Липидные якоря формул (XIa), (XIIa) и (XIIIa) можно получить путем полного синтеза, следуя стратегиям синтеза, описанным в литературе (Knolker, H.-J. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, 28, 151-157; Knolker, H.-J. and Reddy, K. R. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4303-4427; Knolker, H.-J. and Knoll, J. *Chem. Commun.* **2003**, 1170-1171; Knolker, H.-J. *Curr. Org. Synthesis* **2004**, 1).

Липидные якоря формулы (XIVa) могут быть получены путем синтеза индола по Неницеску, исходя из 4-метокси-3-метилбензальдегида с получением 6-метокси-5-

метилиндола. Расщепление эфира, образование трифлата и конденсация по Соногашира приводит к соответствующему 6-алкинилзамещенному 5-метилиндолу. Формилирование по Нильсмейеру и последующее добавление нитрометана дает производное 3-нитровинилзамещенного индола, которое подвергается общему гидрированию, приводящему к образованию 6-алкилзамещенного 5-метилтриптамина. Ацилирование аминогруппы с использованием сукцинилангидрида завершает получение.

Способы получения трехсторонних соединений, описанные в настоящем документе, очевидны для специалистов в данной области техники и будут включать стадии а) определения расстояния между (а) фосфорильной головной группой(ами) или эквивалентной головной группой липидного якоря и сайтом связывания и/или взаимодействия ингибитора передачи сигналов эндосомальной PAR₂; б) выбор линкера, который способен охватить расстояние, как определено в (а); и с) связывание липидного якоря и ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂ с помощью линкера, выбранного в (б).

В настоящем документе приведены соответствующие рабочие примеры такого способа. Специалист в данной области может определить соответствующие сайты связывания или сайты взаимодействия данного или потенциального ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂ и, соответственно, определить расстояние между (а) фосфорильной головной группой(ами) или эквивалентной головной группой липидного якоря и сайтом связывания и/или взаимодействия ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂. Такие способы включают, но этим не ограничиваются, молекулярное моделирование, анализы *in vitro* и/или молекулярного взаимодействия или связывания (например, дрожжевые дву- или тригибридные системы, определение пептидов, оверлейные анализы, фаговый дисплей, бактериальный дисплей, рибосомный дисплей), атомарную силовую микроскопию, а также спектроскопические методы и рентгеновскую кристаллографию. Кроме того, для верификации выведенных сайтов взаимодействия данного ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂ или потенциального ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂ и его соответствующей мишени могут быть использованы такие методы, как сайт-направленный мутагенез.

Специалист в данной области поймет, что выбор линкера включает в себя выбор линкеров, известных в данной области, а также создание и использование новых линкеров, например, путем молекулярного моделирования и соответствующего синтеза или других способов, известных в данной области.

Термин «охват», как используется в настоящем документе, со ссылкой на стадию б), относится к длине линкера, выбранного для размещения ингибитора передачи сигналов эндосомального PAR₂ в правильном локусе рецептора, когда липидный якорь образует часть липидного слоя эндосом.

Опытный пользователь легко может вывести, проверить и/или оценить липофильность данного трехстороннего соединения, а также отдельного фрагмента,

описанных в настоящем документе. Соответствующие тестовые анализы для определения нацеливания на эндосомную GPCR представлены в настоящем документе в примерах.

Специалист в данной области поймет, что цель линкерного фрагмента состоит в том, чтобы соединить липидный якорь с ингибитором передачи сигналов эндосомального PAR₂, чтобы позволить ингибитору передачи сигналов эндосомального PAR₂ взаимодействовать с PAR₂, когда липидный якорь закреплен в мембране эндосомы. Липидный якорь и линкер будут содержать функциональные группы, позволяющие им двоим быть ковалентно связанными. Природа функциональной группы липидного якоря никоим образом не ограничена и может включать, например, аминогруппу, которая образует амидную связь с линкером, или гидроксильную группу или группу карбоновой кислоты, которые образуют эфирную или сложноэфирную связь с линкером.

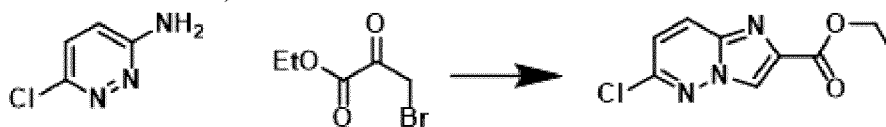
Аналогично, специалист в данной области поймет, что выбор функциональной группы на конце линкера, который соединяется с ингибитором передачи сигналов эндосомального PAR₂, будет продиктован прежде всего доступными функциональными группами на выбранном ингибиторе передачи сигналов эндосомального PAR₂. Например, если ингибитор передачи сигналов эндосомального PAR₂ содержит группу свободного амина или карбоновой кислоты, предусматривается, что функциональная группа линкера будет содержать комплементарную карбоновую кислоту или амин для образования амидной связи.

Когда соединения по настоящему изобретению требуют очистки, могут быть использованы хроматографические методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с обращенной фазой. Пептиды могут быть охарактеризованы масс-спектрометрией и/или другими подходящими методами.

Далее изобретение описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры:

Синтез предшественников

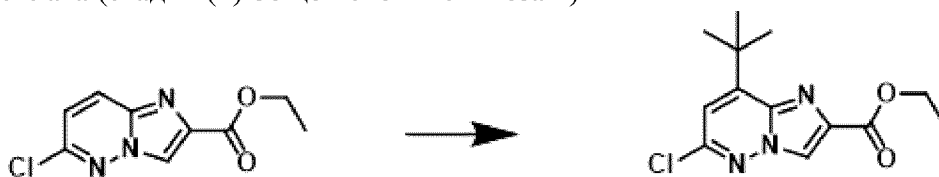
Пример 1: Синтез этил 6-хлоримидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (стадия (а) общей схемы синтеза 1)



В круглодонной 1 л-овой колбе растворяли в ДМФ (300 мл) 6-хлорпиридазин-3-амин (30 г, 0,2316 моль). Затем по частям добавляли этил 3-бром-2-оксо-пропаноат (38 мл, 0,3 моль). Смесь выдерживали при температуре 50°C в течение 1,5 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры на бане вода/лед и в реакционную смесь добавляли по каплям в течение 2 ч воду (600 мл). Затем перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Образовавшийся осадок фильтровали по Бюхнеру (~30 мин). Осадок промывали 3×500 мл воды и сушили в вакууме на воронке Бюхнере в течение 2 час, затем 20 час в вакуумной печи при температуре 40°C с получением этил 6-хлоримидазо[2,1-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (29,9 г, 57%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (401 МГц,

ДМСО) δ 8,85 (с, 2H), 8,27 (д, $J=9,6$ Гц, 3H), 7,47 (д, $J=9,6$ Гц, 3H), 4,33 (кв, $J=7,0$ Гц, 6H), 1,32 (т, $J=7,1$ Гц, 9H).

Пример 2: Синтез этил 8-трет-бутил-6-хлоримидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (стадия (b) общей схемы синтеза 1)

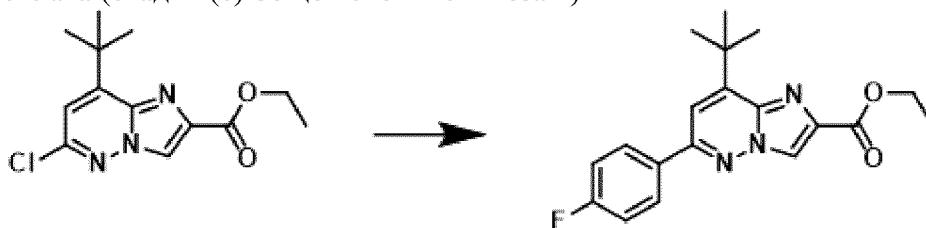


В трехгорлую круглодонную 1 л-овую колбу, снабженную капельной воронкой, вводом для N_2 и обратным холодильником, помещали воду (98,10 мл) и трифторуксусную кислоту (10,72 мл, 139,1 ммоль). По окончании экзотермической реакции добавляли этил 6-хлоримидазо[2,1-*b*]пиридазин-2-карбоксилат (21 г, 92,72 ммоль), 2,2-диметилпропановую кислоту (37,88 г, 21,30 мл, 370,9 ммоль) и ацетонитрил (200 мл), затем $AgNO_3$ (7,88 г, 46,36 ммоль). Реакционную смесь оборачивали алюминиевой фольгой и нагревали до температуры $80^\circ C$. Через капельную воронку в течение 30 мин добавляли раствор персульфата аммония (35,24 г, 166,9 ммоль) в воде (98,10 мл). Когда добавление было завершено, капельную воронку удаляли и смесь снабжали обратным холодильником и нагревали при температуре $80^\circ C$ в течение 30 минут.

Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли 200 мл этилацетата. Фильтрат охлаждали до $0^\circ C$ на бане лед/вода и добавляли NH_4OH до $pH=8$. Через 20 мин смесь фильтровали через целит и промывали этилацетатом. Слои разделяли и водный слой экстрагировали 1×200 мл этилацетата. Объединенные органические экстракты промывали 2×200 мл раствора 1:1 1н NaOH/насыщенный солевой раствор. Органическую фазу снова фильтровали через целит для удаления солей Ag, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая 35 г темной пенистой смолы.

Сырой продукт хроматографировали на силикагеле (дихлорметан) с получением этил 8-трет-бутил-6-хлор-имидазо[2,1-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (7,28 г, 28%) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,81 (с, 1H), 7,17 (с, 1H), 4,35 (кв, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,53 (с, 9H), 1,33 (т, $J=7,1$ Гц, 3H).

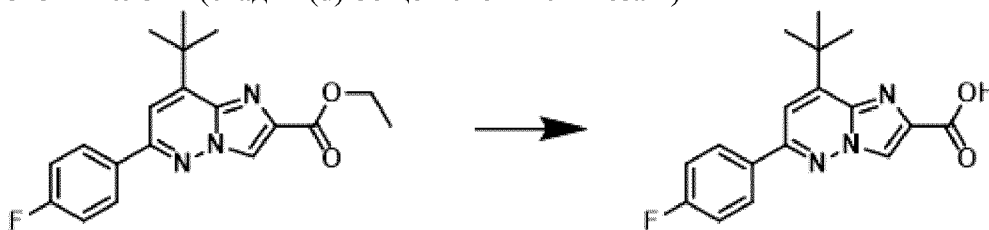
Пример 3: Синтез этил 8-трет-бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (стадия (с) общей схемы синтеза 1)



К раствору этил 8-трет-бутил-6-хлоримидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбоксилата (500 мг, 1,755 ммоль) в ДМФ (7 мл) добавляли (4-фторфенил)борную кислоту (280 мг, 2,004 ммоль), $PdCl_2(dppf)_2 \cdot DCM$ (30 мг, 0,03644 ммоль) и Na_2CO_3 (1,822 мл 2 М, 3,644 ммоль).

После дегазации путем барботирования N_2 в течение 5 мин смесь нагревали при температуре $80^\circ C$ в течение 18 ч. Добавляли воду вместе с этилацетатом и фазы разделяли. Органическую фазу промывали 2 раза водой и насыщенным соевым раствором (смесь 1:1), сушили над $MgSO_4$, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением этил 8-трет-бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбоксилата (545 мг, 90%) в виде твердого вещества. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,79 (с, 1H), 8,20-8,11 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,46-7,38 (м, 2H), 4,36 (кв, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,60 (с, 9H), 1,34 (т, $J=7,1$ Гц, 3H).

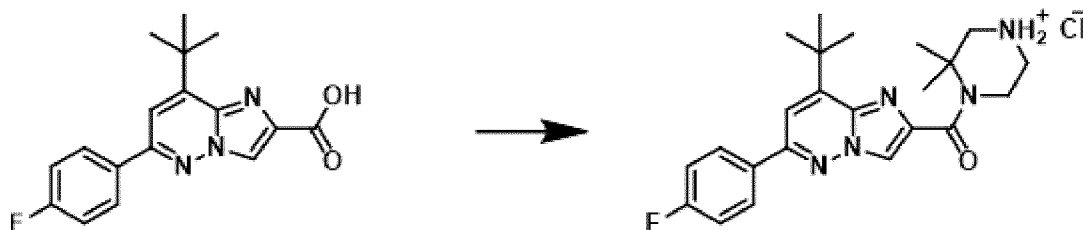
Пример 4: Синтез 8-трет-бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбоновой кислоты (стадия (d) общей схемы синтеза 1)



Этил 8-трет-бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбоксилат (8,3 г, 24,31 ммоль) растворяли в метаноле (388 мл) и добавляли NaOH (49 мл 2,5M). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли HCl (6н) до достижения кислотного pH. Затем добавляли воду и осаждали твердое вещество. Твердое вещество тщательно промывали и сушили с получением 8-трет-бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбоновой кислоты (6,85 г, 90%) в виде твердого вещества бежевого цвета. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 12,97 (с, 1H), 8,72 (с, 1H), 8,21-8,08 (м, 2H), 7,49 (с, 1H), 7,46-7,34 (м, 2H), 1,60 (с, 9H).

ЖХ-МС: 313,97 (M+H⁺), время удерживания: 3,06

Пример 5: Синтез 4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорида (стадии (e) и (f) общей схемы синтеза 1)



8-трет-Бутил-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбоновая кислота (5 г, 16 ммоль), ДМФ (120 мл), НАТУ (7,3 г, 19,2 ммоль), трет-бутил 3,3-диметилпиперазин-1-карбоксилат (4,1 г, 1,92 ммоль) и DIPEA (10 мл, 57,4 ммоль) давали трет-бутил 4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбоксилат, который растворяли в 4н растворе HCl в 1,4-диоксане (60 мл), получая 4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин гидрохлорид (6,5 г, 97%) в виде твердого вещества. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 9,71

(шир. с, 2H), 8,57 (с, 1H), 8,17-8,10 (м, 2H), 7,50 (с, 1H), 7,44-7,36 (м, 2H), 4,16-4,08 (м, 2H), 3,35-3,27 (м, 2H), 3,23-3,14 (м, 2H), 1,61 (с, 6H), 1,59 (с, 9H).

Пример 6: Синтез 1-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-1H-1,2,3-триазол-4-карбоновой кислоты



Азид натрия (5 ммоль) и трет-бутилбромацетат (5 ммоль) перемешивали в течение 72 ч в ДМФ (10 мл) при комнатной температуре. Добавляли пропионовую кислоту (5 ммоль) и CuI (0,5 ммоль) и перемешивание продолжали в течение дополнительных 48 час. pH реакционной смеси доводили до 4 добавлением 1M HCl и полученную смесь выливали в насыщенный солевой раствор. Водную фазу экстрагировали DCM, сушили над MgSO₄ и упаривали досуха. Сырой остаток очищали на силикагеле с получением указанного в заголовке продукта. 29,5%. ¹H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,76-7,63 (м, 2H), 5,42-5,19 (м, 2H), 1,43 (с, 9H). ЖХМС: R_f=2,90, m/z=225,9 (M-H, C₉H₁₂N₃O₄⁻).

Синтез I-343, Су5-холестанола и Су5-этилового эфира

Пример 7: Синтез (8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-ил)(2,2-диметил-4-(5-метил-1H-1,2,4-триазол-3-карбонил)пиперазин-1-ил)метанона (I-343).

5-Метил-1H-1,2,4-триазол-3-карбоновую кислоту (1,2 эквив.) растворяли в ДМСО и затем смешивали с NATU (1,2 эквив.), соответствующим амином (1,0 эквив.) и DIPEA (2,5 эквив.) (комнатная температура, в течение ночи.). Добавляли воду и твердые вещества отфильтровывали и промывали для получения указанного в заголовке продукта (выход 88%). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,52 (д, J=7,2 Гц, 1H), 8,18-8,10 (м, 2H), 7,48 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,45-7,36 (м, 2H), 4,34-3,66 (м, 6H), 2,43-2,30 (м, 3H), 1,61 (с, 6H), 1,56 (с, 3H), 1,54 (с, 3H), 1,48 (с, 3H). ЖХМС: R_f =3,37, m/z=519,3 (M+H, C₂₇H₃₁FN₈O₂⁺).

Пример 8: Синтез Су5-холестанола (Су5-Chol)

Цианин 5 конъюгировали с холестанолом через гибкий ПЭГ-линкер с помощью стандартного Fmoc твердофазного пептидного синтеза (SPPS) на смоле Fmoc-PAL-PEG-PS (Life Technologies, загрузка смолы 0,17 ммоль/г). Реакции снятия защиты Fmoc проводили с использованием 20% об./об. пиперидина в N, N-диметилформамиде (DMFA). Реакции связывания проводили с использованием Fmoc-защищенных аминокислот с O-(6-хлорбензотриазол-1-ил)-N, N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфатом (HCTU) в качестве связывающего агента и N, N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в качестве активирующего агента. Су5-Chol [Су5-PEG4-PEG3-PEG4-Asp(OChol)-NH₂] получали с помощью SPPS вручную, используя Fmoc-Asp(OChol)-OH, Fmoc-PEG4-OH, Fmoc-PEG3-OH и Fmoc-PEG4-OH в качестве аминокислот. После заключительной стадии снятия защиты N-конец закрывали, используя смесь Су5 кислоты, HCTU и DIPEA в ДМФ, и пептидную конструкцию затем отщепляли от смолы, используя смесь 95:2,5:2,5

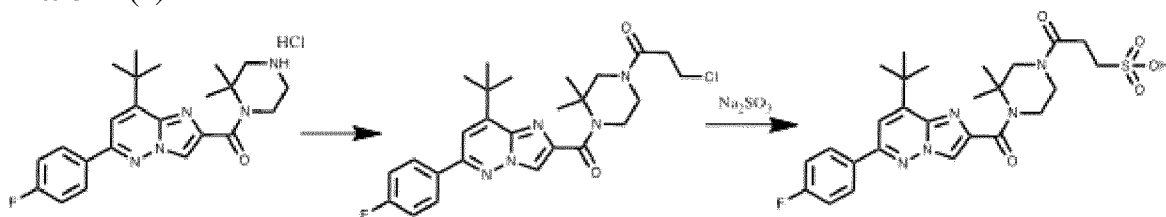
трифторуксусная кислота (ТФУ)/триизопропилсилан (TIPS)/вода (Jensen, D.D. et al., Sci Transl Med 2017, **9**(392): eaal3447).

Пример 9: Синтез Су5-этилового эфира

Синтезировали, используя тот же способ, что и в примере 8, за исключением того, что на первой стадии связывания Fmoc-Asp(OChol)-OH заменяли на Fmoc-Asp(OEt)-OH (Jensen, D.D. et al., Sci Transl Med 2017, **9**(392): eaal3447).

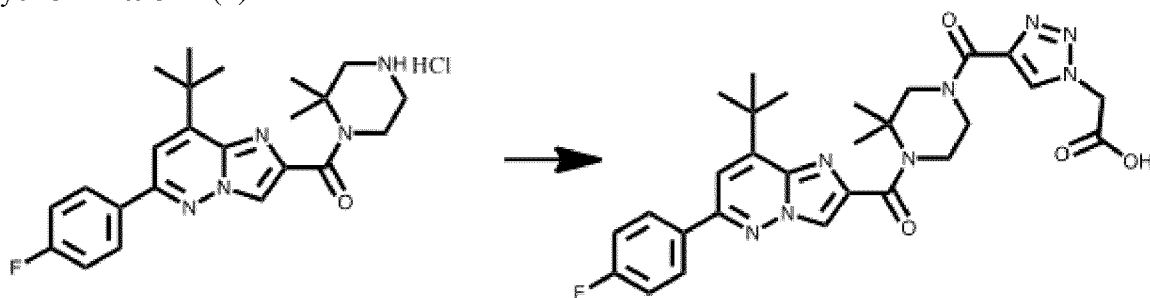
Синтез соединений по изобретению

Пример 10: Синтез 3-(4-(8-(*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ил)-3-оксопропан-1-сульфоновой кислоты (**1**).



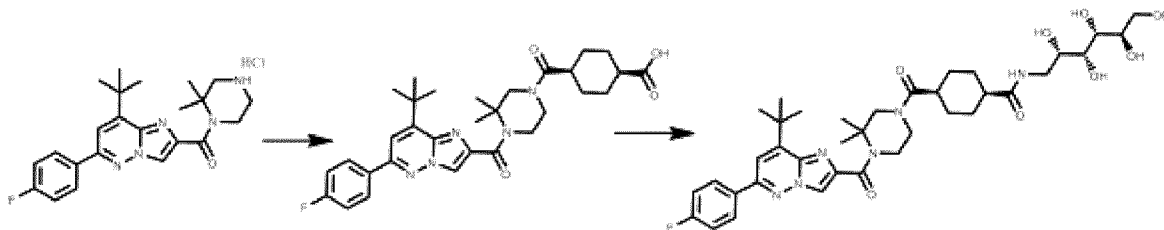
3-Хлоропропионовую кислоту (51 мг, 0,472 ммоль) активировали изобутилхлорформиаом (54 мг, 0,29 ммоль) в присутствии DIPEA (101 мг, 0,787 ммоль) в сухом ТГФ при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляли 4-(8-(*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорид (70 мг, 0,157 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали в течение еще 60 минут. Реакцию определяли как завершённую с помощью ЖХМС и гасили добавлением насыщенного бикарбоната натрия. Продукт экстрагировали DCM (3×), сушили над MgSO₄ и упаривали досуха. Сырую смесь повторно растворяли в EtOH (5 мл) и воде (5 мл) и добавляли Na₂SO₃ (99 мг, 0,787 ммоль); смесь нагревали при температуре 80°C в течение ночи. По данным ЖХМС реакцию считали завершённой, подкисляли ТФУ и очищали препаративной ВЭЖХ с получением указанного в заголовке продукта (**1**). 33,7 мг, 39,3% за 2 стадии. ¹H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,52 (д, J=4,2 Гц, 1H), 8,18-8,10 (м, 2H), 7,48 (с, 1H), 7,45-7,36 (м, 2H), 4,27-4,21 (м, 2H), 3,74-3,67 (м, 1H), 3,66-3,48 (м, 5H), 2,69-2,62 (м, 1H), 2,62-2,55 (м, 1H), 1,60-1,59 (м, 9H), 1,55 (с, 3H), 1,50 (с, 3H). ЖХМС (общий способ 13): R_f=3,66, m/z=546,2 (M+H, C₂₆H₃₃FN₅O₅S⁺).

Пример 11: Синтез 2-(4-(4-(8-(*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)уксусной кислоты (**2**)



В соответствии с общим способом 2 использовали 4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорид (пример 5) и 1-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-карбоновую кислоту (пример 6) с получением промежуточного эфира (91,8%), который подвергали удалению защитных групп с помощью ТФУ и DCM с получением указанного в заголовке продукта с количественным выходом. ЖХМС (общий способ 12): $R_f=3,56$, $m/z=562,9$ (M+H, $C_{28}H_{32}FN_8O_4^+$). 1H ЯМР (401 МГц, $CDCl_3$) δ 8,37 (с, 1H), 8,27 (д, $J=5,8$ Гц, 1H), 7,93 (dd, $J=8,8, 5,3$ Гц, 2H), 7,24 (д, $J=4,1$ Гц, 1H), 7,19 (т, $J=8,6$ Гц, 2H), 5,13-5,07 (м, 2H), 4,60-4,44 (м, 4H), 3,96-3,89 (м, 2H), 1,70 (с, 2H), 1,66 (с, 4H), 1,63-1,58 (м, 9H), 1,49-1,47 (м, 9H). ЖХМС: $R_f=3,71$, $m/z=619,0$ (M+H, $C_{32}H_{40}FN_8O_4^+$)

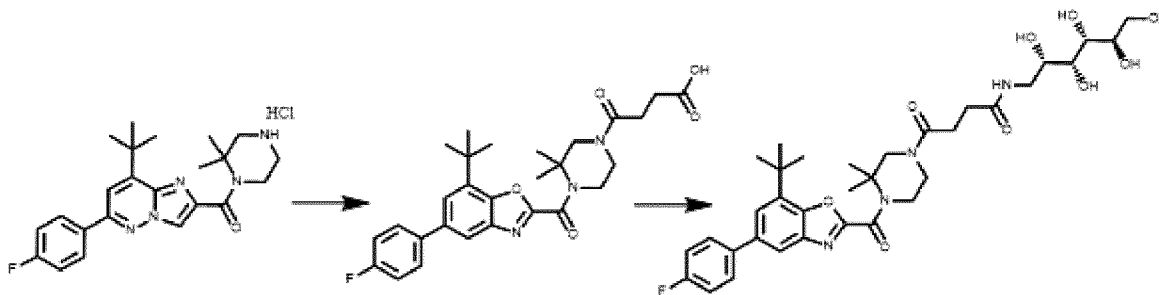
Пример 12: Синтез (1*S*,4*R*)-4-(4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-*N*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил)циклогексан-1-карбоксамид (3)



4-(8-(трет-Бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорид конденсировали с (1*S*,4*S*)-4-(метоксикарбонил)циклогексан-1-карбоновой кислотой в соответствии с общим способом 1. Сложный эфир растворяли в метаноле, затем добавляли 2М NaOH (2 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре до завершения гидролиза. Метанол удаляли при пониженном давлении и реакционную смесь нейтрализовали добавлением 1М раствора HCl. Твердые вещества отфильтровывали и промывали с получением желаемой промежуточной кислоты. 34%. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 12,11 (шир. с, 1H), 8,51 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 8,20-8,08 (м, 2H), 7,48 (д, $J=4,3$ Гц, 1H), 7,46-7,35 (м, 2H), 4,21-4,11 (м, 2H), 3,84-3,45 (м, 4H), 2,61-2,52 (м, 2H), 2,08-1,99 (м, 2H), 1,69-1,42 (м, 21H). ЖХМС (общий способ 13): $R_f=3,54$, $m/z=562,0$ (M-H, $C_{31}H_{37}FN_5O_4^-$).

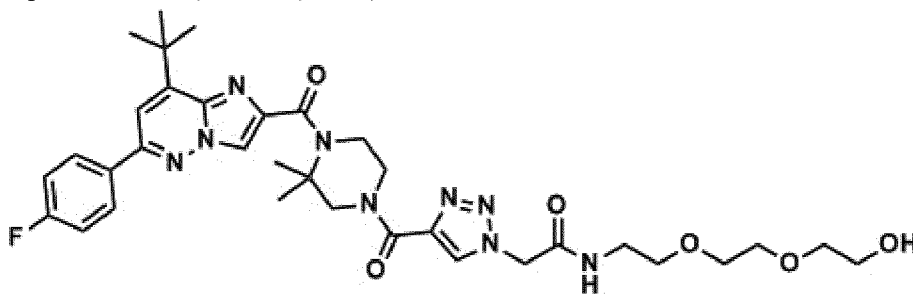
Промежуточную кислоту конденсировали с D-глюкамином в соответствии с общим способом 1 с получением указанного в заголовке продукта. 48%. 1H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,51 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,20-8,08 (м, 2H), 7,62-7,45 (м, 2H), 7,45-7,31 (м, 2H), 4,79-4,70 (м, 1H), 4,51-4,20 (м, 4H), 4,22-4,06 (м, 2H), 3,86-3,72 (м, 1H), 3,71-3,52 (м, 5H), 3,52-3,34 (м, 4H), 3,29-3,18 (м, 1H), 3,12-2,97 (м, 1H), 2,77-2,57 (м, 1H), 2,40-2,28 (м, 1H), 2,04-1,84 (м, 2H), 1,81-1,65 (м, 2H), 1,65-1,38 (м, 19H). ЖХМС: $R_f=3,28$, $m/z=727,0$ (M+H, $C_{37}H_{52}FN_6O_8^+$).

Пример 13: Синтез 4-(4-(7-(трет-бутил)-5-(4-фторфенил)бензо[*d*]оксазол-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ил)-4-оксо-*N*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил)бутанамида (4)



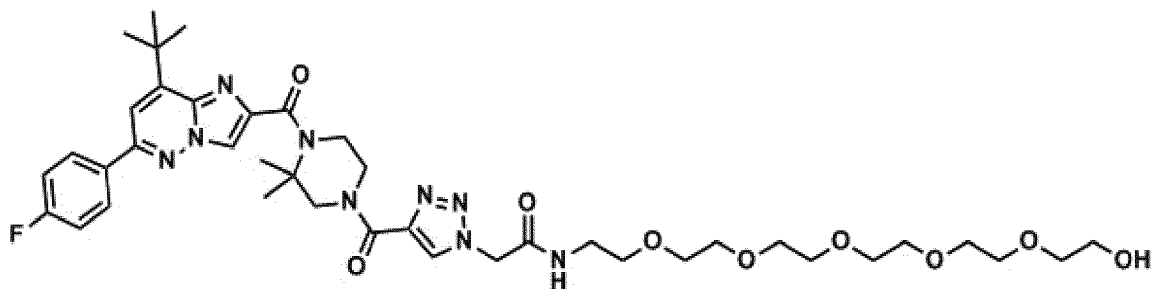
4-(8-(трет-Бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорид (120 мг, 0,27 ммоль) суспендировали в DCM и добавляли янтарный ангидрид (1,5 эквив.) и DIPEA (2 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, выливали в 1н раствор HCl и экстрагировали DCM. Объединенные органические фазы сушили над MgSO₄, упаривали досуха и очищали на коротком слое из силикагеля с помощью DCM:MeOH с получением 112,2 мг (81,7%) 4-(4-(7-(трет-бутил)-5-(4-фторфенил)бензо[*d*]оксазол-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ил)-4-оксобутановой кислоты. Промежуточную кислоту конденсировали с D-глюкамином в соответствии с общим способом 1 с получением указанного в заголовке продукта **4**. 66%. ¹H ЯМР (401 МГц, ДМСО) δ 8,52 (д, J=7,1 Гц, 1H), 8,19-8,08 (м, 2H), 7,77 (кв, J=5,8 Гц, 1H), 7,48 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,45-7,36 (м, 2H), 4,31-4,10 (м, 2H), 3,72 (т, J=5,4 Гц, 1H), 3,68-3,54 (м, 5H), 3,54-3,43 (м, 2H), 3,43-3,33 (м, 2H), 3,26 (дт, J=10,6, 5,7 Гц, 1H), 3,09-2,96 (м, 1H), 2,64-2,51 (м, 2H), 2,38 (дд, J=12,8, 6,7 Гц, 2H), 1,59 (д, J=3,5 Гц, 9H), 1,55 (с, 3H), 1,49 (с, 3H). ЖХМС (общий способ 13): R_f=3,27, m/z=672,9 (M+H, C₂₇H₃₃FN₅O₄⁺).

Пример 14: Синтез 2-(4-(4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-N-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этил)ацетамида (**5**)



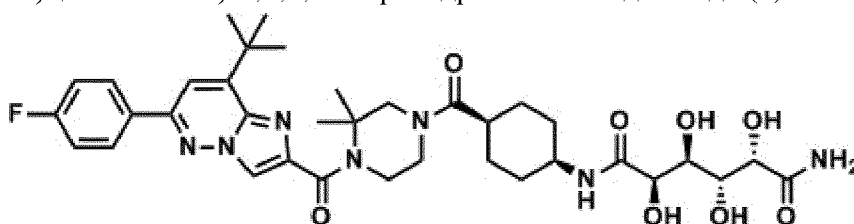
Синтезировали согласно общему способу 2 с использованием продукта примера 11 и 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этан-1-олом, получая указанный в заголовке продукт в виде вязкого масла. ЖХМС: R_f=3,31, m/z=693,9 (M+H, C₃₄H₄₅FN₉O₆⁺).

Пример 15: Синтез 2-(4-(4-(8-(трет-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-N-(17-гидрокси-3,6,9,12,15-пентаоксагептадецил)ацетамида (**6**)



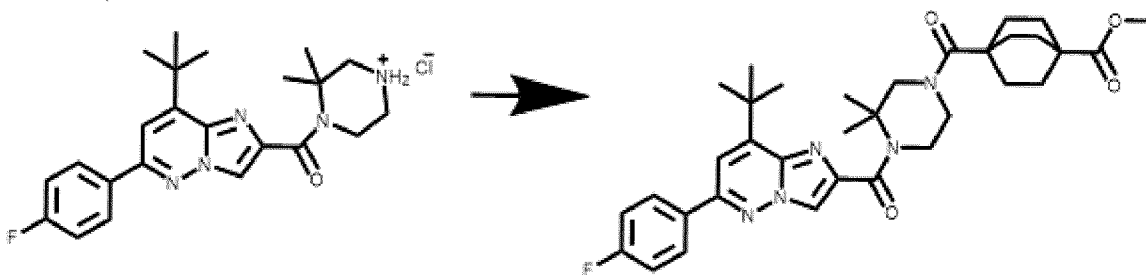
Синтезировали согласно общему способу 2 с использованием продукта примера 11 и 17-амино-3,6,9,12,15-пентаоксагептадекан-1-ола с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла. ЖХМС: $R_f=3,32$, $m/z=825,8$ ($M+H$, $C_{40}H_{57}FN_9O_9^+$).

Пример 16: Синтез (2R,3S,4R,5S)-N1-((1s,4S)-4-(4-(8-*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)циклогексил)-2,3,4,5-тетрагидроксигександиамида (7)



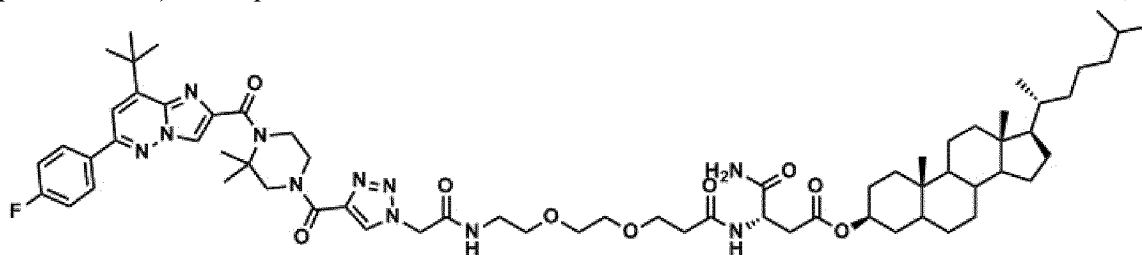
Синтезировали согласно общему способу 2 с использованием смолы диацетонид муциновой кислоты-Rink AM и (4-((1s,4s)-4-аминоциклогексан-1-карбонил)-2,2-диметилпиперазин-1-ил)(8-*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-ил)метанона с получением указанного в заголовке продукта в виде аморфного твердого вещества. ЖХМС: $R_f=3,36$, $m/z=709,8$ ($M+H-NH_2$, $C_{36}H_{46}FN_6O_8^+$)

Пример 17: Синтез метил 4-(4-(8-*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)бицикло[2,2,2]октан-1-карбоксилата (8)



В соответствии с общим способом 1 использовали 4-(8-*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-ий хлорид (пример 5) и 4-(метоксикарбонил)бицикло[2,2,2]октан-1-карбоновую кислоту с получением указанного в заголовке продукта с выходом 82%. 1H ЯМР (401 МГц, $CDCl_3$) δ 8,37 (с, 1H), 7,99-7,89 (м, 2H), 7,26 (с, 1H), 7,24-7,17 (м, 2H), 4,46-4,31 (м, 2H), 3,92-3,71 (м, 4H), 3,66 (с, 3H), 2,03-1,79 (м, 12H), 1,64 (с, 3H), 1,61 (с, 9H), 1,56 (с, 3H). ЖХМС: $R_f=3,83$, $m/z=603,9$ ($M+H$, $C_{34}H_{43}FN_5O_4^+$).

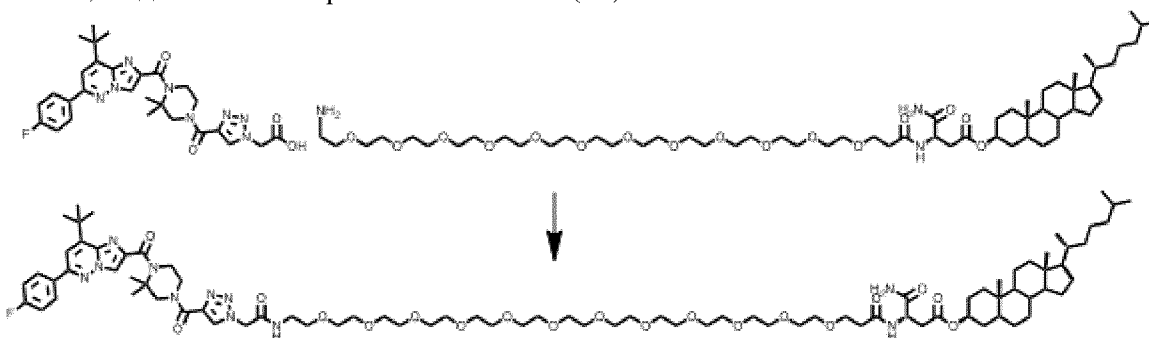
Пример 18: Синтез (3S,10S,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (14S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-14-карбамоил-2,12-диоксо-6,9-диокса-3,13-диазагексадекан-16-оата (**9**)



Синтезировали согласно общему способу 4 с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС (общий способ 13): $R_f=3,18$, $m/z=1206,56$ ($M+H$, $C_{66}H_{97}FN_{11}O_9^+$)

Пример 19: Синтез (3S,10S,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (44S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-44-карбамоил-2,42-диоксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-додекаокса-3,43-диазагексатетраконтан-46-оата (**10**)

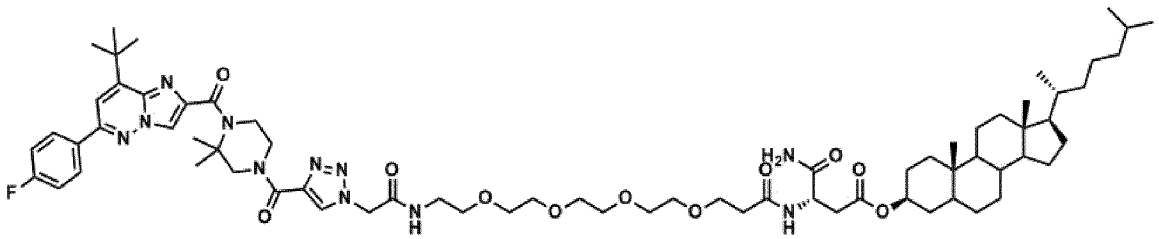


Стадия 1: Связанный со смолой NH_2 -PEG₁₂-Asp(OChol)-смола синтезировали в соответствии с общим способом 3. Амин отщепляли от смолы с использованием 95% трифторуксусной кислоты и упаривали досуха с получением сырого NH_2 -PEG₁₂-Asp(OChol).

Стадия 2: Следуя общему способу 2 использовали кислотный продукт примера 11 и NH_2 -PEG₁₂-Asp(OChol) со стадии 1 с получением указанного в заголовке продукта (45%). ¹H ЯМР (401 МГц, CDCl₃) δ 8,43 (д, $J=4,2$ Гц, 2H), 7,99-7,90 (м, 2H), 7,74-7,50 (м, 3H), 7,34-7,26 (м, 2H), 7,19 (дт, $J=19,6$, 7,5 Гц, 3H), 5,22 (с, 2H), 4,95-4,86 (м, 1H), 4,74-4,64 (м, 1H), 4,62-4,40 (м, 4H), 4,28-4,17 (м, 1H), 3,97-3,79 (м, 3H), 3,74-3,54 (м, 45H), 3,49 (дд, $J=10,9$, 5,7 Гц, 2H), 3,03 (дд, $J=17,2$, 5,1 Гц, 1H), 2,70 (дд, $J=17,9$, 5,9 Гц, 1H), 2,57 (т, $J=3,8$ Гц, 2H), 1,96 (дд, $J=9,3$, 3,1 Гц, 1H), 1,86-1,18 (м, 43H), 1,18-0,78 (м, 26H), 0,67-0,58 (м, 4H). ЖХМС (высокое разрешение): $m/z=824,5132$ ($M+2H$, $C_{86}H_{138}FN_{11}O_{19}^{2+}$).

Пример 20: Синтез (3S,10S,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (20S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-

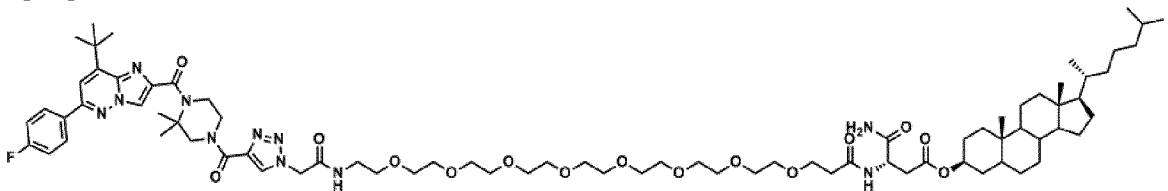
1,2,3-триазол-1-ил)-20-карбамоил-2,18-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19-диазадокозан-22-оата (**11**)



Синтезировали согласно общему способу 4 с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС: $R_f=3,28$, $m/z=1294,66$ ($M+H$, $C_{70}H_{105}FN_{11}O_{11}^+$).

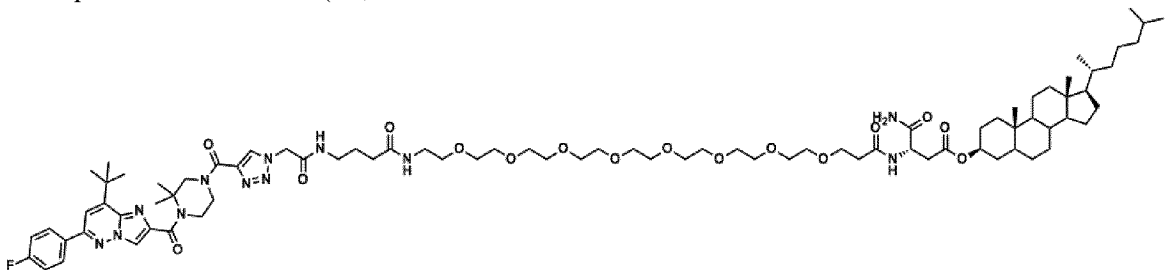
Пример 21: Синтез (3S,10S,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (32S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-32-карбамоил-2,30-диоксо-6,9,12,15,18,21,24,27-октаокса-3,31-диазатетратриаконтан-34-оата (**12**)



Синтезировали согласно общему способу 4 с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС: $R_f=2,83$, $m/z=1470,878$ ($M+H$, $C_{78}H_{121}FN_{11}O_{15}^+$).

Пример 22: Синтез (3S,10S,13R,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (37S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-37-карбамоил-2,7,35-триоксо-11,14,17,20,23,26,29,32-октаокса-3,8,36-триазанонатриаконтан-39-оат (**13**)

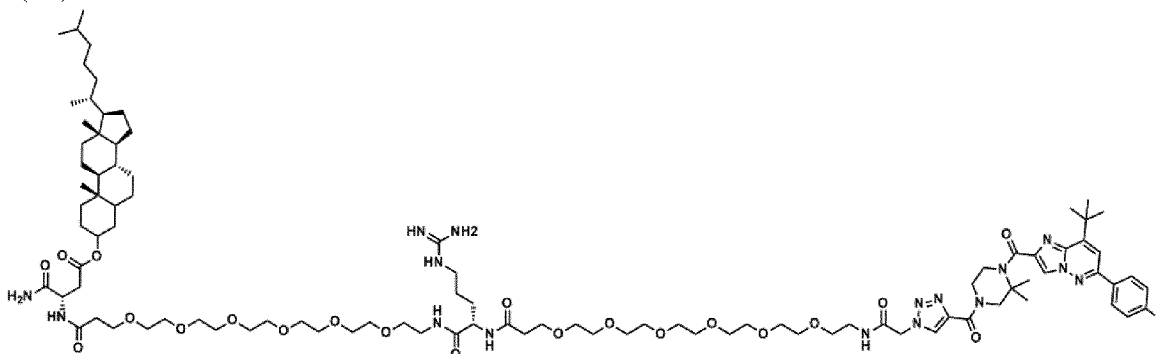


Синтезировали согласно общему способу 4 с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС: $R_f=2,30$, $m/z=1555,98$ ($M+H$, $C_{82}H_{128}FN_{12}O_{16}^+$).

Пример 23: Синтез (8R,9S,10S,13R,14S,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (26S,51S)-1-(4-(4-(8-*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-

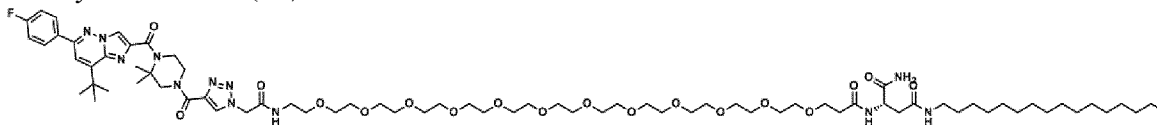
карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-51-карбамоил-26-(3-гуанидинопропил)-2,24,27,49-тетраоксо-6,9,12,15,18,21,31,34,37,40,43,46-додекаокса-3,25,28,50-тетраазатрипентаконтан-53-оата (**14**)



Синтезировали согласно общему способу 4 с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС (общий способ 13): $R_f=3,44$, $m/z=936,8$ ($M+2H$, $C_{95}H_{155}FN_{16}O_{21}^{2+}$).

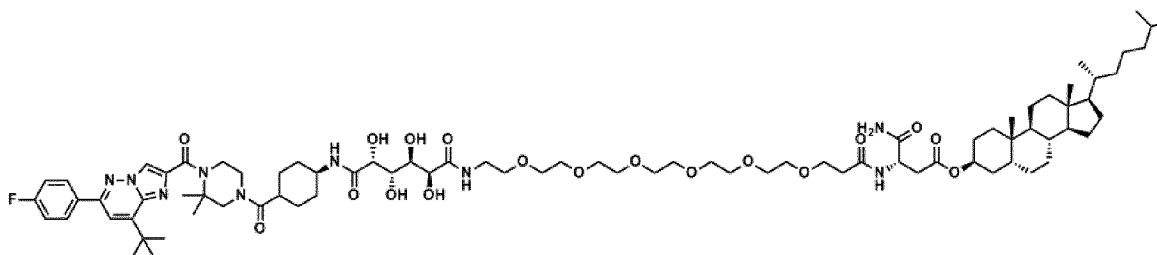
Пример 24: Синтез (S)-3-(1-(4-(4-(8-(*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-2-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-додекаокса-3-азадотетраконтан-42-амидо)-N1-гексадецилсукцинамида (**15**)



Синтезировали согласно общему способу 4, где Fmoc-L-Asp(OChol)-OH был заменен на Fmoc-L-Asp(NH(CH₂)₁₅CH₃)-OH, с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС (высокое разрешение): $m/z=750,4622$ ($M+2H$, $C_{75}H_{125}FN_{12}O_{18}^{2+}$)

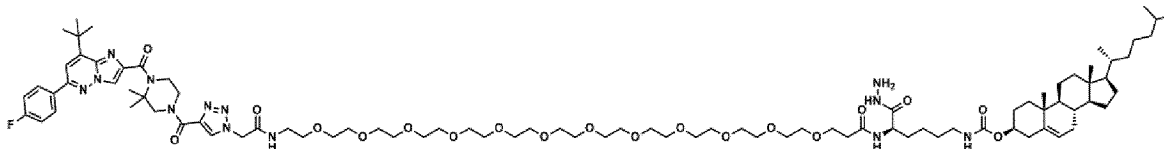
Пример 25: Синтез (3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)гексадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил (3S,28S,29R,30S,31R)-32-((4-(4-(8-(*tert*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-b]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)циклогексил)амино)-3-карбамоил-28,29,30,31-тетрагидрокси-5,27,32-триоксо-8,11,14,17,20,23-гексаокса-4,26-диазодотриаконтаноата (**16**)



Синтезировали согласно общему способу 4, где перед связыванием с антагонистом PAR₂ диацетонид муциновой кислоты присоединяли к спейсеру PEG. Указанный в заголовке продукт выделяли в виде стеклообразного вещества.

ЖХМС (высокое разрешение): $m/z=1547,9463$ ($M+H$, $C_{82}H_{129}FN_9O_{18}^{2+}$).

Пример 26: Синтез (3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-диметил-17-((*R*)-6-метилгептан-2-ил)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1*H*-циклопента[а]фенантрен-3-ил ((*R*)-1-(4-(4-(8-(*трет*-бутил)-6-(4-фторфенил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин-2-карбонил)-3,3-диметилпиперазин-1-карбонил)-1*H*-1,2,3-триазол-1-ил)-44-(гидразинкарбонил)-2,42-диоксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-додекаокса-3,43-диазаостатетраконтан-48-ил)карбамата (**17**)



Синтезировали согласно общему способу 4, где Fmoc-D-Lys(NCOChol)-NHNH₂ был заменен на Fmoc-L-Asp(NH(CH₂)₁₅CH₃)-OH, с получением указанного в заголовке продукта в виде вязкого масла.

ЖХМС (высокое разрешение): $m/z=859,5373$ ($M+2H$, $C_{75}H_{125}FN_{12}O_{18}^{2+}$).

Пример 27: Ингибирование PAR₂ в трансфицированных клетках KNRK или HT29. Клетки KNRK-hPAR₂, KNRK или HT-29 высевали при плотности 50×10^3 клеток/лунку в 96-луночный планшет для культуры ткани, покрытый прозрачным поли-d-лизином. После 24-часовой инкубации при температуре 37°C и 5% CO₂, среду удаляли и заменяли 80 мкл стимулирующего буфера IP1 (10 мМ HEPES, 1 мМ CaCl₂, 0,5 мМ MgCl₂, 4,2 мМ KCl, 146 мМ NaCl, 5,5 мМ глюкозы, 50 мМ LiCl). После добавления стимулирующего буфера в лунки добавляли 10 мкл 10× антагонистов или несущей среды ДМСО. Все планшеты дополнительно инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂, в течение 30 мин. В планшеты добавляли 10 мкл 2F или ATP и дополнительно инкубировали в течение 40 мин. После инкубации стимулирующий буфер быстро удаляли аспирацией и заменяли 25 мкл лизирующего буфера (набор для анализа IP-One HTRF[®], Cisbio). После инкубации лизатов при температуре 37°C, 5% CO₂, в течение 10 мин, 10 мкл лизата переносили в 384-луночный OptiPlate (PerkinElmer) и определяли с использованием набора для анализа IP-One HTRF[®], Cisbio).

Соединения по изобретению (добавленные в 10-кратных концентрациях в объеме 10 мкл) инкубировали в течение 30 мин, затем добавляли 10 мкМ ATP или 100 нМ или 300 нМ агониста PAR₂ (2F; EC₈₀, добавляли в 10-кратных концентрациях в объеме 10 мкл) и затем дополнительно инкубировали в течение 40 мин. После лизиса с помощью набора для анализа IP-One HTRF[®], Cisbio, количественно определяли инозитолфосфат 1. Данные были проанализированы с помощью Prism, GraphPad для расчета значений IC₅₀, показанных ниже в таблице 1.

Таблица 1: Ингибирующая активность (pIC₅₀) соединений по изобретению в анализе накопления IP₁ ^(a) или анализе Ca²⁺ FLIPR^{ТЕТРА} ^(b).

Соединение №	KNRK-PAR ₂	HT-29
		100 нМ 2F

	pIC ₅₀ ±SEM (IC ₅₀ , нМ)	pIC ₅₀ ±SEM (IC ₅₀ , нМ)
1	ND ^c	5,23±0,07 (5900)
2	ND	6,86±0,11 (140)
3	<5,00 (<10000)	7,39±0,11 (40)
4	ND	<5,00 (<10000)
5	ND	6,745±0,22 (180)
6	ND	6,013±0,21 (971)
7	ND	6,392±0,23 (405)
8	<5,00 (<10000)	7,37±0,12 (43)
9	ND	6,15±0,21 (700)
10	ND	6,18±0,07 (670)
11	ND	6,01±0,28 (970)
12	ND	6,08±0,22 (827)
13	ND	6,133±0,31 (736)
14	ND	5,81±0,35 (1547)
15	ND	7,326±0,30 (47)
16	ND	5,685±0,30 (2066)
17	ND	5,249±0,26 (5632)

^c ND, при использовании 30 мкМ антагониста наблюдалось ингибирование 2F менее 50%

Как видно из приведенных выше результатов, соединения по изобретению являются эффективными ингибиторами передачи сигналов PAR₂.

Пример 28: PAR₂-опосредованная ноцицепция

Протеазы могут вызывать боль, активируя PAR₂ на ноцицепторах или клетках других типов. Чтобы определить вклад PAR₂ в ноцицепторы, мышей выращивали, экспрессируя PAR₂ фланкированный сайтами LoxP (Par₂^{lox/lox}), с мышами, экспрессирующими рекомбиназу Cre, нацеленную на ноцицепторы, с использованием промотора Nav1.8 (Scn10a) (Stirling L.C. et al., Pain 2005, **113**(1-2): 27-36). Мыши Par₂-Nav1.8 испытывали недостаток иммунореактивного PAR₂ в Nav1.8-положительных ноцицепторах (фиг. 1A). Принимая во внимание, что 31% (20 из 65) DRG нейронов малого диаметра (<25 мкм) от мышей WT ответили на трипсин (100 нМ) с увеличенным [Ca²⁺]_i, из мышей Par₂-Nav1.8 ответили только 6% (3 из 51) нейронов (фиг. 1B, 11A, и 11B). Ноцицепцию оценивали путем измерения абстинентного ответа на стимуляцию подошвенной поверхности задней лапы нитями фон Фрея. У мышей WT интраплантарная инъекция (10 мкл) трипсина (80 нМ), NE (3,9 мкМ) или CS (5 мкМ) вызывала механическую аллодинию в течение 30 мин, которая поддерживалась в течение 180 мин

(фиг. 1B-D). У мышей $Par_2-Na_v1.8$ начальные ответы сохранялись, но ответы через 120 мин были уменьшены. Через 180 минут, когда механическая аллодиния у мышей WT полностью поддерживалась, ответы у мышей $Par_2-Na_v1.8$ вернулись к исходному уровню (NE) или были значительно ослаблены (трипсин, CS). У мышей WT интраплантарный трипсин увеличивал толщину лапы, измеренную с помощью штангенциркуля, которая достигала максимума в 1 час и сохранялась в течение 4 часов, и стимулировал приток нейтрофилов через 4 часа, что согласуется с воспалением (фиг. 11C и 11D). Вызванное трипсином воспаление заметно уменьшилось у мышей $Par_2-Na_v1.8$.

Чтобы оценить вклад эндоцитоза в вызванную протеазой ноцицепцию, мышам с помощью интраплантарной инъекции вводили Dyngo4a (Dy4, ингибитор динамина; Robertson M.J. et al., Nat. Protoc. 2014, 9(4): 851-870), PitStop2 (PS2, ингибитор клатрина; Robertson, M.J., et al., Nat. Protoc. 2014, 9(7): 1592-1606), неактивные (неакт.) аналоги (50 мкМ) или несущую среду (0,2% ДМСО, 0,9% NaCl) (10 мкл). Через 30 мин в ту же лапу инъецировали трипсин (10 нМ), NE (1,2 мкМ) или CS (2,5 мкМ) (10 мкл). В контролях (несущая среда или неактивные аналоги), трипсин, NE и CS вызывали механическую аллодинию в течение 4 ч (фиг. 1E-J). Dy4 и PS2 ингибировали индуцированную трипсином аллодинию через 1 и 2 ч (фиг. 1E, H), тогда как NE- (фиг. 1F, I) и CS- (фиг. 1G, J) индуцировали аллодинию без изменений или влияли минимально. Ингибиторы эндоцитов или протеазы не влияли на абстинентный ответ неинъецированной контралатеральной лапы (фиг. 12A, B). Трипсин, NE и CS увеличивали толщину лапы, что соответствовало отеку (фиг. 12C-H). Ингибиторы динамина и клатрина не влияли на отеки.

Результаты показывают, что протеазы индуцируют постоянную ноцицепцию путем активации PAR_2 на ноцицепторах $Na_v1.8$, и что эндоцитоз PAR_2 необходим для ноцицептивного действия трипсин, но не NE или CS.

Пример 29: PAR_2 -опосредованная гипервозбудимость ноцицепторов

Чтобы оценить вклад эндоцитоза в индуцированную протеазой гипервозбудимость ноцицепторов, определяли с помощью регистрации фиксации потенциала порог гальванической возбудимости (минимальный ток для запуска одного потенциала действия) нейронов малого диаметра ганглиев дорсального корешка мыши (DRG). Нейроны предварительно инкубировали с трипсином (50 нМ, 10 мин), NE (390 нМ, 30 мин), CS (500 нМ, 60 мин) (условия, выбранные для обеспечения сильной гипервозбудимости) или несущей средой и промывали. Порог гальванической возбудимости измеряли через 0 или 30 мин после промывки. Трипсин, NE и CS снижали порог гальванической возбудимости через 0 и 30 мин, что указывает на начальную гипервозбудимость, которая сохраняется не менее 30 мин (фиг. 2). Dy4 (30 мкМ) или PS2 (15 мкМ) не влияли на способность трипсина, NE или CS вызывать начальную гипервозбудимость (0 мин). Dy4 и PS2 устраняли стойкие эффекты трипсина (фиг. 2A-C), но не NE (фиг. 2D, E) или CS (фиг. 2F, G) (30 мин). Dy4, PS2 или несущая среда (0,3% ДМСО) не влияли на базальную возбудимость DRG нейронов (фиг. 13).

Ингибирование передачи сигналов PAR₂ известным PAR₂ ингибитором I-343 (фиг. 14А) исследовали в клетках НТ-29 и НЕК293, которые экспрессируют эндогенный PAR₂, и в клетках КNRК, экспрессирующих человеческий PAR₂. Накопление инозитолфосфата-1 (IP₁) определяли в ответ на PAR₂-селективный агонист 2-фууроил-LIGRLO-NH₂ (2F), аналог трипсин-связанного связанного лиганда или трипсина. I-343 ингибировал индуцированный 2F (300 нМ) IP₁ в клетках НТ-29 (pIC₅₀ 8,93±0,11, IC₅₀ 1,1 нМ) и индуцированный 2F (100 нМ) IP₁ в клетках КNRК-hPAR₂ (pIC₅₀ 6,18±0,11, IC₅₀ 666 нМ; фиг. 14В-D). I-343 ингибировал индуцированный трипсином (30 нМ) IP₁ в клетках НЕК293 (pIC₅₀ 9,36±0,20, IC₅₀ 0,4 нМ) и в клетках КNRК-hPAR₂ (pIC₅₀ 5,13±0,14, IC₅₀ 7507 нМ). I-343 не влиял на стимулированный АТФ (10 мкМ) IP₁ в клетках КNRК (фиг. 14Е).

I-343 (10 мкМ) предотвращал снижение порога гальванической возбудимости 30 мин после трипсина и CS, но не NE (фиг. 3А-С). Однако I-343 предотвращал снижение порога гальванической возбудимости через 0 мин после NE (фиг. 3D). I-343 (100 нМ, 300 нМ), также предотвращал снижение порога гальванической возбудимости через 0 мин после трипсина (фиг. 15А). Когда нейроны инкубировали с тромбином (50 нМ, 20 мин) и промывали, имело место немедленное снижение порога гальванической возбудимости, которое предотвращали предварительной инкубацией с антагонистом PAR₁ SCH79797 (1 мкМ, 10 мин; Ahn, H.S., et al., *Biochem. Pharmacol.* 2000, **60**(10): 1425-1434); отдельно SCH79797 не имел никакого эффекта (фиг. 15В) и SCH79797 не влиял на ответ на трипсин (фиг. 15С). Таким образом, PAR₂ опосредует постоянные действия трипсина и CS, а также начальные эффекты NE, но NE вызывает стойкую гипервозбудимость по другому механизму. Другой антагонист PAR₂, GB88, также предотвращает активацию ноцицепторов трипсином, NE и CS (Lieu, T. et al. *Br J Pharmacol* 2016, **173**(18): 2752-2765). Активированные трипсином PAR₂ передают сигналы от эндосом с помощью βARR- и Raf-1-зависимых процессов, которые активируют ERK (DeFea, K.A. et al., *J Cell Biol* 2000, **148**(6): 1267-1281). PD98059 (50 мкМ), который ингибирует активацию митоген-активируемой протеинкиназы 1 (MEK1) (Lieu, T. et al., *Br J Pharmacol* 2016, **173**(18): 2752-2765) не влиял на начальную гипервозбудимость, индуцированную трипсином, но предотвращал постоянную гипервозбудимость, индуцированную трипсином (фиг. 3Е). Напротив, GF109203X (Bis-1, 10 мкМ), который ингибирует PKCα и другие киназы (Davies, S.P. et al., *Biochem J* 2000, **351**(Pt 1): 95-105), предотвращал начальные, но не стойкие эффекты трипсина (фиг. 3F).

Таким образом, трипсин индуцирует начальную гипервозбудимость ноцицепторов посредством передачи сигналов PAR₂/PKC с плазматической мембраны и постоянную гипервозбудимость посредством передачи сигналов PAR₂/ERK от эндосом. Аденилатциклаза и PKA опосредуют гипервозбудимость ноцицепторов, индуцированную NE и CS (Zhao, P. et al., *J. Biol. Chem.* 2014, **289**(39): 27215-27234; Zhao, P. et al., *J. Biol. Chem.* 2015, **290**(22): 13875-13887), что дополнительно не изучалось.

Пример 30: Эндоцитоз PAR₂ и компарментализированная передача сигналов в ноцицепторах

Для оценки эндоцитоза PAR₂ в ноцицепторах мышинные (m) PAR₂-GFP трансфицировали в DRG нейроны мыши. В нейронах, обработанных несущей средой, mPAR₂-GFP был обнаружен на плазматической мембране и во внутриклеточных компартаментах, которые могут соответствовать запасам PAR₂ в аппарате Гольджи (фиг. 4A) (Jensen D.D., et al. *J Biol Chem.* 2016, **291**(21): 11285-11299). Трипсин, но не NE или CS (100 нМ, 30 мин), индуцировал эндоцитоз mPAR₂-GFP (фиг. 4A, B). Du4, но не неакт. Du4, ингибировал индуцированный трипсином эндоцитоз mPAR₂-GFP (фиг. 4C). Чтобы определить, рекрутирует ли PAR₂ βARR, которые опосредуют эндоцитоз, сенсоры биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) были экспрессированы для PAR₂-RLuc8 (донор) и βARR2-YFP (акцептор) в DRG нейронах мыши. Трипсин, но не NE или CS, увеличивал PAR₂-RLuc8/βARR2-YFP BRET (фиг. 4D).

Чтобы определить, вызывает ли трипсин PAR₂-зависимую активацию PKC и ERK, которые, соответственно, опосредуют начальную и устойчивую индуцированную трипсином гипервозбудимость ноцицепторов, генетически кодированные биосенсоры Förster Resonance Energy Transfer (FRET) были экспрессированы в нейронах. Биосенсоры для плазматической мембраны PKC (pmCKAR), цитозольной PKC (CytoCKAR), цитозольной ERK (CytoEKAR) и ядерной ERK (NucEKAR) (Halls M.L. et al., *Methods Mol Biol.* 2015, **1335**: 131-161) были экспрессированы в DRG нейронах крысы, так как пилотные исследования выявили более устойчивые и последовательные ответы PAR₂, чем в нейронах мыши. Трипсин (10 или 100 нМ) активировал PKC на плазматической мембране, но не в цитозоле (фиг. 4E-G), и активировал ERK в цитозоле и ядре (фиг. 4H-J). Антагонист PAR₂ I-343 (10 мкМ) ингибировал индуцированную трипсином активацию PKC и ERK, тогда как антагонист PAR₁ SCH530348 (100 нМ) не оказывал эффекта (фиг. 4F, I). В конце экспериментов нейроны заражали позитивными контролями форболом 12,13-дibuтиратом (PDBu) для биосенсоров EKAR или смесью ингибиторов PDBu плюс фосфатазы-2 для биосенсоров CKAR, чтобы гарантировать, что ответ биосенсора не был насыщенным.

Результаты показывают, что трипсин, но не NE или CS, стимулирует рекрутирование βARR2 и динамин-зависимый эндоцитоз PAR₂ в ноцицепторах. Трипсин вызывает PAR₂-зависимую активацию PKC на плазматической мембране и ERK в цитозоле и ядре.

Пример 31: Механизмы эндоцитоза PAR₂ и эндосомной передачи сигналов

Механизм эндоцитоза PAR₂ и эндосомной передачи сигналов был исследован в клетках HEK293. Для количественной оценки удаления PAR₂ из плазматической мембраны и его накопления в ранних эндосомах использовался BRET, чтобы оценить близость между PAR₂ и белками, которые находятся в плазматической мембране (RIT), и ранними эндосомами (Rab5a) (Jensen, D.D. et al., *Sci Transl. Med.* 2017, **9**(392): eaal3447; Yarwood, R.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, **114**(46):12309-12314). Это применение

BRET использует преимущества неспецифических белок-белковых взаимодействий для отслеживания движения мембранных белков через различные компартменты (Lan, T.H. et al., *Traffic* 2012, **13**(11): 1450-1456). Трипсин индуцировал уменьшение PAR₂-RLuc8/RIT-Venus BRET (EC₅₀ 2,9 нМ) и увеличение PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (EC₅₀ 2,7 нМ) (фиг. 5A, 5B, и 16A-D). Ни NE, ни CS (100 нМ) не влияли на PAR₂-RLuc8/RIT-Venus или Rab5a-Venus BRET (фиг. 5A, B). PS2, но не неакт. PS2, подавлял вызванное трипсином уменьшение PAR₂-RLuc8/RIT-Venus BRET и увеличение PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (фиг. 5C, 5D, 16E, и 16F). Доминантно-негативный динамин K44E (DynK44E), дефицитный по связыванию с GTP (Herskovits, J.S. et al., *J Cell Biol.* 1993, **122**(3): 565-578), ингибировал увеличение PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET, но не влиял на PAR₂-RLuc8/RIT-Venus BRET (фиг. 5C, 5D, 16G, и 16H). Динамин дикого типа (DunWT) имел минимальные эффекты. Поскольку GTP-связывание требуется для расщепления почкующихся пузырьков из плазматической мембраны, DynK44E, по-видимому, задерживает PAR₂ в мембранных пузырьках, что препятствует взаимодействию с Rab5a, но не с RIT. Таким образом, трипсин, но не CS или NE, вызывает клатрин- и динамин-зависимый эндоцитоз PAR₂.

Трипсин-индуцированная передача сигналов ERK, опосредованная передачей сигналов эндосомальным PAR₂, была исследована в клетках HEK293, экспрессирующих биосенсоры Flag-PAR₂-HA11 и FRET для цитозольной и ядерной ERK (CytoEKAR, NucEKAR), плазматической мембраны и цитозольной PKC (pmCKAR, CytoCKAR), а также плазматической мембраны и цитозольной цАМФ (pmEpac, CytoEpac). Трипсин (10 нМ), но не NE или CS (100 нМ), стимулировал быструю и постоянную активацию ERK в цитозоле и ядре (EC₅₀, 5 нМ) (фиг. 5E, 5F, 17A-F). I-343 (10 мкМ) но не SCH530348 (100 нМ) ингибировал активацию трипсином цитозольной и ядерной ERK (фиг. 5G). PS2 и DynK44E ингибировали стимулированную трипсином активацию цитозольной и ядерной ERK по сравнению с неакт. PS2 и контролями DynWT (фиг. 5H, 5I, 17G-J). AG1478 (1 мкМ), ингибитор рецепторной тирозинкиназы EGF (Levitzki, A. & Gazit, A. *Science* 1995, **267**(5205): 1782-1788), UBO-QIC (100 нМ), который ингибирует Gα_q и некоторые сигналы Gβγ (Levitzki, A. et al., *Science* 1995, **267**(5205): 1782-1788), и Gö6983 (1 мкМ), который ингибирует все изоформы PKC (Gschwendt, M, et al., *FEBS Lett* 1996, **392**(2): 77-80), подавлял стимулированную трипсином активацию цитозольной ERK (фиг. 5J и 17K). UBO-QIC и Gö6983 также ингибировали активацию ядерной ERK (фиг. 5K и 17L). Результаты показывают, что PAR₂ передает сигналы от эндосом с помощью Gα_q-зависимых механизмов для активации ERK в цитозоле и ядре.

Чтобы определить, индуцирует ли трипсин транслокацию βARR и Gα_q в эндосомы, измеряли BRET между βARR1-RLuc8 или Gα_q-RLuc8 и Rab5a-Venus в клетках HEK293. Трипсин (100 нМ) стимулировал увеличение в βARR1-RLuc8/Rab5a-Venus BRET и в Gα_q-RLuc8/Rab5a-Venus BRET (фиг. 18A, B). Для локализации PAR₂-HA, Gα_q и раннего эндосомального антигена-1 (EEA1) в клетках HEK-293 использовали иммунофлуоресцентную и структурированную микроскопию с подсветкой. В

нестимулированных клетках PAR₂ был ограничен плазматической мембраной, хотя Gα_q был обнаружен в ранних эндосомах (фиг. 18С). Трипсин (10 нМ, 30 мин) индуцировал транслокацию PAR₂ в ранние эндосомы, содержащие Gα_q. Результаты подтверждают гипотезу о том, что трипсин вызывает сборку PAR₂/βARR/Gα_q сигналы в ранних эндосомах.

Трипсин (10 нМ) вызывал быструю и длительную активацию РКС и образование цАМФ на плазматической мембране и в цитозоле клеток HEK293 (фиг. 19А-Н). DунK44E сильно ингибировал эти сигналы, но DунWT не оказывал никакого влияния. I-343, но не SCH530348, ингибировал стимуляцию трипсином РКС и цАМФ, которые, таким образом, зависят от PAR₂ (фиг. 19G и Н). Эти результаты предполагают, что эндоцитоз необходим для множества компонентов передачи сигналов PAR₂. Передача сигналов цАМФ на плазматической мембране обычно десенсибилизируется доставкой βARR фосфодиэстераз, которые разлагают цАМФ (Perry, S.J. et al., Science 2002, 298(5594): 834-836). Устойчивый ответ цАМФ плазматической мембраны на трипсин подтверждает существование механизмов, обеспечивающих постоянную передачу сигналов PAR₂, которые требуют дальнейшего изучения. Стимуляция клеток позитивными контролями PDBu (EKAR), PDBu+смесь ингибиторов фосфатазы-2 (СКАР), или форсколин+3-изобутил-1-метилксантин (Ерас) показала, что ответы на протеазы не насыщают биосенсоры (фиг. 5Е, 5F, и 19А-Д).

Пример 32: Индуцированная IBS гипервозбудимость ноцицепторов

Исследование того, вызывают ли протеазы биопсии слизистой оболочки у пациентов с IBS стойкую гипервозбудимость ноцицепторов, было проведено с помощью механизма, который влечет за собой передачу сигнала эндосомальным PAR₂. Биопсии слизистой оболочки толстой кишки от пациентов с IBS с преобладанием диареи (IBS-D) здоровых контрольных (НС) субъектов помещали в культуральную среду (24 ч, 37°C). Затем DRG нейроны мыши подвергали воздействию биопсийных супернатантов (30 мин, 37°C) и промывали. Порог гальванической возбудимости определяли через 30 мин после промывки для оценки постоянной гипервозбудимости. Супернатанты биопсии от пациентов с IBS-D вызывали стойкое снижение порога гальванической возбудимости, что согласуется с гипервозбудимостью, по сравнению с супернатантами от субъектов НС (порог гальванической возбудимости через 30 мин: НС, 78,33±4,41 pA, 12 нейронов, супернатант от 4 НС; IBS-D, 54,55±4,74 pA, 11 нейронов, супернатант от 4 IBS-D; P<0,05; ANOVA, тест множественных сравнений Тьюки) (фиг. 6А, В). I-343 (10 мкМ), Ду4 (ингибитор динамина, 30 мкМ) и PD98059 (ингибитор MEK1, 50 мкМ) устраняли индуцированную IBS-D гипервозбудимость ноцицепторов (фиг. 6А-Д). Ду4 вызывал незначительное снижение порога гальванической возбудимости нейронов, подвергшихся воздействию супернатанта, но I-343 и PD98059 не оказывали эффекта.

Чтобы исследовать, могут ли протеазы в супернатантах IBS-D стимулировать эндоцитоз PAR₂, использовали BRET для оценки близости между PAR₂-RLuc8 и Rab5a-Venus, экспрессируемыми в клетках HEK293. Супернатант IBS-D увеличивал PAR₂-

RLuc8/Rab5a-Venus BRET через 60 мин по сравнению с супернатантом НС (фиг. 6Е). Трипсин (10 нМ, положительный контроль) также увеличивал PAR₂-RLuc8/Rab5a-Venus BRET.

Эти результаты предполагают, что протеазы, которые высвобождаются из биопсий слизистой оболочки толстой кишки у пациентов с IBS-D, вызывают длительную гипервозбудимость ноцицепторов по механизму, который требует динамин-зависимого эндоцитоза передачи сигналов PAR₂ и PAR₂ ERK signalling от эндосом.

Пример 33: Доставка антагонистов к PAR₂ в эндосомах

Конъюгирование с трансмембранным липидом холестеранолом способствует эндосомальной доставке антагонистов рецептора нейрокина 1 (NK₁R) и рецептора, подобного рецептору кальцитонина (CLR), которые обеспечивают более эффективную и продолжительную антиноцицепцию (Jensen, D.D. et al., *Sci Transl Med*, 2017, **9**(392):eaal3447; Yarwood R et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2017, **114**(46):12309-12314). Чтобы оценить, является ли PAR₂ в эндосомах терапевтической мишенью, были синтезированы трехсторонние зонды, включающие: холестеранол для закрепления зондов на мембранах или этиловый эфир, который не включается в мембраны; линкер из полиэтиленгликоля (ПЭГ) 12 для облегчения презентации в водной среде; и груз цианина 5 (Cy5) для локализации или антагонист PAR₂ I-343 (фиг. 20А и В). Чтобы определить, накапливаются ли трехсторонние зонды в эндосомах, содержащих PAR₂, DRG нейроны мыши, экспрессирующие mPAR2-GFP, инкубировали с Cy5-PEG-холестеранолом (Cy5-Chol) или Cy5-PEG-этиловым эфиром (Cy5-этиловым эфиром) (200 нМ, 60 мин, 37°C). Нейроны промывали и визуализировали (37°C). Cy5-этиловый эфир не поглощался нейронами, тогда как Cy5-Chol вставлялся в плазматическую мембрану и затем накапливался в эндосомах сомы и нейритов за 3 ч. Трипсин индуцировал эндоцитоз PAR₂-GFP в эндосомы в непосредственной близости от везикул, содержащих Cy5-Chol. Видеоизображение выявило частую ассоциацию эндосом, содержащих PAR₂-GFP и Cy5-Chol. I-343-PEG-холестеранол (соединение **10**, фиг. 20А) противодействует 2F-стимулированному накоплению IP₁ в клетках НТ-29 (pIC₅₀ 6,18±0,07; IC₅₀, 670 нМ), хотя и с меньшей активностью по сравнению с исходным соединением I-343 (pIC₅₀ 8,96±0,10; IC₅₀ 1,1 нМ) (фиг. 20С).

Пример 34: Антагонизм эндосомального PAR₂ и гипервозбудимость ноцицепторов

Для оценки способности соединения по настоящему изобретению ингибировать индуцированную протеазой гипервозбудимость ноцицепторов, индуцированных передачей сигнала эндосомальным PAR₂, DRG нейроны мыши предварительно инкубировали с соединением **10** (30 мкМ) или несущей средой (60 мин, 37°C), промывали и восстанавливали в среде без антагонистов в течение 180 мин, чтобы дать возможность антагонисту накопиться в эндосомах (фиг. 8А). Временная инкубация с трипсином снижала порог гальванической возбудимости нейронов, обработанных несущей средой, через 0 и 30 мин (фиг. 8В). Соединение **10** не влияло на начальную возбудимость через 0 мин, но предотвращало стойкий ответ через 30 мин. Соединение **10** не оказывало эффекта

на исходный порог гальванической возбудимости. Аналогично, временная инкубация с супернатантом IBS-D снижала порог гальванической возбудимости через 30 минут по сравнению с супернатантом НС (фиг. 8С). Соединение **10** полностью предотвращало постоянное действие супернатанта IBS-D на возбудимость ноцицептора (порог гальванической возбудимости через 30 мин: несущая среда IBS-D, $40 \pm 3,89$ pA, 12 нейронов, супернатант от 4 пациентов; соединение **10** IBS-D, $64,7 \pm 3,84$ pA, 17 нейронов, супернатант от 4 пациентов; $P < 0,05$) (фиг. 7С). Соединение **10** не влияло на возбудимость нейронов, обработанных супернатантом НС.

Пример 35: Эндосомная передача сигналов PAR₂ обеспечивает трипсин-индуцированную сенсibilизацию афферентных нейронов толстой кишки

Сенсibilизация афферентных нейронов толстой кишки к механическим стимулам является основной гипотезой боли при IBS (Azpiroz F. et al., *Neurogastroenterol Motil.* 2007, **19**(1 Suppl): 62-88). Чтобы исследовать, расщепляют ли протеазы PAR₂ на периферических терминалах ноцицепторов толстой кишки, чтобы вызвать механическую гиперчувствительность, были сделаны единичные записи от афферентных нейронов, иннервирующих кишку мыши. Рецептивные поля были идентифицированы путем механической стимуляции поверхности слизистой оболочки нитями фон Фрея, протеазы были применены к рецептивным полям слизистой оболочки, и механические реакции были повторно оценены для оценки сенсibilизации. В базальных условиях повторная механическая стимуляция (2 г филамента) вызывала воспроизводимое возбуждение (фиг. 9А). Трипсин (10 нМ, 10 мин) увеличивал частоту возбуждения до механической стимуляции на $335,8 \pm 5,9\%$, NE (100 нМ, 10 мин) на $41,0 \pm 11,8\%$ и CS (100 нМ, 10 мин) на $52,0 \pm 13,2\%$ (фиг. 9В-Е).

Преходящий колит у мышей вызывает гиперчувствительность афферентных нейронов толстой кишки, которая сохраняется после исчезновения воспаления (Azpiroz F., et al., *Neurogastroenterol Motil.* 2007, **19**(1 Suppl): 62-88). Эта хроническая висцеральная гиперчувствительность (CVH) может имитировать постинфекционный/воспалительный IBS. Чтобы определить, могут ли протеазы дополнительно усиливать CVH, мышей обрабатывали тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS, клизма) для индукции колита. Через 28 дней после TNBS, когда воспаление не обнаруживалось, механическая стимуляция толстой кишки индуцировала большую частоту возбуждения у мышей CVH, чем у мышей НС, что согласуется с хронической гипервозбудимостью (фиг. 21А-Д). По сравнению с базальными ответами трипсин дополнительно усиливал ответы на $16,4 \pm 7,9\%$, NE на $30,6 \pm 9,0\%$ и CS на $29,6 \pm 9,2\%$. Таким образом, протеазы все еще могут усиливать возбудимость ноцицепторов толстой кишки, даже если они уже сенсibilизированы в результате предшествующего воспаления.

Чтобы определить, обеспечивает ли передача сигнала эндосомальным PAR₂ трипсин-индуцированную сенсibilизацию афферентных нейронов толстой кишки у нормальных мышей, к рецептивным полям были применены I-343 (10 мкМ), PS2 или неакт. PS2 (50 мкМ). I-343 и PS2 не влияли на базальную механическую чувствительность,

но устраняли вызванную трипсином сенсibilизацию механических реакций (фиг. 9F, G). Неакт. PS2 не влиял на базальные ответы или индуцированную трипсином сенсibilизацию (фиг. 9H). Результаты подтверждают гипотезу, что эндоцитоз PAR₂ необходим для индуцированной трипсином сенсibilизации афферентных нейронов толстой кишки.

Нездоровое вздутие кишечника (CRD) запускает висцеромоторный ответ (VMR), ноцицептивный рефлекс ствола мозга, состоящий из сокращения мышц брюшного пресса, который можно отслеживать с помощью электромиографии. Этот подход позволяет оценить висцеральную чувствительность у бодрствующих мышей (Castro, J. et al., Br. J. Pharmacol. 2017, **175**(12): 2384-2398). Чтобы исследовать индуцированную протеазой гиперчувствительность, в толстую кишку (клизма) здоровых мышей закапывали смесь протеазы (10 нМ трипсина+100 нМ NE+100 нМ CS) или несущей среды (физиологический раствор) (100 мкл). Через 15 мин измеряли VMR в ответ на градуированное CRD (20-80 мм рт. ст.) с помощью баростат-баллонной системы. У мышей, которым вводили носитель, CRD индуцировало градуированный VMR (фиг. 9I). Протеазная смесь усиливала VMR при всех давлениях от 40 до 80 мм рт. ст. Введение I-343 (30 мг/кг) в ободочную кишку (клизма 100 мкл) за 30 минут до смеси протеаз отменяло ответ (фиг. 9J). Поскольку изменения в совместимости толстой кишки могут изменить VMR к CRD, отношение давления/объема было измерено при всех давлениях вздутия. На совместимость толстой кишки смесь протеаз или I-343 не влияла (фиг. 21E и F).

Результаты подтверждают гипотезу о том, что эндоцитоз PAR₂ необходим для индуцированной трипсином сенсibilизации афферентных нейронов толстой кишки и ноцицепции толстой кишки.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Люди. Комитет по этике человека при Королевском университете одобрил изучение человека. Все субъекты дали информированное согласие. Эндоскопические биопсии были получены из нисходящей ободочной кишки 13 взрослых пациентов с IBS-D (12 женщин), диагностированных с использованием критериев ROME III для IBS с преобладанием диареи, и из 12 контрольных групп. У всех пациентов с СРК симптомы были более 1 года, а у большинства более 5 лет. Целиакия была исключена из анализа крови, и во время колоноскопии пациентам старше 40 лет с ежедневной диареей была произведена биопсия для исключения микроскопического колита. Ни у одного из пациентов в анамнезе не отмечалось постинфекционного IBS. Контрольные биопсии были получены от пациентов, проходящих скрининг толстой кишки, которые не имели желудочно-кишечных симптомов. Биопсии (8 образцов на пациента) инкубировали в 250 мкл среды RPMI, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, пенициллин/стрептомицин и гентамицин/амфотерицин В (95% O₂/5% CO₂, 24 ч, 37°C). Супернатанты хранили при -80°C. Супернатанты от 4-6 пациентов объединяли и изучали в отдельных экспериментах.

Подопытные животные. Институциональные комитеты по уходу за животными и их использованию университетов Квинса, Монаша, Флиндерса и Нью-Йорка и Южно-Австралийский научно-исследовательский институт здравоохранения и медицины одобрили исследования на мышах и крысах. Были исследованы мыши (C57BL/6, самцы, 6-15 недель) и крысы (Sprague-Dawley, самцы, 8-12 недель). Животных содержали при контролируемой температуре с 12-часовым циклом свет/темнота и свободным доступом к пище и воде. Животных убивали CO₂ или передозировкой анестетика и торакотомией. Животные были рандомизированы для лечения, и ни одно животное не было исключено из исследований.

Мыши Par₂-Nav1.8. Мыши C57BL/6 с условным нокаутом F2r11 были получены с помощью genOway (Lyon, France). Последний экзон F2r11, кодирующий трансмембранные, внеклеточные и цитоплазматические домены F2RL1, был фланкирован сайтами loxP и касетой неомидина в интроне 1. Кассету неомидина вырезали путем разведения этих мышей с линией мыши, экспрессирующей C57BL/6 Flp. Для удаления Par₂ в периферических нейронах мышей с условным нокаутом F2r11 разводили с мышами, экспрессирующими рекомбиназу Cre, под контролем промотора гена Scn10a (B6,129-Scn10a^{tm2(cre)Jnw/H}). Удаление PAR₂ в ноцицепторах Nav1.8 оценивали по иммунофлуоресценции. DRG от мышей дикого типа и мышей Par₂-Nav1.8 фиксировали в 10% формалине в течение 3 часов, переносили в 70% спирт и помещали в парафин. Срезы (5 мкм) депарафинизировали, регидратировали, подвергали микроволновой обработке в натриево-цитратном буфере, промывали и затем блокировали в SuperBlock™ (ThermoFisher Scientific) в течение одного часа при комнатной температуре. Срезы инкубировали с антителом мыши к PAR₂, конъюгированному с Alexa-488 (Santa Cruz Biotechnology, SC-13504, 1:200, 4°C, в течение ночи.), и с антителом морской свинки к Nav1.8 (Alomone Labs, AGP-029, 1:200, 4°C, в течение ночи.), с последующим добавлением козьего анти-морской свинки вторичного антитела, конъюгированного с Alexa Fluor-594 (Life Technologies, A11076, 1:500, комнатная температура, 1 час). Срезы получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti с 10-кратным увеличением; изображения были получены с помощью камеры Photometrics CoolSNAP.

Соматическая ноцицепция и воспаление. Мышам давали привыкнуть к экспериментальному аппарату, комнате и исследователю в течение 1-2 часов за 2 дня до исследования. Исследования проводились в слепом для исследователя режиме. Мышей анестезировали (5% изофлуран) для интраплантарных инъекций. В левую заднюю лапу инъецировали Dy4a, неакт. Dy4, PS2, неакт. PS2 (все по 50 мкм) или несущую среду (0,2% ДМСО в 0,9% NaCl) (10 мкл). Через 30 мин в ту же заднюю лапу вводили трипсин (10 или 80 нМ), CS (2,5 или 5 мкм) или NE (1,2 или 3,9 мкм) (все по 10 мкл). Механические ноцицептивные реакции оценивали, изучая отдергивания лапы на стимуляцию подошвенной поверхности задней лапы калиброванными филаментами фон Фрея. Оценки фон Фрея измеряли в трех экземплярах для установления базовой линии для каждого животного за день до экспериментов, а затем измеряли в течение до 4 часов после

введения протеазы. Для оценки отека толщину лапы измеряли в месте инъекции между подошвенной и дорсальной поверхностями лапы с использованием цифровых штангенциркулей. Для оценки нейтрофильной инфильтрации лапы собирали через 4 ч после интраплантарной инъекции трипсина (10 мкл, 80 нМ) или несущей среды, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 48-72 ч, рассекали пополам и фиксировали в формалине в течение дополнительных 12 час Ткань декальцинировали в 10% 0,5 М EDTA в течение 6 дней, промывали водой, переносили в 70% этанол в течение 24 часов и погружали в парафин. Срезы (5 мкм) инкубировали с нейтрофильным антителом Ly6G/6C клона NIMP-R14 (Abcam # ab2557, Lot # GR135037-1, AV_303154, 1:800, комнатная температура, 12 ч). Срезы обрабатывали для хромогенной иммуногистохимии на платформе Ventana Medical Systems Discovery XT с онлайн-депарафинизацией с использованием реагентов Ventana. Ly6G/Ly6c ферментативно обрабатывали протеазой-3 (Ventana Medical Systems) в течение 8 минут. Ly6G/Ly6c регистрировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена козьим анти-крысиным мультимером, инкубированным в течение 16 мин.

Диссоциация нейронов DRG для электрофизиологических исследований. У мышей C57BL/6 собирали DRG, иннервирующий ободочную кишку (T9-T13). Ганглии расщепляли инкубацией в коллагеназе IV (1 мг/мл, Worthington) и диспазе (4 мг/мл, Roche) (10 минут, 37°C). DRG растирали оплавленной пипеткой Пастера и затем настаивали (5 мин, 37°C). Нейроны промывали, высевали на покровные стекла с покрытием из ламинина (0,017 мг/мл) и поли-D-лизина (2 мг/мл) и выдерживали в среде F12, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, пенициллин и стрептомицин (95%), воздух, 5% CO₂, 16 ч, 37°C) до проведения электрофизиологических исследований.

Регистрация методом локальной фиксации потенциала. Были исследованы нейроны малого диаметра (емкость <30 pF), поскольку они обладают характеристиками ноцицепторов (Valdez-Morales E.E. et al., Am J Gastroenterol 2013, **108**(10): 1634-1643). Изменения возбудимости количественно определяли путем измерения порога гальванической возбудимости. Цельноклеточную перфорированную регистрацию методом локальной фиксации потенциала проводили с использованием амфотерицина В (240 мкг/мл, Sigma Aldrich) в текущем режиме фиксации при комнатной температуре. Камеру записи перфузировали внешним раствором со скоростью 2 мл/мин. Записи делались с использованием усилителей Multiclamp 700B или Axopatch 200B, оцифровывались с помощью Digidata 1440A или 1322A и обрабатывались с использованием программного обеспечения pClamp 10.1 (Molecular Devices). Растворы имели состав (мМ): пипетка - К-глюконат 110, KCl 30, HEPES 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2; pH 7,25 с помощью 1М КОН; внешний - NaCl 140, KCl 5 HEPES 10, глюкозы 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2; pH до 7,3-7,4 с помощью 3М NaOH. Нейроны предварительно инкубировали с супернатантами биоптатов слизистой оболочки толстой кишки от субъектов HC или IBS-D (200 мкл супернатанта объединяли с 500 мкл среды F12, фильтровали) в течение 30 мин. Нейроны также предварительно инкубировали с трипсином (50 нМ, 10 мин), NE (390 нМ,

30 мин), CS (500 нМ, 60 мин) или несущей средой (37°C) и промывали. Порог гальванической возбудимости определяли при T 0 или T 30 мин после промывки. Чтобы исследовать механизмы вызванных протеазой эффектов, нейроны инкубировали с I-343 (100 нМ, 300 нМ, 10 мкМ, 30 мин предварительной инкубации), SCH79797 (1 мкМ, 10 мин), Ду4 (30 мкМ, 30 мин), PS2 (15 мкМ, 30 мин), PD98059 (50 мкМ, 30 мин), GF109203X (10 мкМ, 30 мин) или несущей средой (предварительная инкубация и включение в течение всего периода). В экспериментах с использованием трехстороннего антагониста нейроны предварительно инкубировали с соединением **10** (30 мкМ, 60 мин, 37°C) или несущей средой и промывали. Их извлекали в среду F12 при температуре 37°C в течение различного времени, подвергали воздействию супернатанта НС или IBS-D или трипсина (50 нМ, 10 мин) и промывали. Порог гальванической возбудимости измеряли через 0 или 30 мин после промывки. Во всех экспериментах средний порог гальванической возбудимости рассчитывался для нейронов, подвергшихся воздействию супернатантов, протеаз или несущей среды.

Регистрация афферентов толстой кишки. У мышей C57BL/6 удаляли толстую кишку и прямую кишку. Регистрацию афферентов проводили из внутренних нервов, как описано (Hughes, P.A. et al., Gut 2009, **58**(10): 1333-134; Brierley, S.M. et al., Gastroenterology 2004, **127**(1): 166-178). Вкратце, кишечник открывали и закрепляли плоско слизистой стороной вверх в ванне для органов. Ткань орошали модифицированным раствором Кребса (мМ: 117,9 NaCl, 4,7 KCl, 25 NaHCO₃, 1,3 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄ (H₂O)₇, 2,5 CaCl₂, 11,1 D-глюкозы; 95% O₂, 5% CO₂, 34°C), содержащим антагонист кальциевых каналов L-типа нифедипин (1 мкМ), для подавления активности гладких мышц и ингибитором циклооксигеназы индометацином (3 мкМ) для подавления ингибирующего действия простагландинов. Спланхнический нерв растягивали в отсек для записи, заполненный парафином, в котором тонко рассеченные нити укладывали на платиновый электрод для единичных внеклеточных записей потенциалов действия, генерируемых механической стимуляцией рецептивных полей в толстой кишке. Рецептивные поля идентифицировали путем механической стимуляции поверхности слизистой оболочки кистью достаточной жесткости, чтобы активировать все типы механочувствительных афферентов. После определения рецептивные поля тестировали тремя различными механическими стимулами для включения классификации: статическое зондирование с помощью калиброванных нитей фон Фрея (сила 2 г; 3 раза в течение 3 с), поглаживание слизистой оболочки нитями фон Фрея (сила 10 мг; 10 раз) или круговое растяжение (5 г; 1 мин). Ноцицепторы толстой кишки демонстрировали высокие механические пороги активации и реагировали на болевое растяжение (40 мм рт. ст.), круговое растяжение (≥ 7 г) или зондирование нити 2 г, но не на тонкое поглаживание слизистой оболочки (нить 10 мг). Эти нейроны экспрессируют множество каналов и рецепторов, участвующих в боли, становятся механически гиперчувствительными в моделях хронической висцеральной боли и имеют фенотип ноцицептора. Поэтому их называют «ноцицепторами толстой кишки». После того, как были установлены исходные

ответы ноцицепторов толстой кишки на механические раздражители (2 г филамента), механочувствительность была повторно протестирована через 10 минут после применения трипсина (10 нМ), NE (100 нМ) или CS (100 нМ). Протеазы были нанесены на металлический цилиндр, помещенный над рецептивным слизистым полем, представляющим интерес. Было показано, что этот путь введения активирует афференты толстой кишки (Hughes, P.A. et al., Gut 2009, **58**(10): 1333-134). Потенциалы действия были проанализированы с использованием функции волнового знака Spike2 и различены как отдельные единицы на основе различимой формы волны, амплитуды и длительности.

Висцеральная гиперчувствительность толстой кишки (CVH). CVH была индуцирована внутриколоническим введением тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS), как описано (Hughes, P.A., et al., Gut 2009, **58**(10): 1333-134; Brierley, S.M. et al., Gastroenterology 2004, **127**(1): 166-178). Вкратце, 12-недельных мышей не кормили в течение ночи с доступом к 5% раствору глюкозы. Анестезированным мышам (5% изофлуран) через полиэтиленовый катетер, вставленный в 3 см от заднего прохода, вводили TNBS (100 мкл, содержащий 4 мг TNBS в 30% EtOH). Затем мышам давали возможность восстановиться в течение 28 дней. В это время у мышей наблюдаются механическая гиперчувствительность толстой кишки, аллодиния и гипералгезия. Поэтому их называют мышами CVH.

Висцеромоторные ответы (VMR) на колоректальное растяжение (CRD). Электромиография (EMG) мышц брюшного пресса использовалась для мониторинга VMR к CRD (Eichel, K. et al., Nat. Cell Biol. 2016, **18**(3): 303-310). В правую брюшную мышцу мышей под изофлурановым наркозом имплантировали электроды. Мыши восстанавливались в течение по крайней мере трех дней до оценки VMR. В день оценки VMR мышей анестезировали изофлураном, и в ободочную кишку посредством клизмы вводили несущую среду (физиологический раствор) или протеазный коктейль (10 нМ трипсина, 100 нМ NE, 100 нМ CS) (100 мкл). Одной группе мышей за 30 мин до протеазного коктейля в толстую кишку вводили I-343 (30 мг/кг, 100 мкл). В колоректум на 0,25 см позади заднего прохода вводили смазанный баллон (2,5 см). К основанию хвоста прикрепляли баллонный катетер и соединяли с баростатом (Isobar 3, G&J Electronics) для градуированного и с контролируемым давлением раздувания баллона. Мышам давали возможность восстановиться от анестезии в течение 15 минут перед последующим CRD. Растяжение применялись при 20, 40, 50, 60, 70 и 80 мм рт. ст. (продолжительность 20 с) с 4-минутными интервалами; окончательное растяжение было через 30 минут после введения протеазы или носителя. Сигнал EMG регистрировался (верхний уровень NL100AK), усиливался (NL104), фильтровался (NL 125/126, Neurolog, Digitimer Ltd, полоса пропускания 50-5000 Гц) и оцифровывался (CED 1401, Cambridge Electronic Design) для автономного анализа с использованием Spike2 (Cambridge Electronic Design). Аналоговый сигнал EMG выпрямляли и интегрировали. Чтобы количественно оценить величину VMR при каждом давлении растяжения, площадь под кривой (AUC) во время растяжения (20 с) корректировали с учетом исходной активности (предварительное

растяжение AUC, 20 с). Податливость толстой кишки оценивали, применяя градуированные объемы (40-200 мкл, длительность 20 с) к баллону у бодрствующих мышей во время регистрации соответствующего колоректального давления, как описано (Eichel, K. et al., Nat. Cell Biol. 2016, **18**(3): 303-310; Irannejad, R. et al., Nature 2013, **495**(7442): 534-538).

Диссоциация DRG нейронов для изучения передачи сигналов и трафика. У мышей C57BL/6 и крыс Sprague-Dawley собирали DRG (все уровни). DRG инкубировали с коллагеназой IV (2 мг/мл) и диспазой II (1 мг/мл) в течение 30 минут (мыши) и 45 минут (крысы) при температуре 37°C. DRG диспергировали растиранием с помощью оплавленной пипетки Пастера. Диссоциированные нейроны трансфицировали mPAR₂-GFP (1 мкг), биосенсорами FRET CytoEKAR, NucEKAR, pmCKAR или CytoCKAR (все по 1 мкг) или биосенсорами BRET PAR2-RLuc8 (125 нг) и βARR2-FYP (475 нг) с использованием устройства Lonza 4D-Nucleofector X в соответствии с инструкциями производителя. Нейроны наносили на стеклянные покровные стекла, покрытые ламинином (0,004 мг/мл) и поли-L-лизином (0,1 мг/мл) для конфокальной микроскопии, на планшеты ViewPlate-96 (PerkinElmer) для анализов FRET или на CulturPlates (PerkinElmer) для анализов BRET. Нейроны содержались в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), антибиотик-антимитотик и добавку N1, в течение 48 часов до исследования.

Трафик PAR₂ в DRG нейронах. DRG нейроны мыши, экспрессирующие mPAR₂-GFP, инкубировали с трипсином (10 нМ), CS (100 нМ), NE (100 нМ) или несущей средой (30 мин, 37°C), и фиксировали (4% параформальдегид, 20 мин, 4°C). NeuN детектировали путем непрямой иммунофлуоресценции, как описано (Jensen, D.D. et al., Sci Transl Med. 2017, **9**(392), eaal3447). Нейроны наблюдали с использованием конфокального микроскопа Leica SP8 с масляным объективом HCX PL APO 63x (NA 1,40). Интернализацию PAR₂ в NeuN-позитивных нейронах определяли количественно с использованием программного обеспечения ImageJ. Границу цитоплазмы в нейрональной коме определяли по флуоресценции NeuN. Флуоресценцию mPAR₂-GFP в пределах 0,5 мкм от границы определяли как рецептор, связанный с плазматической мембраной. Определяли отношение плазматической мембраны к цитозольному mPAR₂-GFP.

FRET анализы в DRG нейронах. DRG нейроны крысы, экспрессирующие биосенсоры FRET, ограничивали сывороткой (0,5% FBS в течение ночи) и уравнивали в HBSS-HEPES (10 mM HEPES, pH 7,4, 30 мин, 37°C). FRET анализировали с использованием системы визуализации с высоким содержанием Operetta CLS (PerkinElmer) или INCell Analyzer 2000 GE Healthcare Life Sciences). Для анализа отношения эмиссии CFP/YFP клетки последовательно возбуждали с использованием фильтра CFP (410-430 нм), а эмиссию измеряли с использованием фильтров YFP (520-560 нм) и CFP (460-500 нм). Клетки визуализировали с интервалом в 1 или 2 минуты. Определяли исходный уровень, нейроны заражали трипсином (10 или 100 нМ) или несущей средой, и ответы регистрировали в течение еще 30 мин. Затем нейроны заражали

форболом 12,13-дибутиратом (PDBu, 200 нМ, 10 минут) для биосенсоров EKAR или PDBu (200 нМ) и коктейлем ингибитором фосфатазы-2 (SigmaAldrich, 10 минут) для биосенсоров SKAR. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Harmony 4.1 или Image J 1.51. Полученные изображения выравнивали, клетки отбирали на основе диаметра, и для каналов FRET и CFP рассчитывали интенсивность флуоресценции. Вычитали интенсивность фона, и отношение FRET определяли как изменение отношения эмиссии FRET/донор (EKAR) или донор/FRET (SKAR) относительно исходного уровня для каждой клетки (F/F_0). Для анализа после стимуляции PDBu отбирали клетки с $> 5\%$ изменениями F/F_0 . Нейроны инкубировали с I-343 (10 мкМ), SCH530348 (100 нМ) или несущей средой (30 мин, 37°C, предварительная инкубация и включение в течение всего периода).

BRET анализы в DRG нейронах. DRG нейроны мыши уравнивали в HBSS-HEPES (30 мин, 37°C), и инкубировали с субстратом элентеразина h люциферазы Renilla (NanoLight Technologies) (5 мкМ, 5 мин). Соотношения BRET измеряли при 475 ± 30 нм и 535 ± 30 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов CLARIOstar Monochromometer (BMG LabTech) до и после введения трипсина (10 нМ), NE (100 нМ) или CS (100 нМ). Данные представлены в виде отношения BRET, рассчитанного как отношение сигналов YFP к RLuc8 и нормализованного к среднему исходному уровню. Данные представлены в виде площади под кривой для 25-минутного анализа.

Ca²⁺ анализы в DRG нейронах. [Ca²⁺]_i определяли в DRG нейронах от мышей WT и Par₂-Nav_{1.8}, как описано (Tsvetanova, N.G., et al., Nat. Chem. Biol. 2014, **10**(12): 1061-1065). Нейроны нагружали Fura-2AM (1 мкМ) в Ca²⁺- и Mg²⁺-содержащую DMEM (45 мин, комнатная температура). Флуоресценцию отдельных нейронов измеряли при возбуждении 340 нм и 380 нм и 530 нм с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti с 20-кратным увеличением и камеры Photometrics CoolSNAP. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Nikon Ti Element. Культуры сначала подвергали воздействию KCl (65 мМ) для идентификации чувствительных нейронов, а затем подвергали воздействию трипсина (100 нМ). Для анализа отбирали клетки с диаметром ≤ 25 мкм. Для определения порога активации величину отношения 340/380 после воздействия трипсина сравнивали с исходным соотношением. Нейроны считались чувствительными к трипсину, если отношение 340/380 составляло $\geq 0,1$ от исходного уровня.

Поглощение трехсторонних зондов в DRG нейронах. DRG нейроны мыши, экспрессирующие mPAR₂-GFP, инкубировали с Су5-этиловым эфиром (контроль) или Су5-Chol (200 нМ, 60 мин, 37°C) и затем промывали в HBSS-HEPES. Нейроны переносили в нагретую камеру (37°C) в HBSS-HEPES и наблюдали с помощью конфокальной микроскопии до или после обработки трипсином (100 нМ, 15 мин). Изображения получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP8 с масляным объективом HCX PL APO 63x (NA 1.40). Настройки получения изображения были одинаковыми для определения флуоресценции Су5-Chol и Су5-этилового эфира.

Клеточные линии, трансфекция. Клетки HEK293 культивировали в DMEM с добавлением 10% (об./об.) FBS (5% CO₂, 37°C). При необходимости ограничение сыворотки достигалось путем замены культуральной среды DMEM, содержащей 0,5% FBS, в течение ночи. Клетки временно трансфицировали с использованием полиэтиленimina (PEI) (1:6 ДНК:PEI).

FRET анализы в клетках HEK293. Клетки HEK293 временно трансфицировали в чашках размером 10 см (слияние ~50%) с биосенсорами Flag-PAR₂-HA (2,5 мкг) и FRET CytoEKAR или NucEKAR (2,5 мкг) (Jensen, D.D. et al., *Sci Transl Med.* 2017, **9**(392), eaal3447; Thomsen, A.R.V., et al., *Cell* 2016, **166**(4): 907-919). В экспериментах по изучению роли динамина клетки трансфицировали FLAG-PAR₂-HA (1,25 мкг), биосенсором FRET (1,25 мкг) и либо DynWT-HA, DynK44E-HA, либо pcDNA3.1 (2,5 мкг). Через 24 ч после трансфекции клетки высевали на лунки планшета ViewPlate-96 (PerkinElmer). FRET оценивали через 72 часа после трансфекции после ограничения сывороткой в течение ночи. Клетки уравнивали в HBSS-HEPES (30 мин, 37°C). FRET измеряли с использованием устройства для считывания микропланшетов PHERAstar FSX (BMG LabTech). Для анализа отношения эмиссии CFP/YFP клетки последовательно возбуждали с использованием фильтра CFP (425/10 нм) с эмиссией, измеренной с использованием фильтров YFP (550/50 нм) и CFP (490/20 нм). FRET определяли до и после стимуляции трипсином (10 нМ), NE (100 нМ), CS (100 нМ), форболом 12,13-дибутиратом, PDBu (положительный контроль, 1 мкМ) или несущей средой. Рассчитывали отношение FRET (интенсивность донора/акцептора для EKAR или интенсивность акцептора/донора для SKAR и Eрас) и корректировали с учетом исходного уровня и обработки несущей средой для определения FRET, индуцированного лигандом (Δ FRET). Эффекты лечения определяли путем сравнения площади под значениями кривой. Ингибиторы сигнализации растворяли в HBSS-HEPES. PS2 и неакт. PS2 растворяли в HBSS-HEPES+1% ДМСО. Клетки инкубировали с UBO-QIC (100 нМ), AG1478 (1 мкМ), Gö6983 (1 мкМ), PS2 или неакт. PS2 (30 мкМ) или несущей средой (30 мин предварительная инкубация, включение в течение всего периода).

BRET анализы в клетках HEK293. Клетки HEK293 временно трансфицировали в 10 см чашки (~50% слияния) с: PAR₂-RLuc8 (1 мкг) и либо RIT-Venus, либо Rab5a-Venus (оба по 4 мкг); Flag-PAR₂-HA (1 мкг) и β ARR1-RLuc8 (1 мкг) плюс Rab5a-Venus (4 мкг); или Flag-PAR₂-HA (1 мкг) и G α_q -RLuc8 (0,5 мкг), Gb (1 мкг), Gg (1 мкг) и Rab5a-Venus (4 мкг). Чтобы исследовать роль динамина, клетки трансфицировали PAR₂-RLuc8 (0,5 мкг), RIT-Venus или Rab5a-Venus (2 мкг), и DynWT-HA, DynK44E-HA или pcDNA3.1 (2,5 мкг). Через 24 ч после трансфекции клетки высевали на CulturPlates (PerkinElmer). На следующий день клетки уравнивали в HBSS-HEPES и инкубировали с целентеразином h (NanoLight Technologies) (5 мкМ, 5 мин). Интенсивности RLuc8 и YFP измеряли при 475 \pm 30 нм и 535 \pm 30 нм, соответственно, используя устройство для считывания микропланшетов LUMIstar Omega (BMG LabTech) до и после заражения протеазами, супернатантами биопсии или наполнителем. Данные представлены в виде

отношения BRET, рассчитанного как отношение сигналов YFP к RLuc8 и нормализованного к базовому среднему значению с последующим вычитанием транспортного средства. Эффекты лечения определяли путем сравнения площади под значениями кривой.

Иммунофлуоресцентная и структурированная микроскопия. Клетки HEK293, временно экспрессирующие Flag-PAR2-НА, высевали на покрытое поли-D-лизином покрывающее стекло высокой толерантности и инкубировали в течение ночи. Клетки инкубировали с трипсином (10 нМ) или несущей средой в DMEM в течение 30 мин при 37°C. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде на льду в течение 20 минут и промывали в PBS. Клетки блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS+0,3% сапонина+3% NHS. Клетки инкубировали с первичными антителами к НА (крысиные анти-НА, 1:1000, Roche), EEA-1 (кроличьи анти-EEA-1 1:100, Abcam), Gaq (мышинные анти-GNAQ 1:100, Millipore) в PBS+0,3% сапонина+1% NHS в течение ночи при 4°C. Клетки промывали в PBS и инкубировали со вторичными антителами (козий анти-крысиный Alexa568, ослиный анти-кроличий Alexa488, козий анти-мышинный Dylight405, 1:1000, Invitrogen) в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки промывали PBS и закрепляли на предметных стеклах с пролонгированной закрепляющей средой Diamond (ThermoFisher). Клетки наблюдали с помощью структурированной микроскопии с высоким разрешением (SIM) с использованием инвертированного микроскопа Nikon N-SIM Eclipse TiE с объективом SR Apo-TIRF100x/1.49. Изображения получали в режиме 3D-SIM с использованием лазеров 405, 488 и 561 нм и наборов фильтров для стандартного синего, зеленого и красного излучения на камере Andor iXon 3 EMCCD. Z-стеки собирали с интервалом 125 нм. Для реконструкции SIM изображений использовалось программное обеспечение NIS-Elements AR.

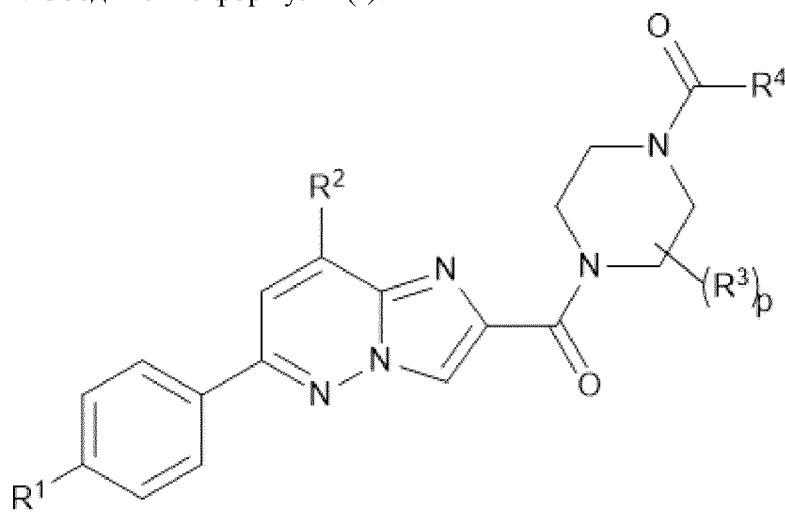
cDNAs. Датчики BRET PAR₂-RLuc8, KRas-Venus, Rab5a-Venus и βARR2-YFP описаны (Jensen, D.D. et al., *Sci Transl Med.* 2017, **9**(392): eaal3447; Yarwood, R. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2017, **114**(46): 12309-12314). Датчики FRET CytoEKAR, NucEKAR, CytoCKAR и pmCKAR были от Addgene (плазмиды 18680, 18681, 14870, 14862, соответственно).

Анализ накопления IP₁. Клетки KNRK-hPAR₂, KNRK, HEK293 или HT-29 высевали при плотности 50×10³ клеток/лунку на прозрачные 96-луночные планшеты (PerkinElmer). Через 24 ч культивирования среду заменяли стимулирующим IP₁ буфером (10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 4,2 mM KCl, 146 mM NaCl, 5,5 mM глюкозы, 50 mM LiCl; 37°C, 5% CO₂). Клетки предварительно инкубировали с антагонистом или несущей средой в течение 30 мин, затем добавляли агонист. Клетки затем дополнительно инкубировали в течение 40 мин. Стимулирующий буфер аспирировали и клетки инкубировали в лизирующем буфере в течение 10 мин (набор для анализа IP-One HTRF[®], Cisbio). Лизаты переносили в 384-луночный OptiPlate (PerkinElmer) и определяли IP₁ (набор для анализа IP-One HTRF[®], Cisbio). FRET с однородным разрешением по времени измеряли с помощью планшет-ридера Envision (PerkinElmer Life Sciences).

Статистика. Результаты представляют собой среднее \pm SEM. Различия оценивались с использованием t-критерия Стьюдента (два сравнения) или одно- или двухстороннего ANOVA (множественные сравнения), за которым следовал критерий множественных сравнений Тьюки (электрофизиологические анализы) или критерий множественных сравнений Даннетта (соматическая ноцицепция, одноэлементные анализы FRET). Для анализов BRET и популяционных тестов FRET площадь под данными кривой нормализовали для согласованных ответов с одним трипсином и сравнивали со 100% с использованием t-теста с одним образцом. Для анализов ноцицепции толстой кишки (VMR на CRD) данные статистически анализировали с помощью обобщенных оценочных уравнений с последующим специальным тестом Фишера с наименьшей разницей, когда это было уместно, с использованием SPSS 23.0. Для статистического анализа и подготовки графиков использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 7 (Сан-Диего, Калифорния, США).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R^1 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил или галоген;

R^2 представляет собой C_1 - C_6 алкил, C_3 - C_6 циклоалкил или C_1 - C_6 арил, каждый обязательно замещенный от 1 до 3 галогенами;

R^3 представляет собой оксо или C_1 - C_6 алкил;

p обозначает целое число от 0 до 3;

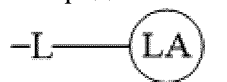
R^4 представляет собой $-C_1$ - C_6 алкил $S(O)_2OH$, -1,2,3-триазол-1-уксусную кислоту, $-NHR^7$, -бицикло[2.2.2]октан $C(O)OR^6$, $-C_4$ - C_8 циклоалкил- R^5 , 4-6-членную гетероциклическую или гетероарильную группу, замещенную $-C_1$ - C_6 алкил- R^5 , или $-(CH_2)_2C(O)NHC_2-C_{10}$ алкил, где C_2 - C_{10} алкил замещен от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$;

R^5 представляет собой $-C(O)NHR^7$ или $-NHC(O)R^7$;

R^6 представляет собой H или R^7

R^7 представляет собой $-R^8$, $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ или $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$, где $-C_1$ - C_{20} алкил, $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NH_2$ и $-C_1$ - C_{20} алкил $C(O)NR^8$ независимо замещены от 2 до 10 $-NH_2$ или $-OH$, и где один или несколько атомов углерода в алкильной группе независимо заменены азотом или кислородом;

R^8 представлен формулой:



где

L представляет собой линкерный фрагмент длиной от 1 до 50 нм; и

LA представляет собой липидный якорь, который способствует введению соединения в плазматическую мембрану.

2. Соединение в соответствии с п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^1 представляет собой галоген и R^2 представляет собой C_1 - C_6 алкил.

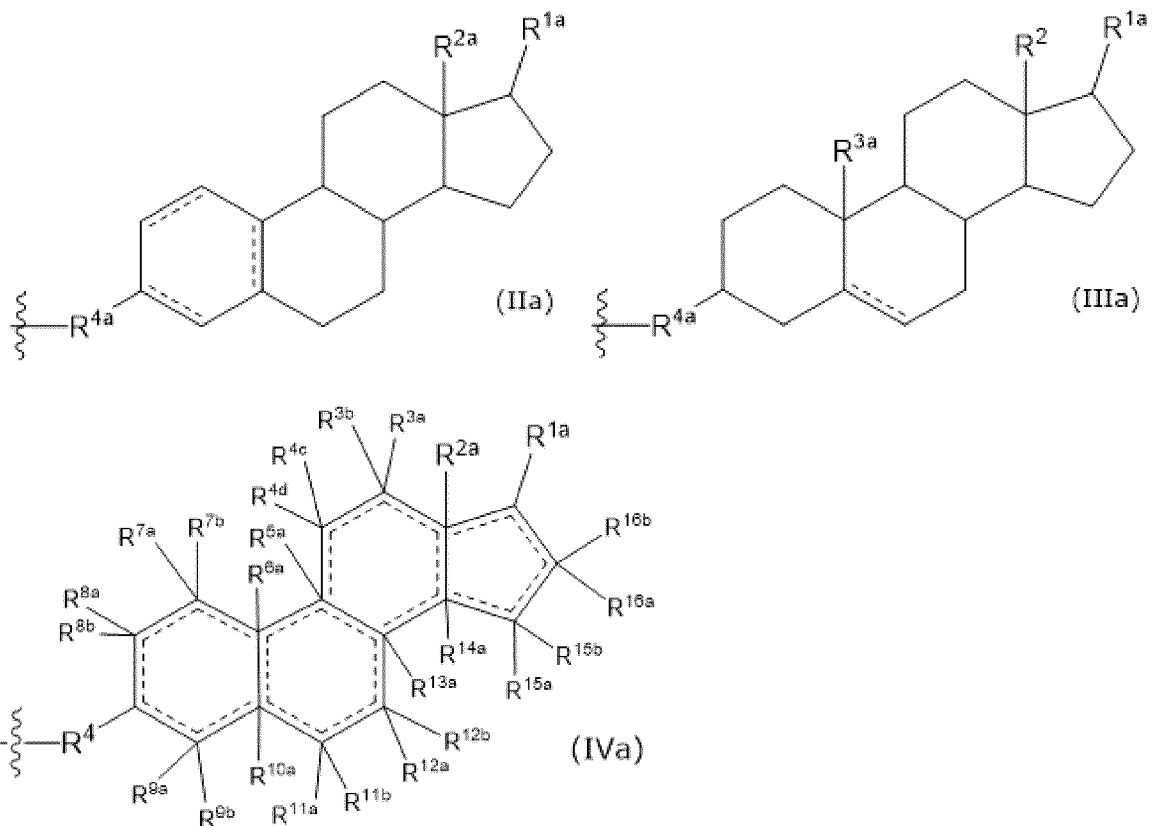
3. Соединение в соответствии с п.2 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^1 представляет собой фтор и R^2 представляет собой трет-бутильную группу.

4. Соединение в соответствии с любым из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^3 представляет собой C_1-C_6 алкил и p обозначает 2.

5. Соединение в соответствии с п.4 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^3 представляет собой метил и p обозначает 2.

6. Соединение в соответствии с любым из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, где липидный якорь (LA) распределен в липидных мембранах, которые нерастворимы в неионных моющих средствах при температуре 4°C .

7. Соединение в соответствии с любым из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, где липидный якорь (LA), который способствует введению соединения в плазматическую мембрану, представлен формулами (IIa), (IIIa) или (IVa):



где

R^{1a} представляет собой, независимо, замещенный C_{1-12} алкил, алкенил, алкинил или алкокси группу;

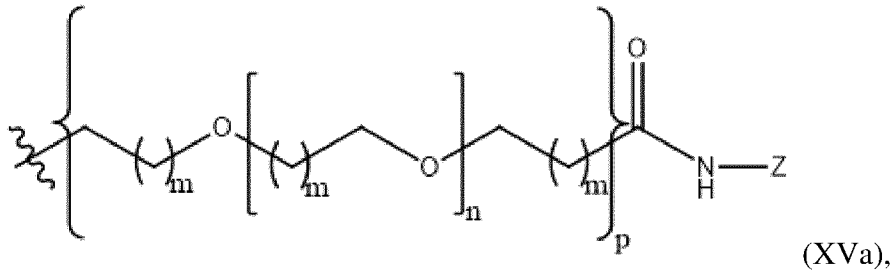
R^{2a} и R^{3a} , R^{3b} , R^{4b} , R^{4c} , R^{5a} , R^{6a} , R^{7a} , R^{7b} , R^{8a} , R^{8b} , R^{9a} , R^{9b} , R^{10a} , R^{11a} , R^{11b} , R^{12a} , R^{12b} , R^{13a} , R^{14a} , R^{15a} , R^{15b} , R^{16a} и R^{16b} независимо представляют собой H, C_{1-3} алкил, гидроксил, C_{1-3} алкокси или амино; или

необязательно, R^{3a} , R^{3b} и/или R^{4b} , R^{4c} , и/или R^{7a} , R^{7b} и/или R^{8a} , R^{8b} и/или R^{11a} , R^{11b} и/или R^{12a} , R^{12b} и/или R^{15a} , R^{15b} и R^{16a} , R^{16b} взяты вместе с образованием =O (двойная связь с кислородом);

R^{4a} представляет собой C, O, NH или S; и

==== обозначает одинарную или двойную связь.

8. Соединение в соответствии с любым из пп.1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой линкерный фрагмент длиной от 1 до 50 нм, где L представлен формулой (XVa):



где

Z обозначает присоединенную группу между линкером и липидным якорем и представляет собой $-C_1-C_{10}$ алкил-, $-C_2-C_{10}$ алкенил-, $-C_2-C_{10}$ алкинил-, $-C_1-C_{10}$ алкилC(O)-, $-C_2-C_{10}$ алкенилC(O)- или $-C_2-C_{10}$ алкинилC(O)-; или

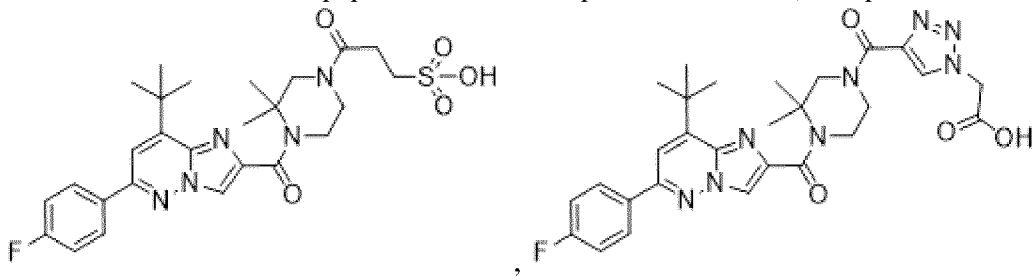
Z вместе с соседним амином, необязательно, представляет собой C-концевую амидированную аминокислоту, выбранную из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, цистеина, лизина, аргинина, серина или треонина; где аминокислота присоединена к липидному якорю через его боковую функциональную группу;

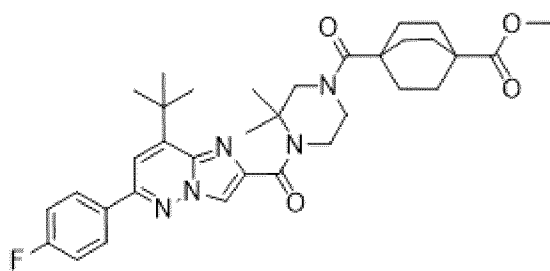
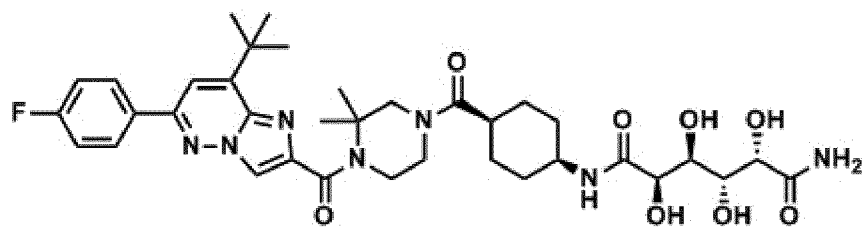
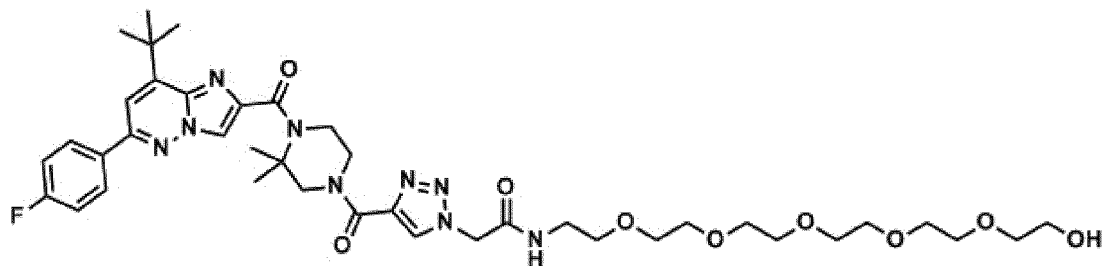
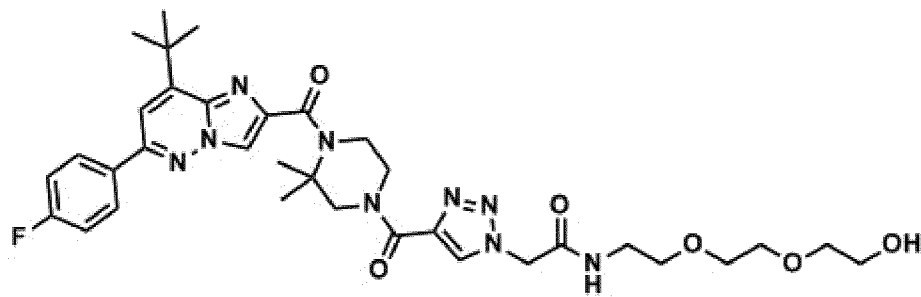
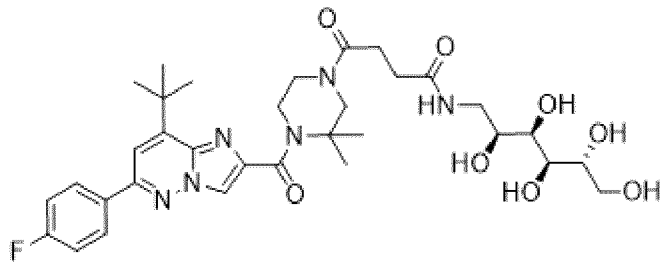
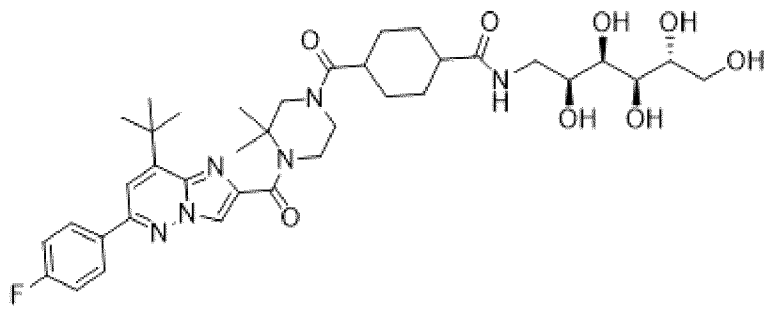
m обозначает 1 или 2;

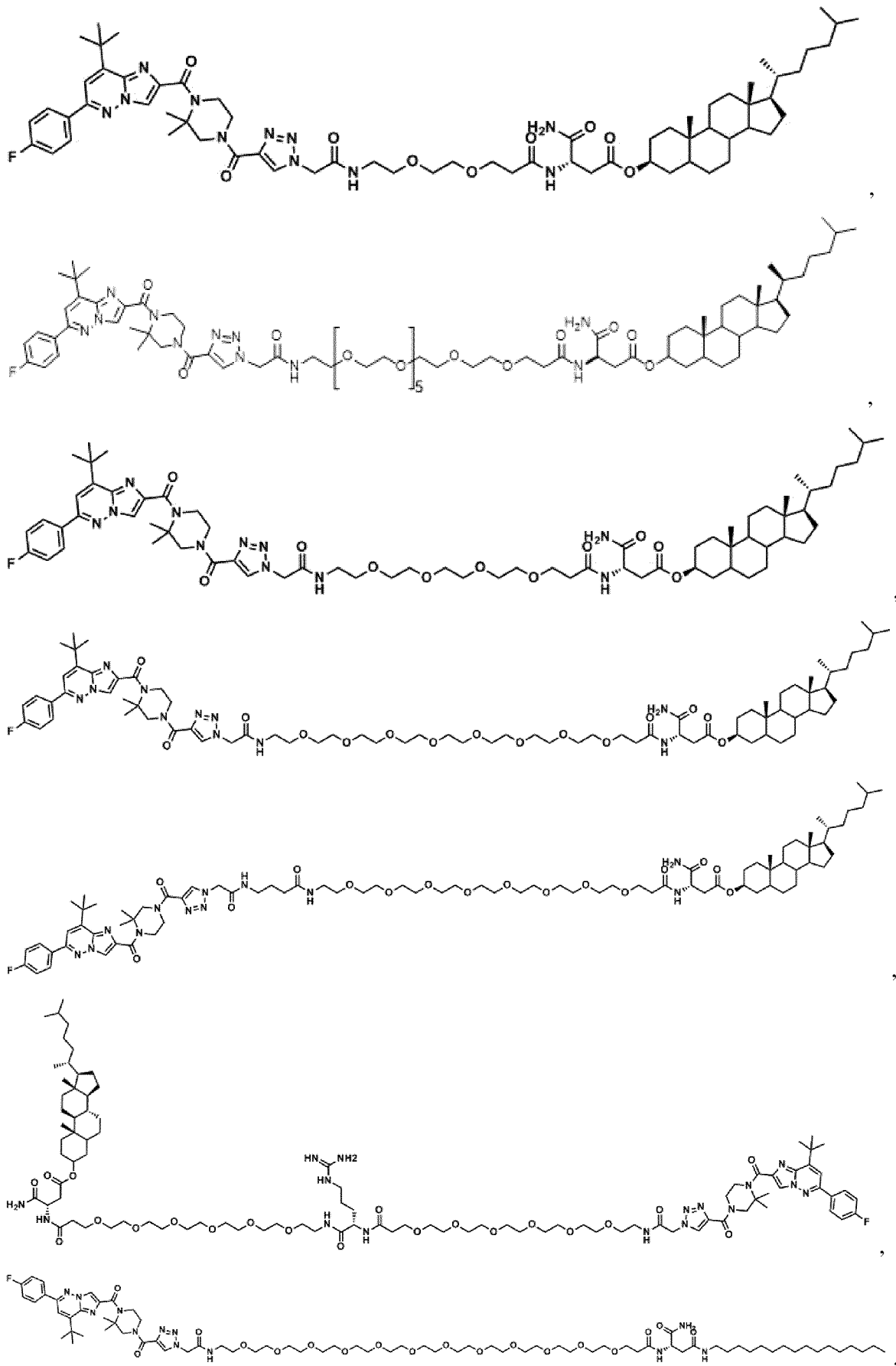
n обозначает от 1 до 20; и

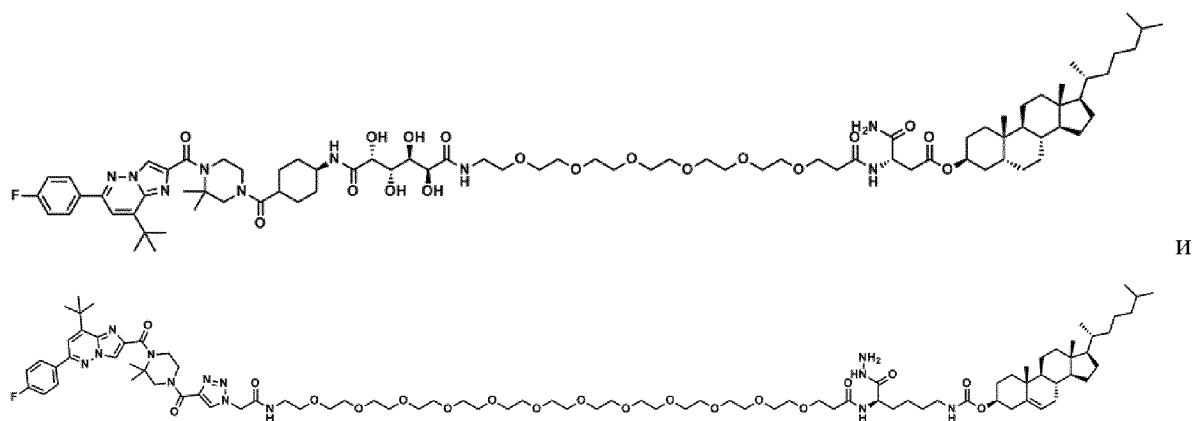
p обозначает от 1 до 8.

9. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из:









10. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемую соль вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

11. Способ ингибирования передачи сигнала PAR_2 , включающий контактирование рецептора с соединением в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой солью.

12. Способ ингибирования передачи сигнала PAR_2 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества соединения в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли.

13. Способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR_2 , включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества соединения в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ в соответствии с п.13, где заболевание или расстройство опосредовано передачей сигнала эндосомальным PAR_2 .

15. Способ в соответствии с п.13 или 14, где заболевание или расстройство, опосредованное передачей сигнала PAR_2 , выбрано из острых и хронических воспалительных заболеваний, метастазирования опухоли, моторики желудочно-кишечного тракта, боли, зуда, кожных заболеваний, таких как атопический дерматит, алиментарного ожирения, астмы, ревматоидного артрита, периодонтита, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, злокачественного новообразования, фиброзных заболеваний, метаболического нарушения и неврологического заболевания.

16. Способ в соответствии с п.13 или 14, где заболевание или расстройство, опосредованное передачей сигнала PAR_2 , представляет собой боль, связанную с синдромом раздраженного кишечника.

17. Соединение в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемая соль для профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR_2 .

18. Применение соединения в соответствии с любым из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении медицинского препарата для

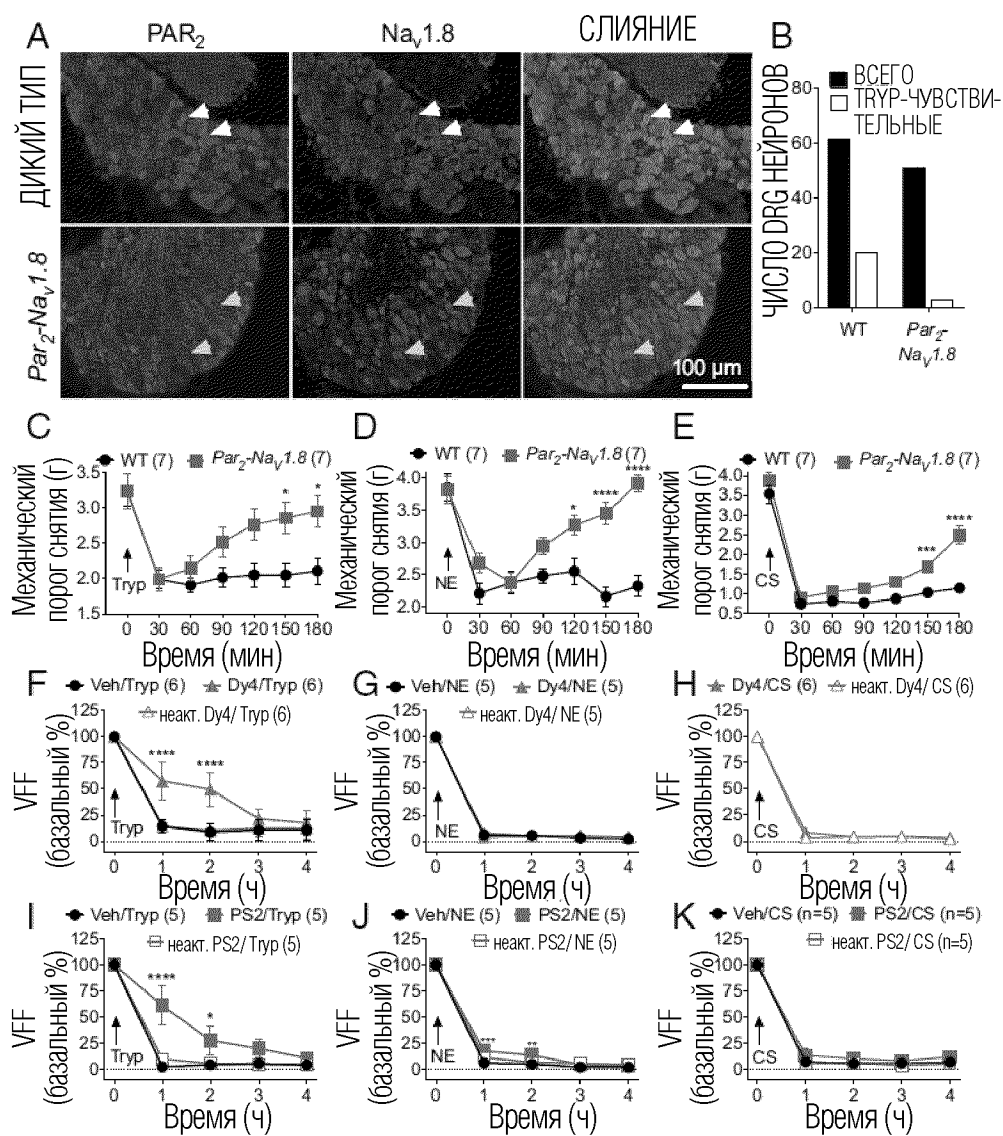
профилактики или лечения заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

19. Соединение в соответствии с любым из пп.1-9 или фармацевтическая композиция в соответствии с п.10 для применения при профилактике или лечении заболевания или расстройства, опосредованного передачей сигнала PAR₂.

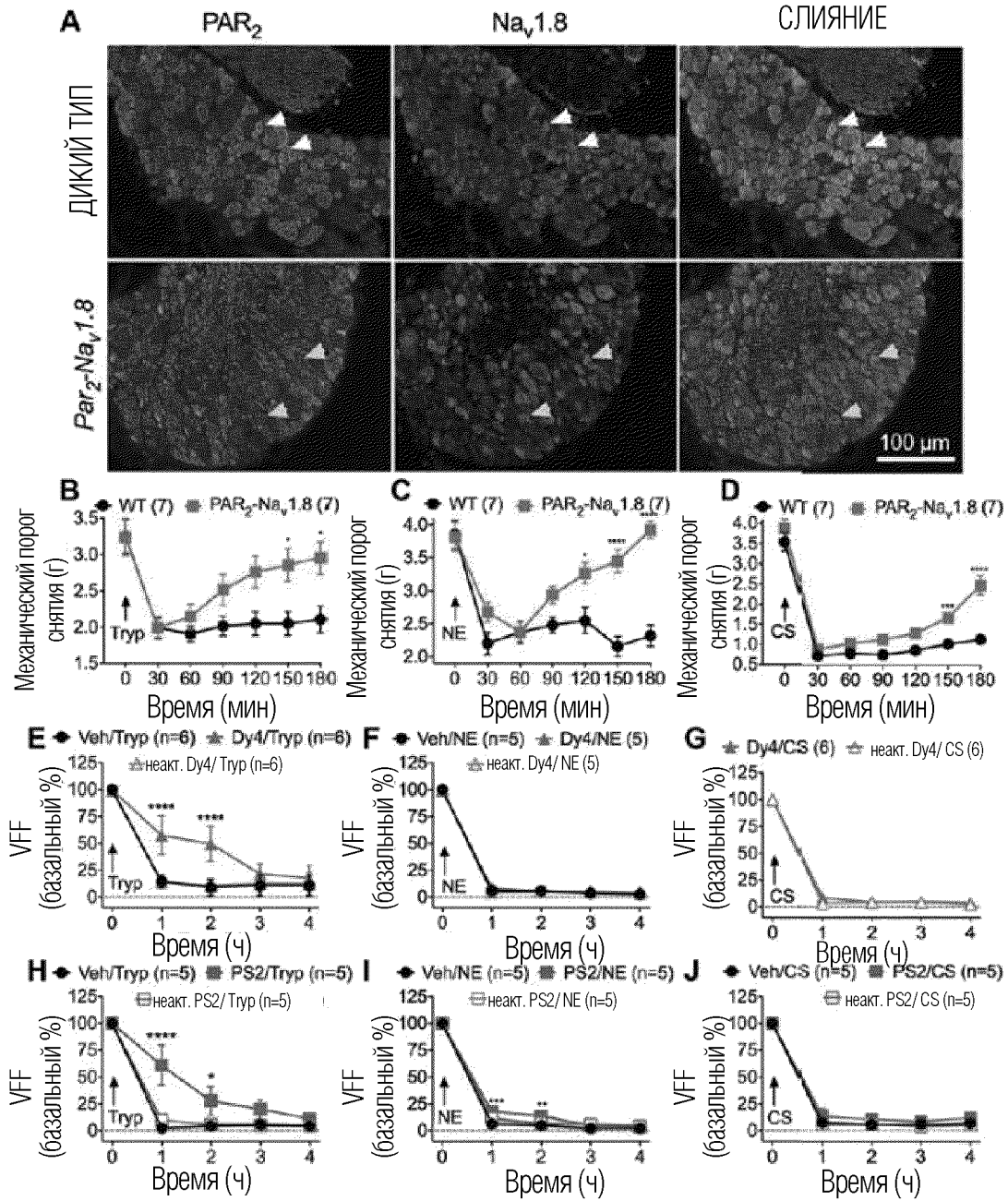
20. Соединение в соответствии с любым из пп.1-9 или фармацевтическая композиция в соответствии с п.10 для применения при профилактике или лечении заболевания или расстройства, выбранного из острых и хронических воспалительных заболеваний, метастазирования опухоли, моторики желудочно-кишечного тракта, боли, зуда, кожных заболеваний, таких как атопический дерматит, алиментарного ожирения, астмы, ревматоидного артрита, периодонтита, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, злокачественного новообразования, фиброзных заболеваний, метаболического нарушения и неврологического заболевания.

По доверенности

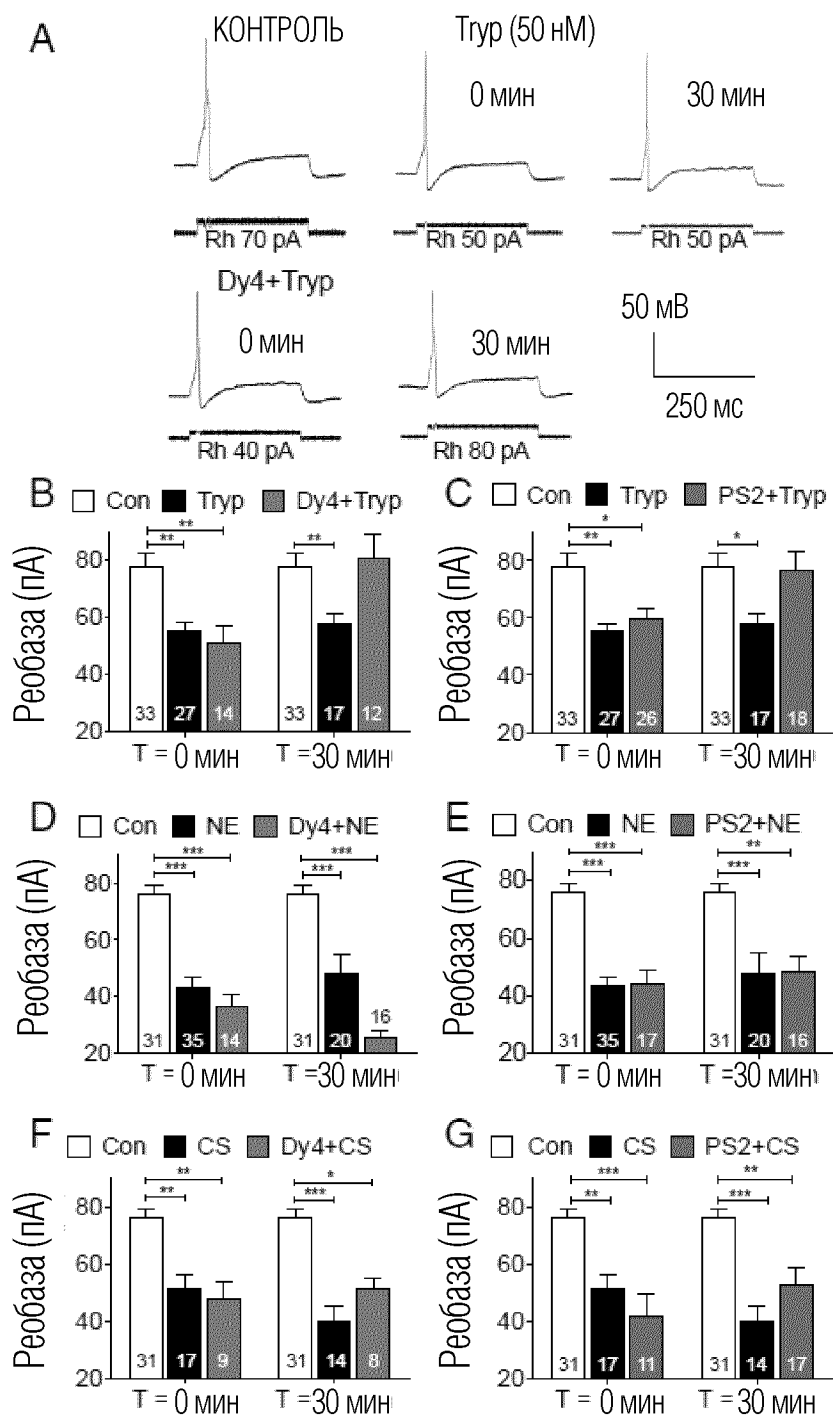
ФИГ. 1



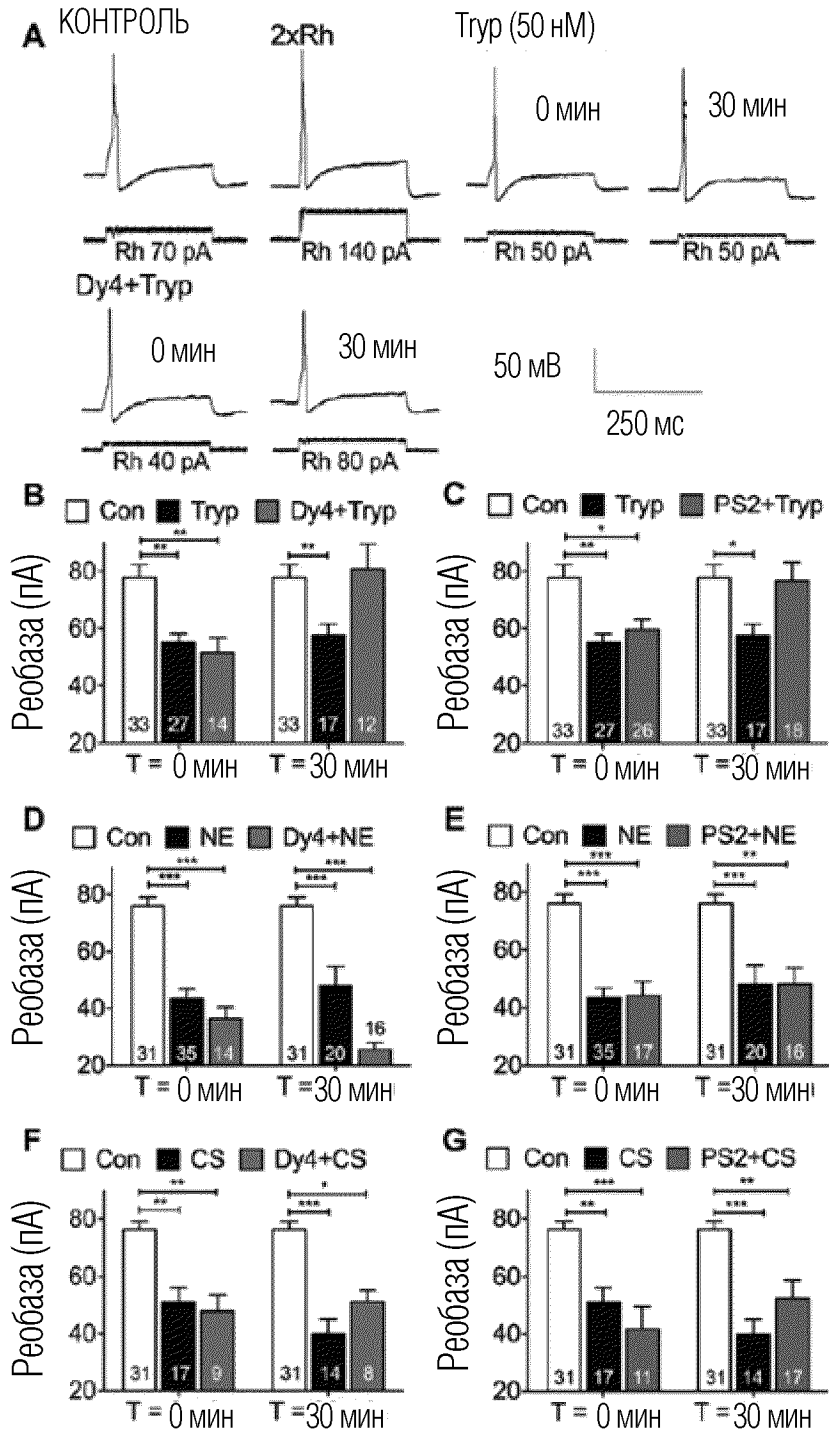
ФИГ. 1А



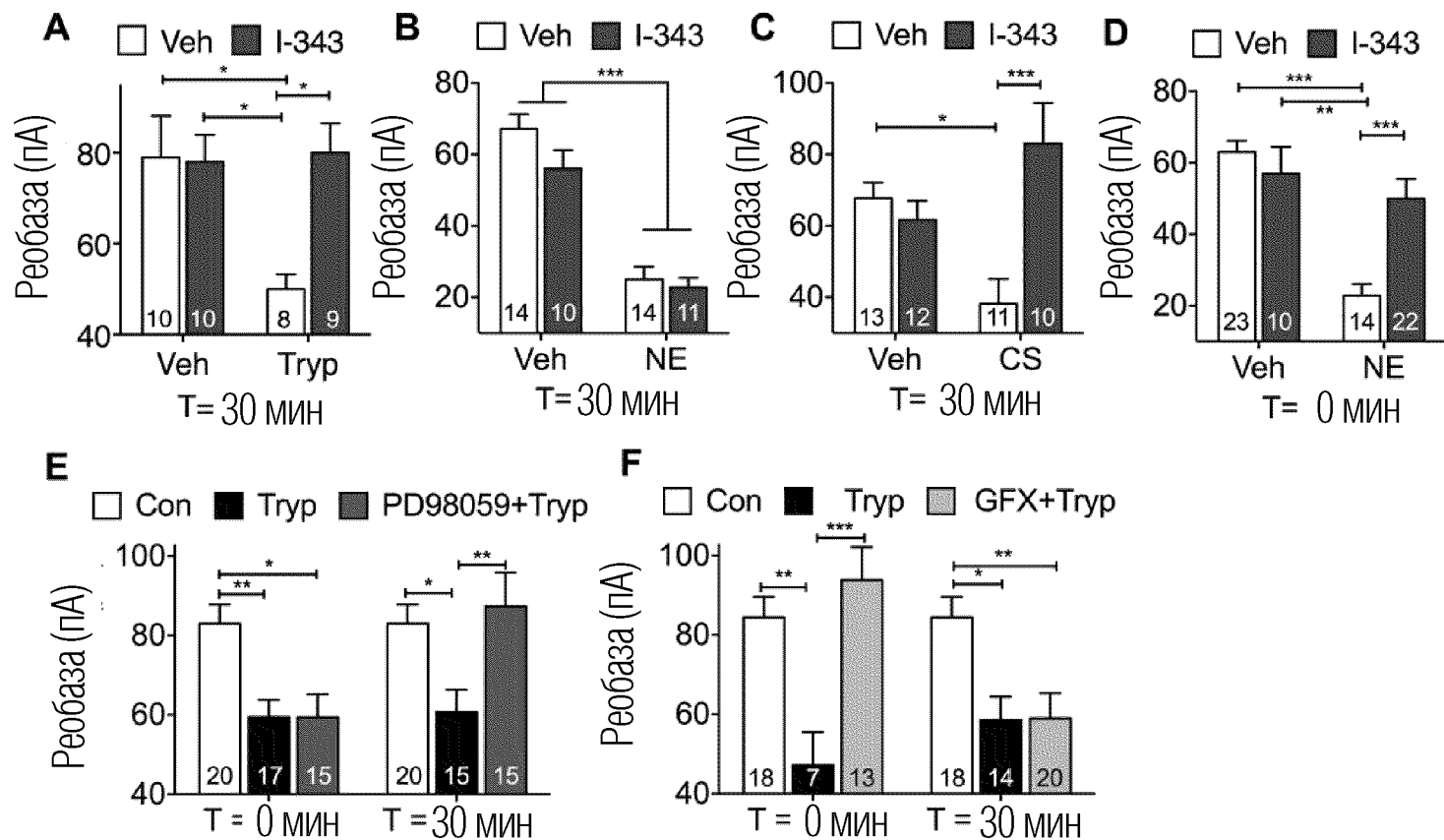
ФИГ. 2



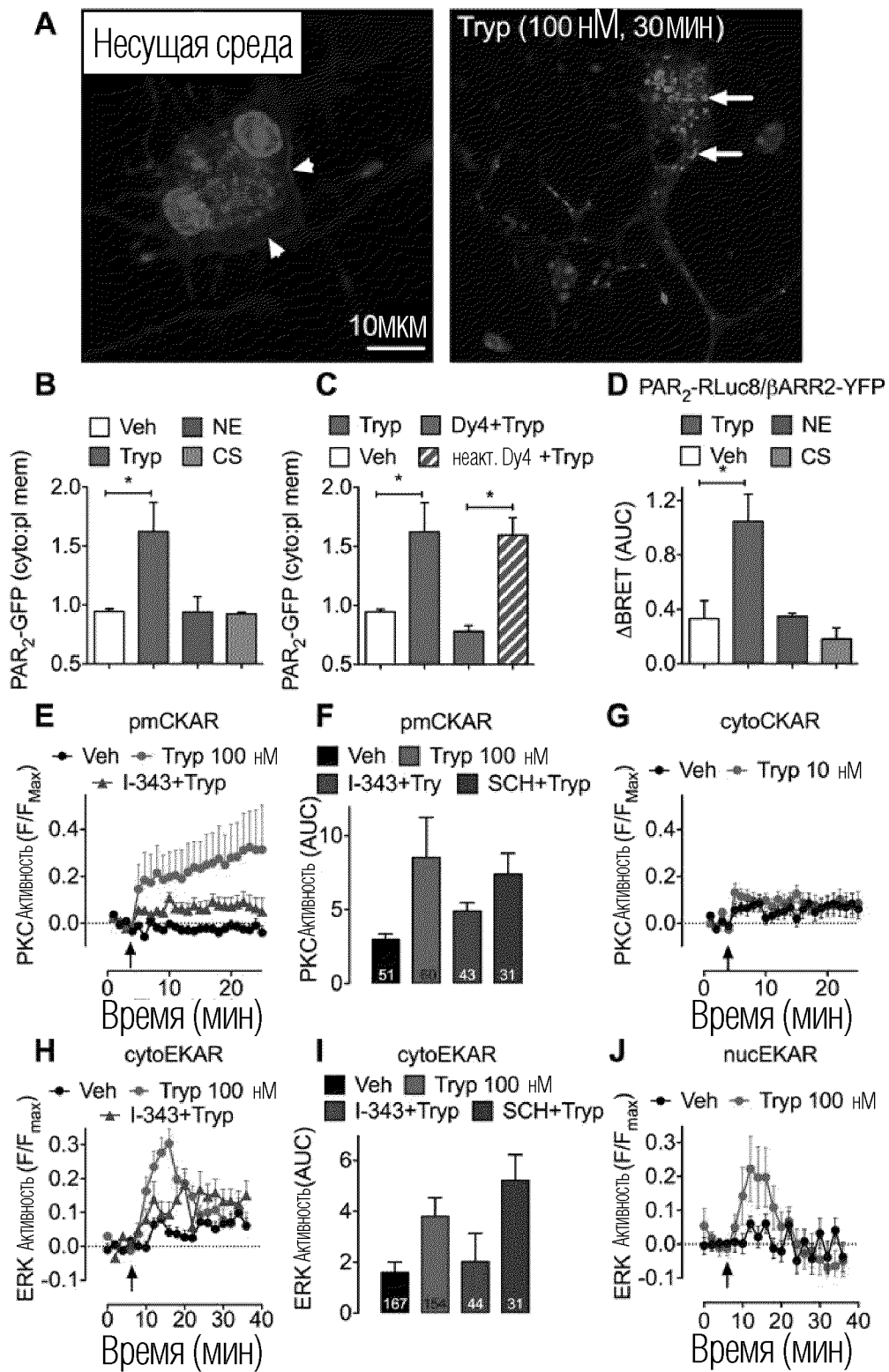
ФИГ. 2А



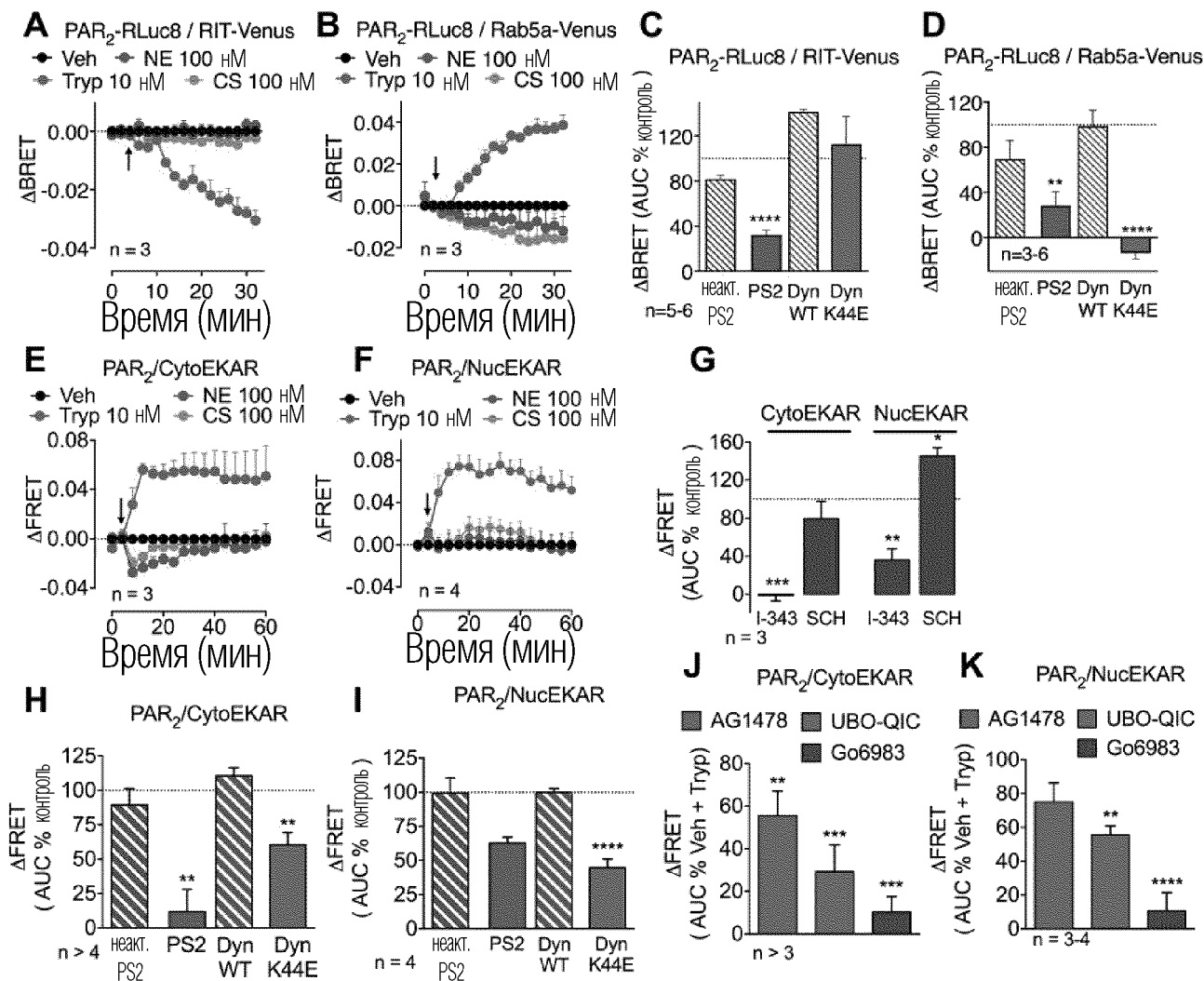
ФИГ. 3



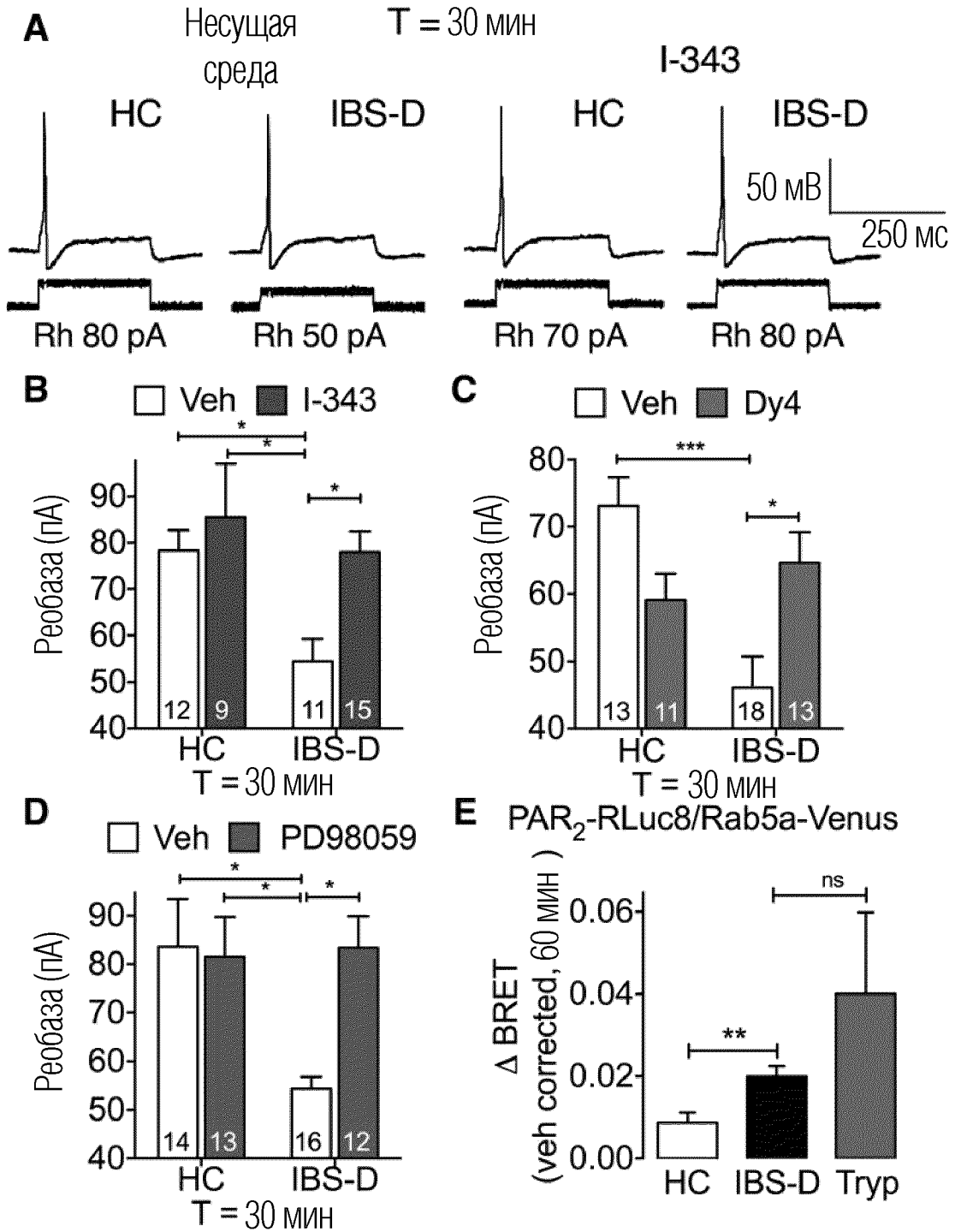
ФИГ. 4



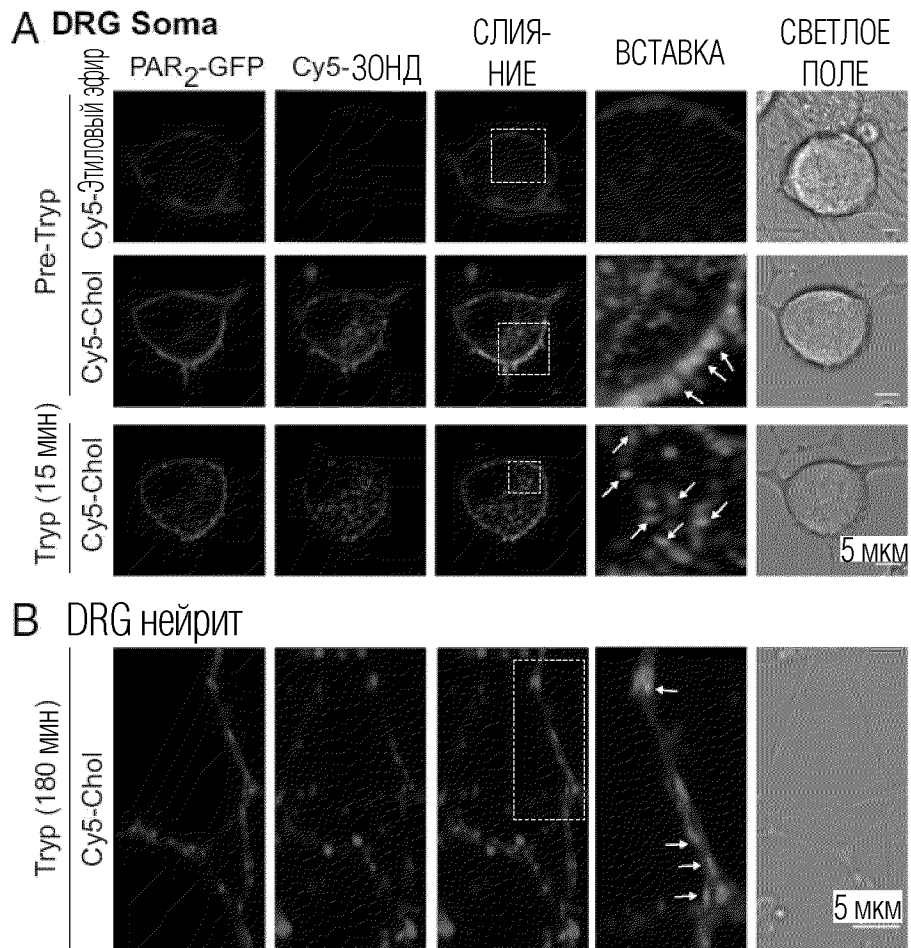
ФИГ. 5



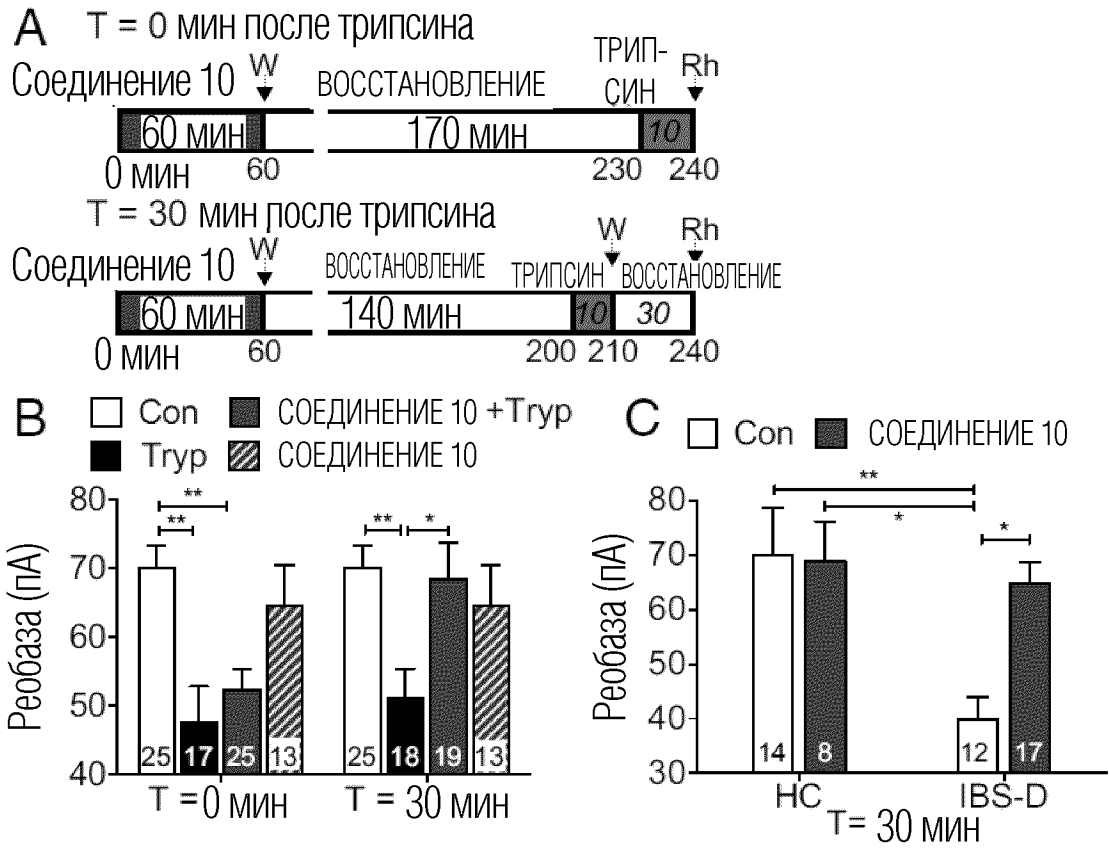
ФИГ. 6



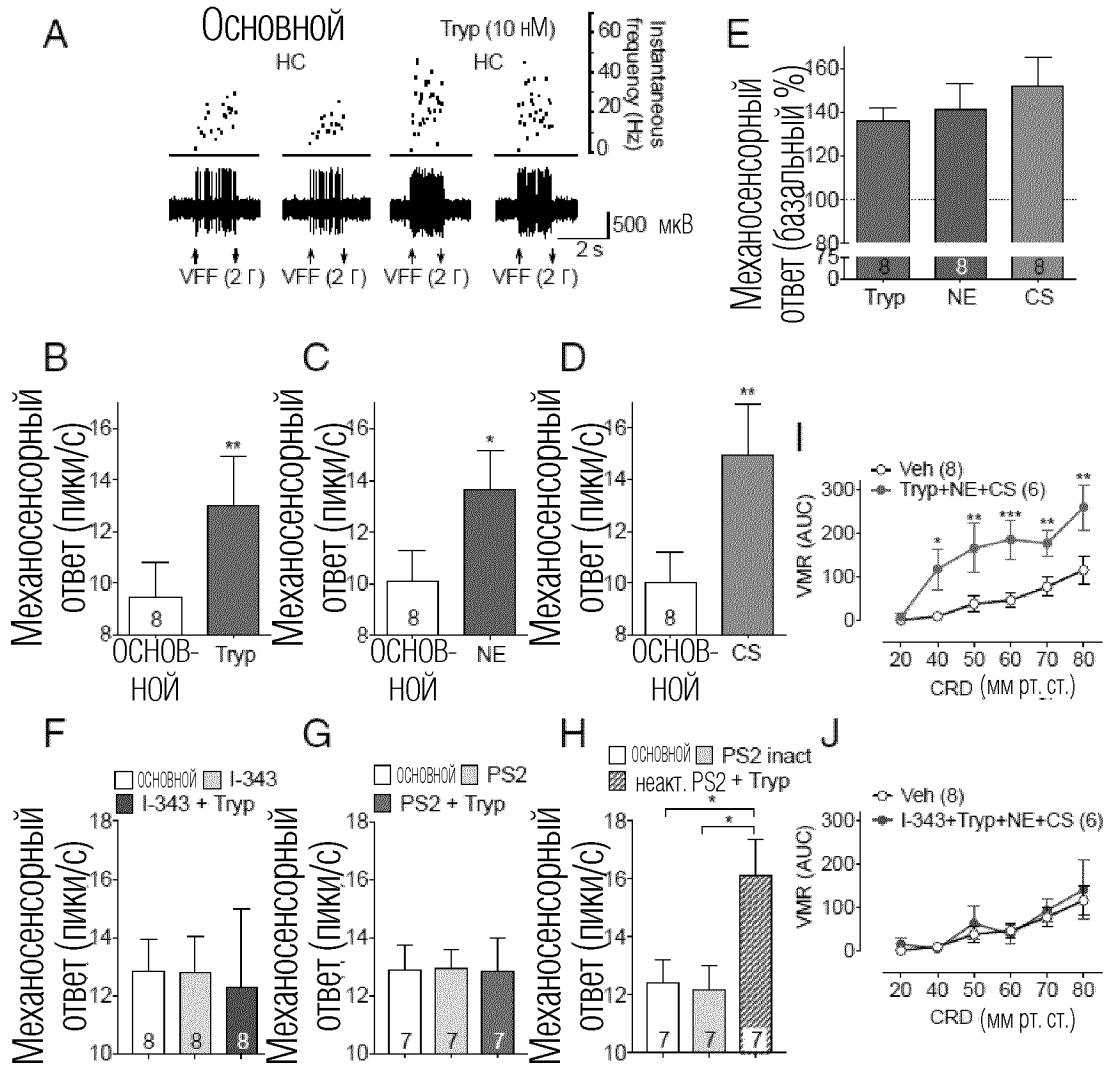
ФИГ. 7



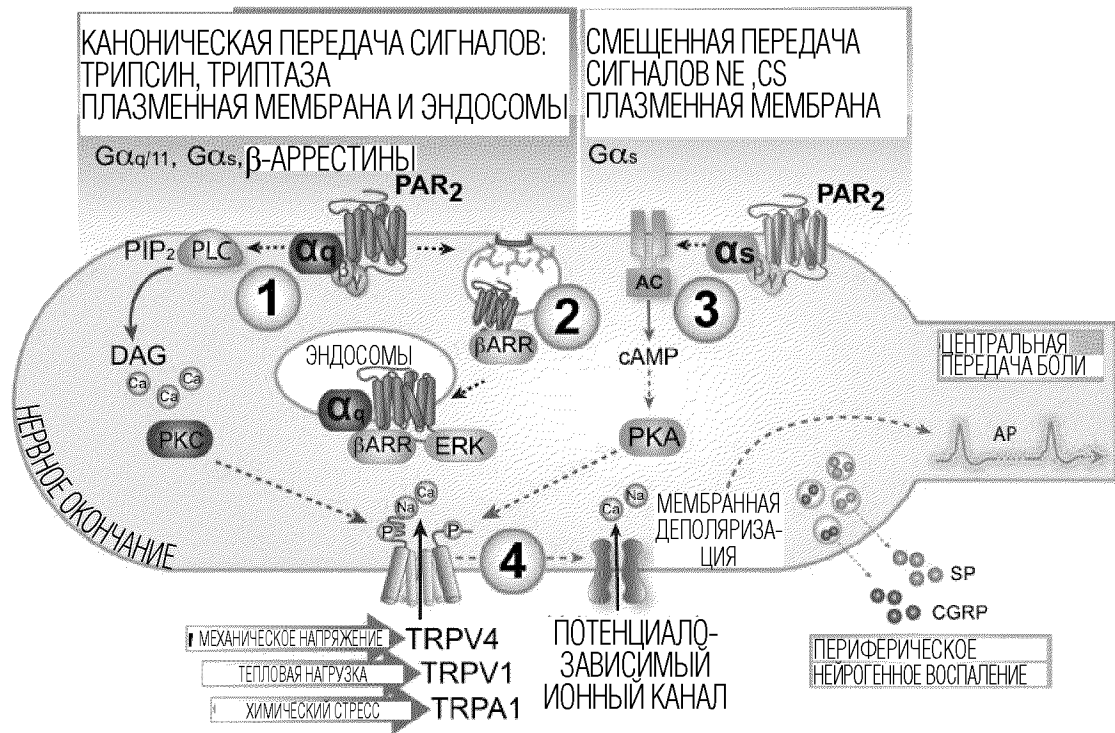
ФИГ. 8



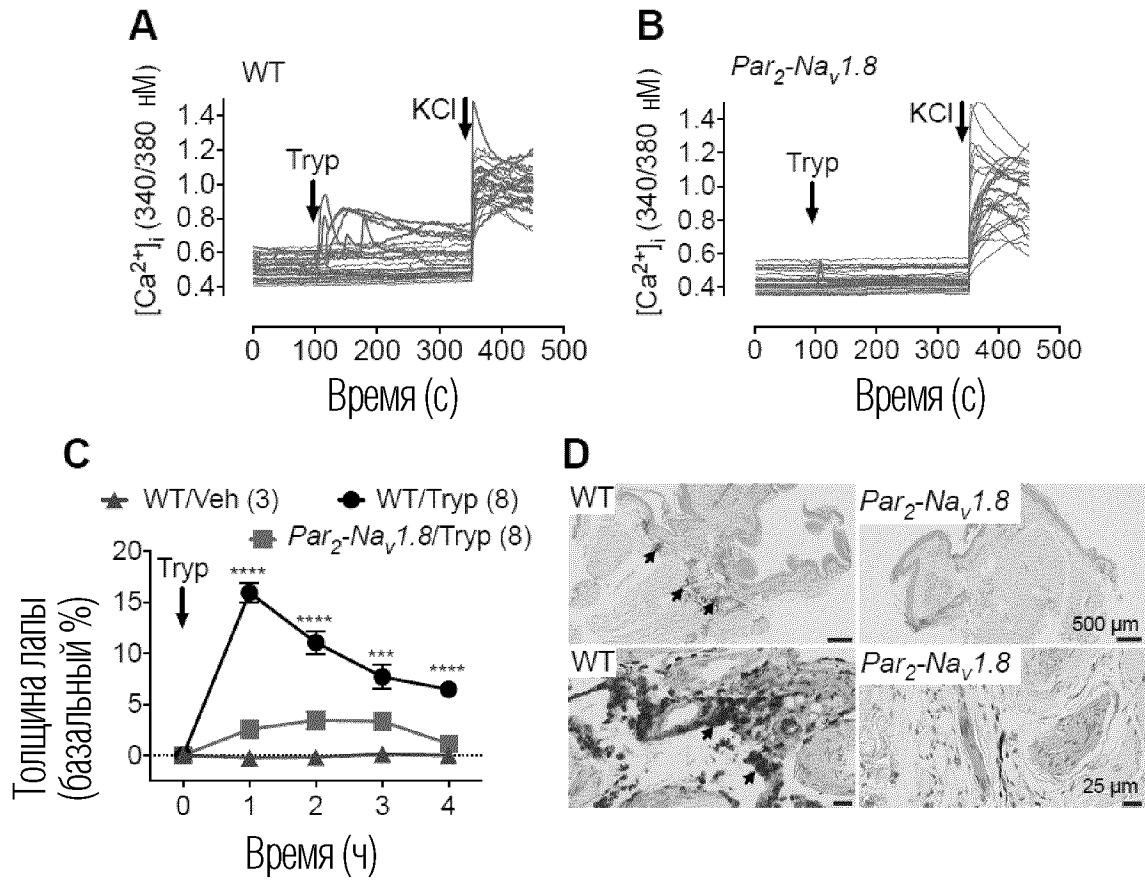
ФИГ. 9



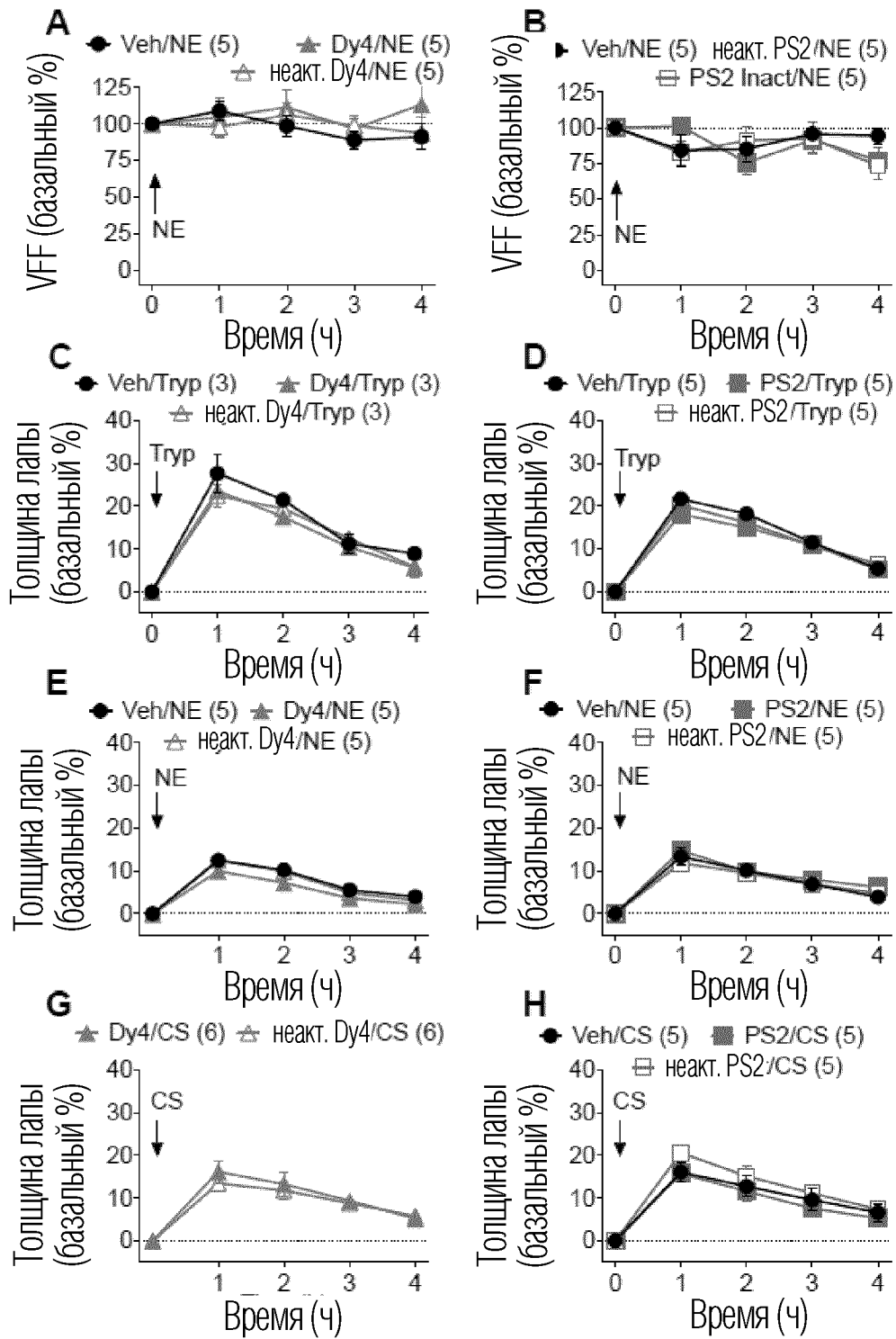
ФИГ. 10



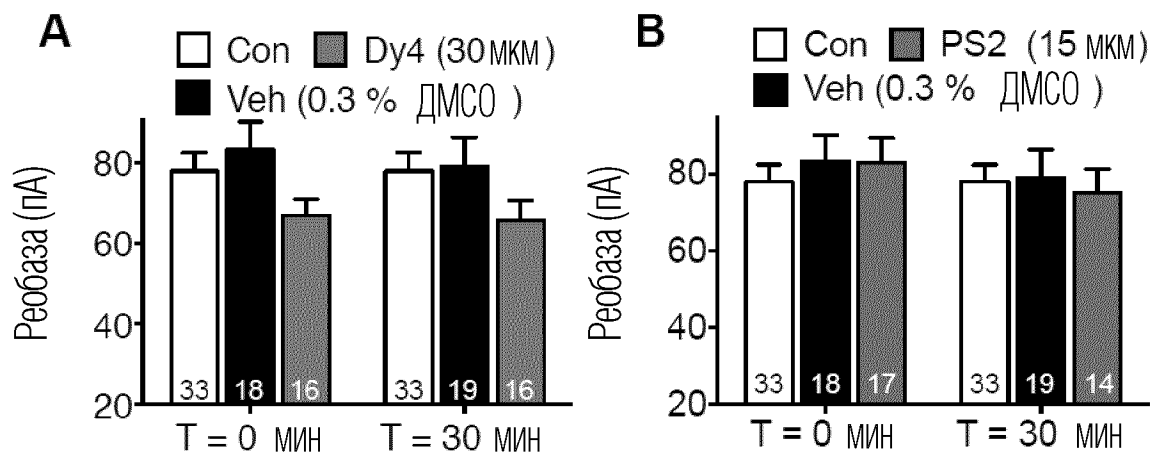
ФИГ. 11



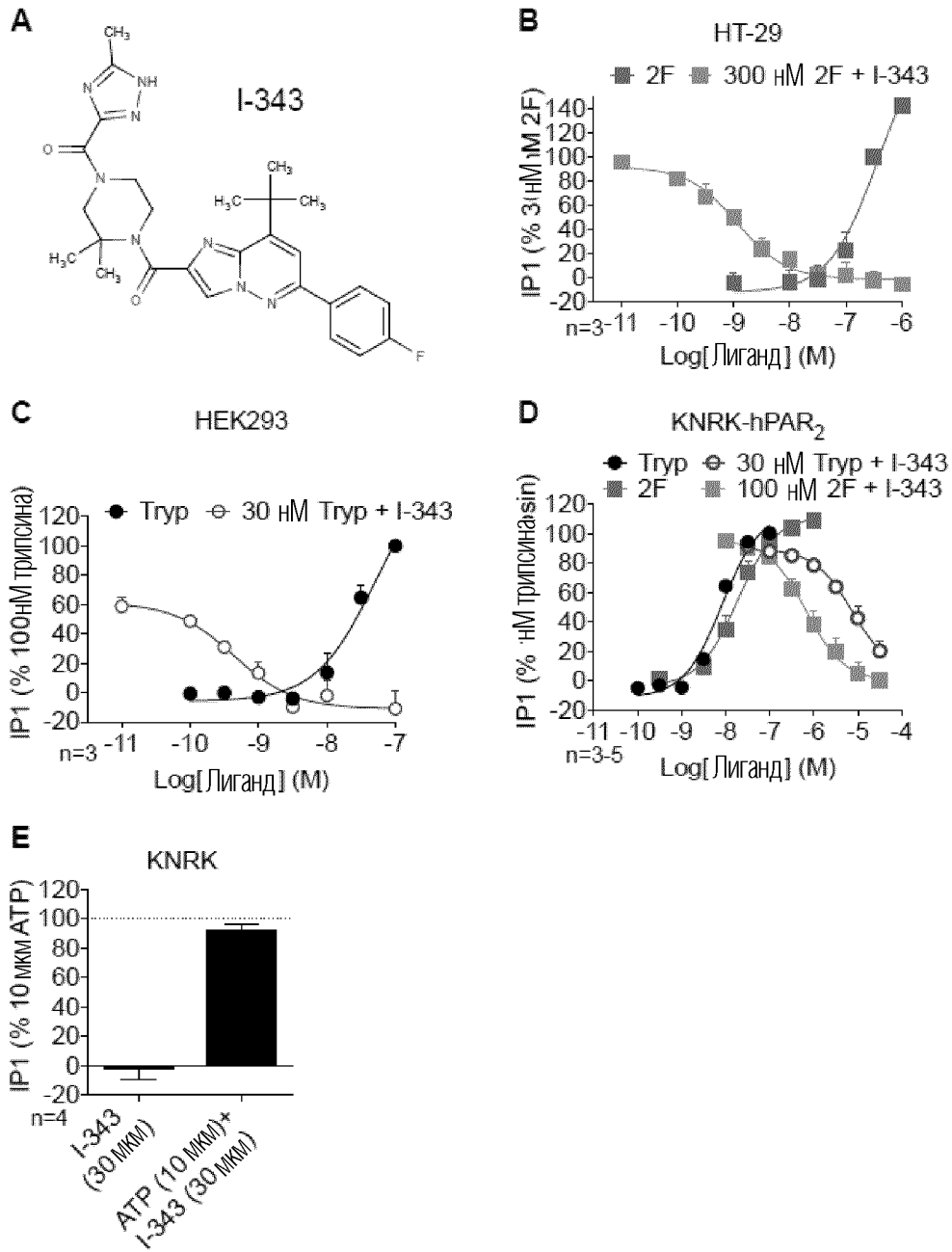
ФИГ. 12



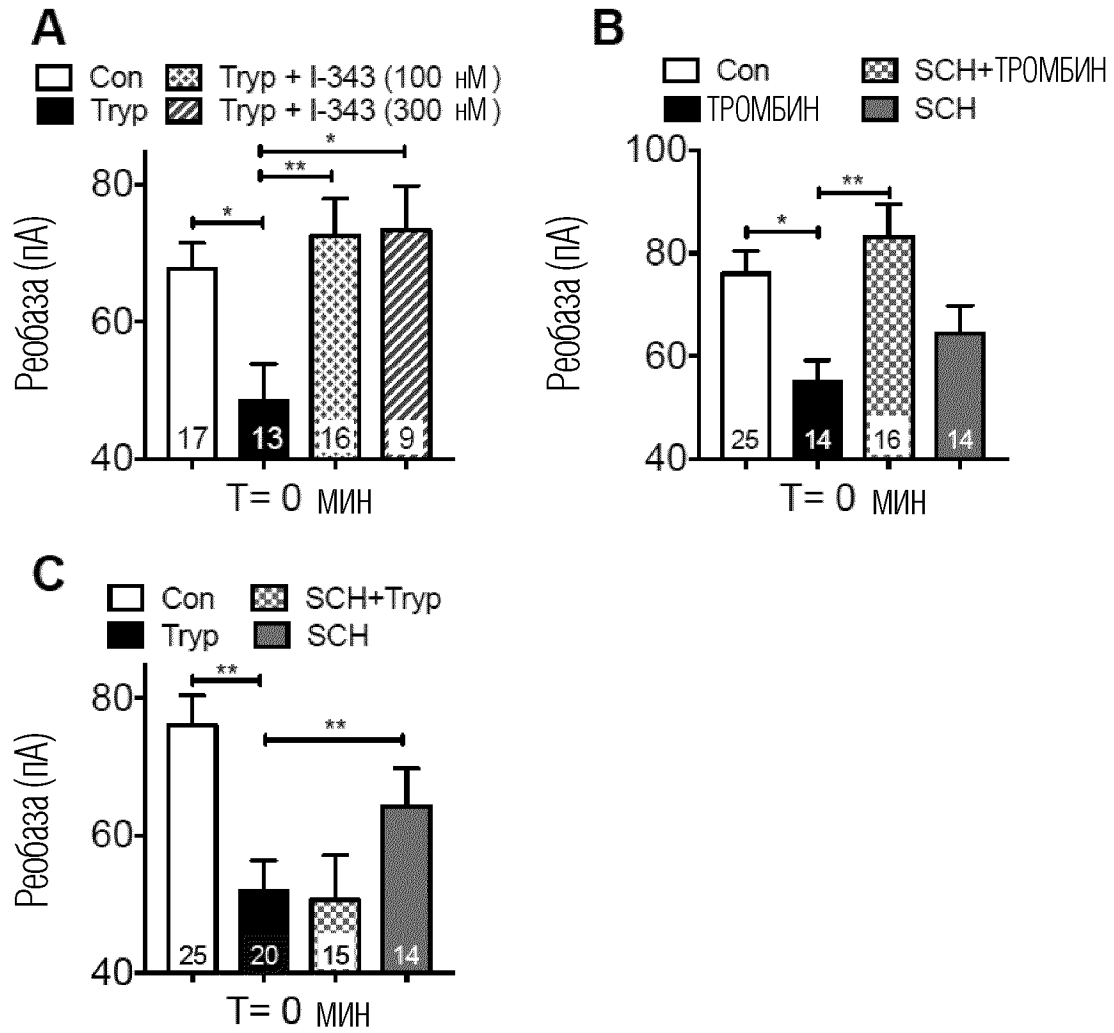
ФИГ. 13



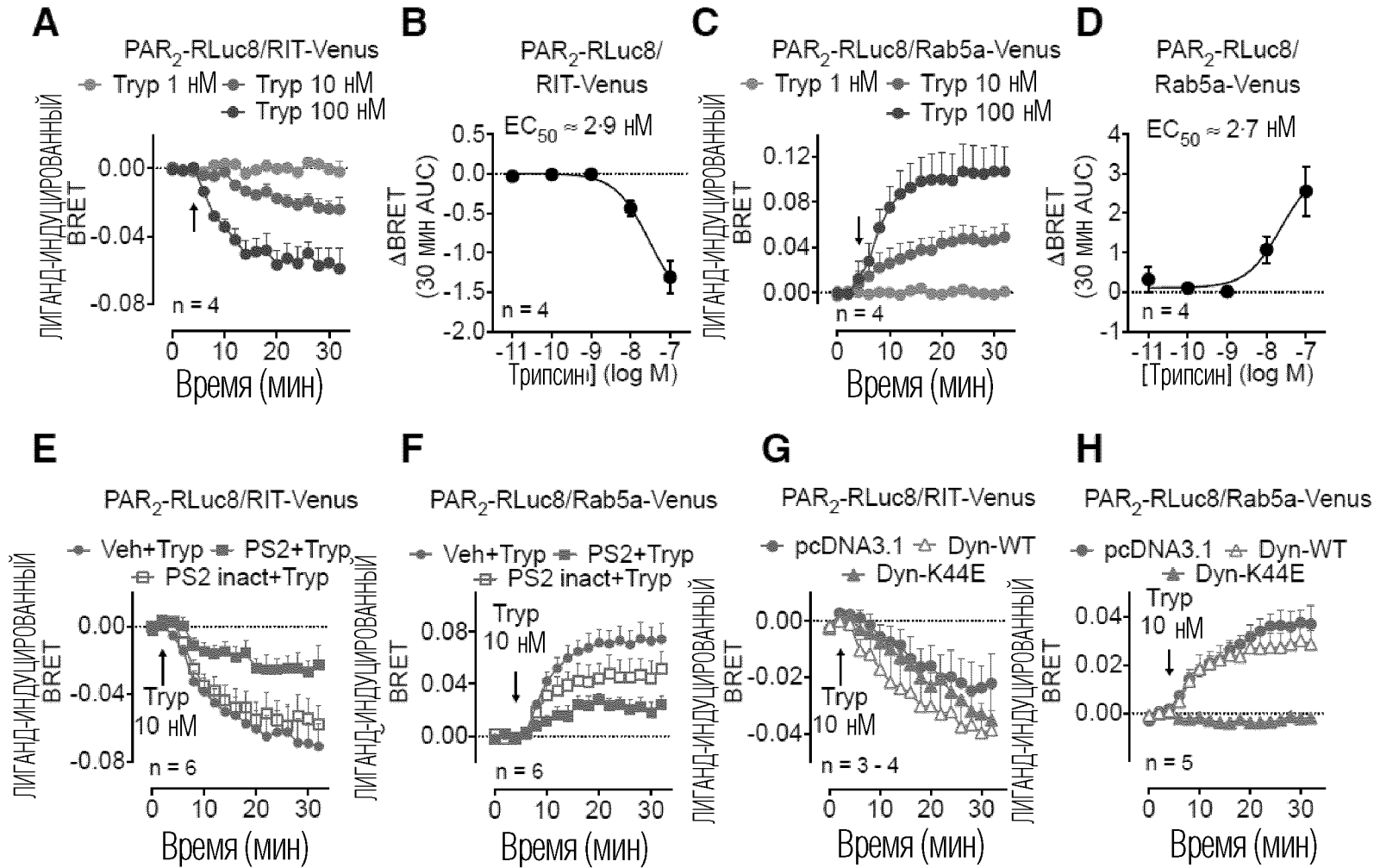
ФИГ. 14



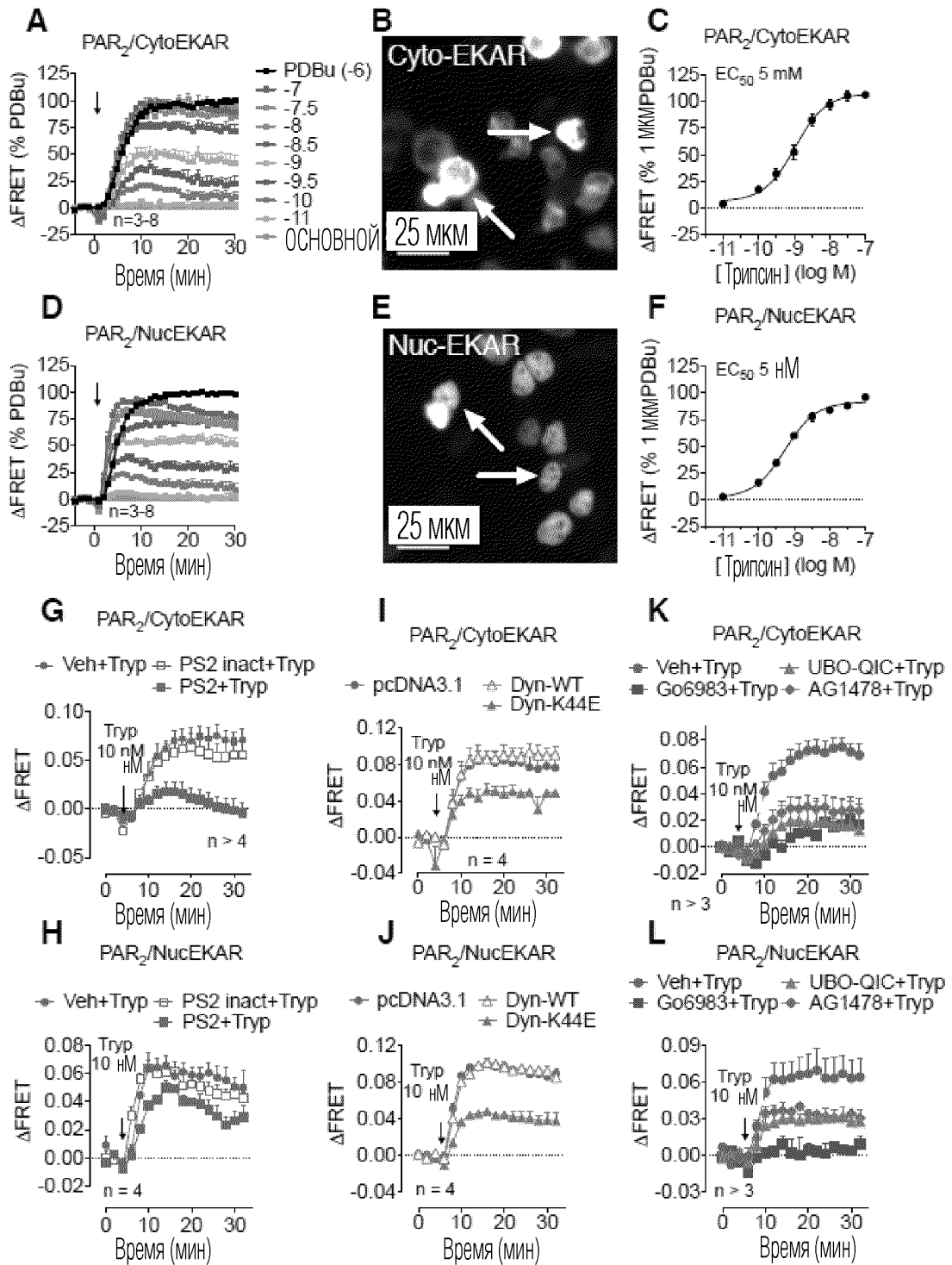
ФИГ. 15



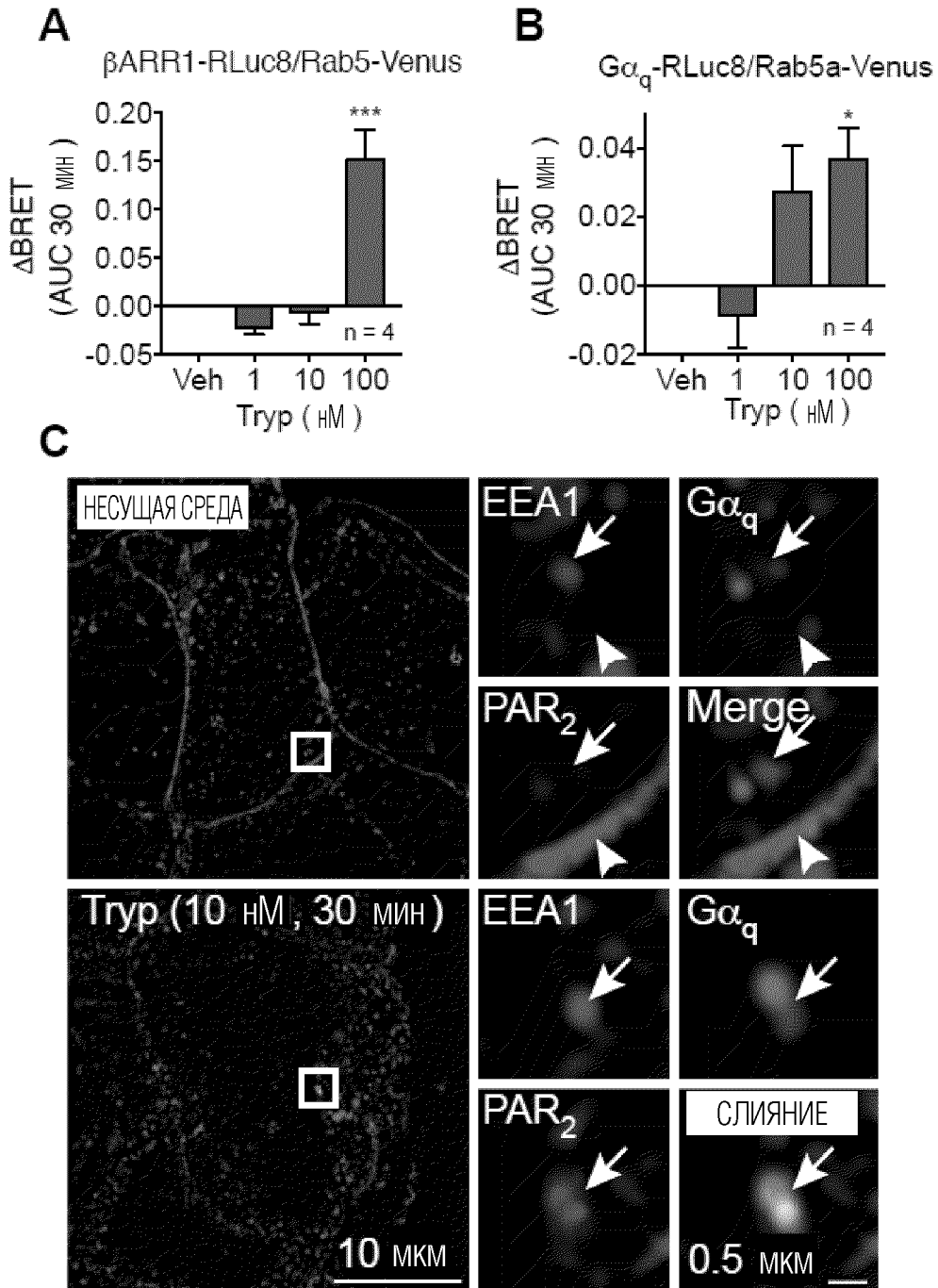
ФИГ. 16



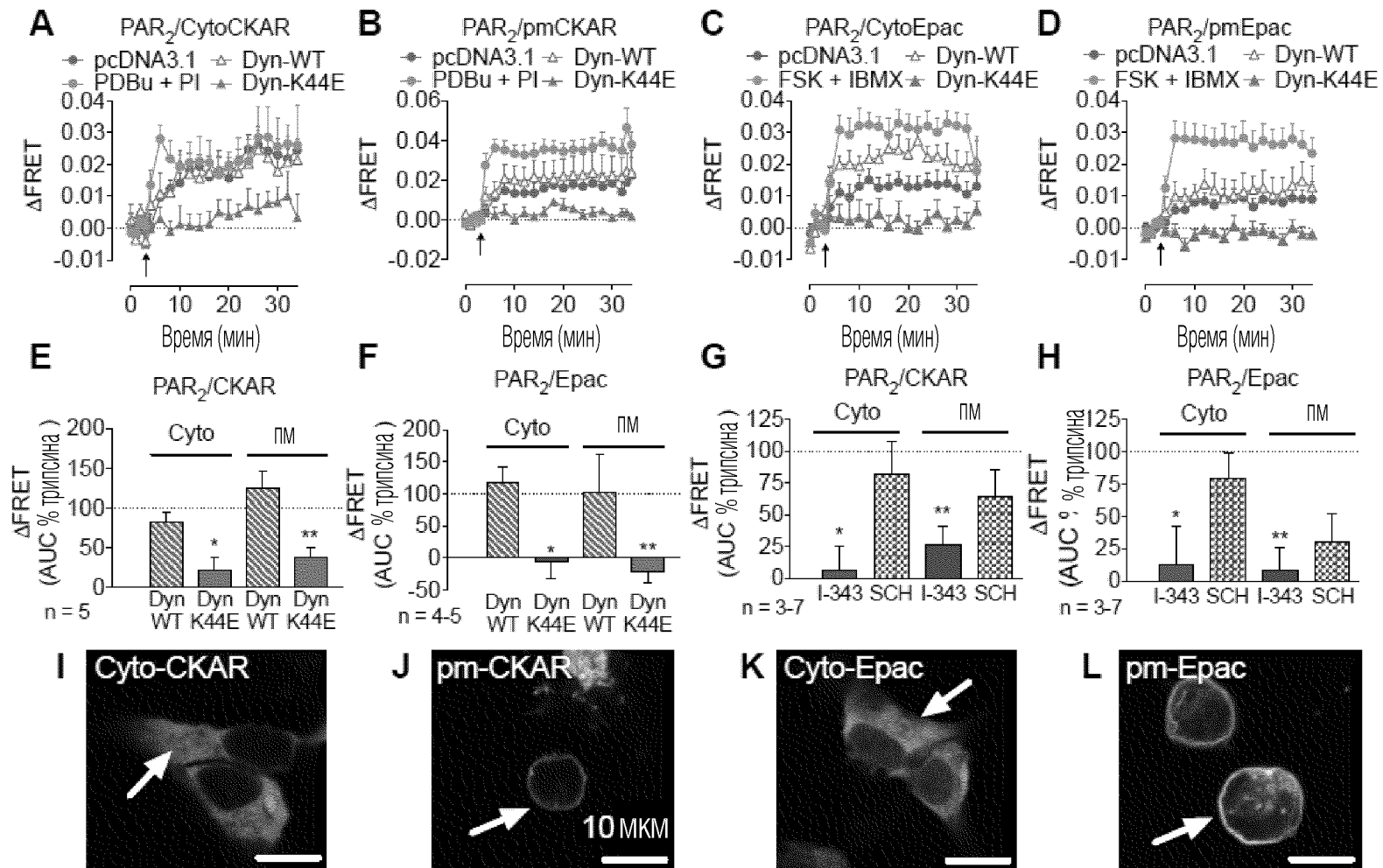
ФИГ. 17



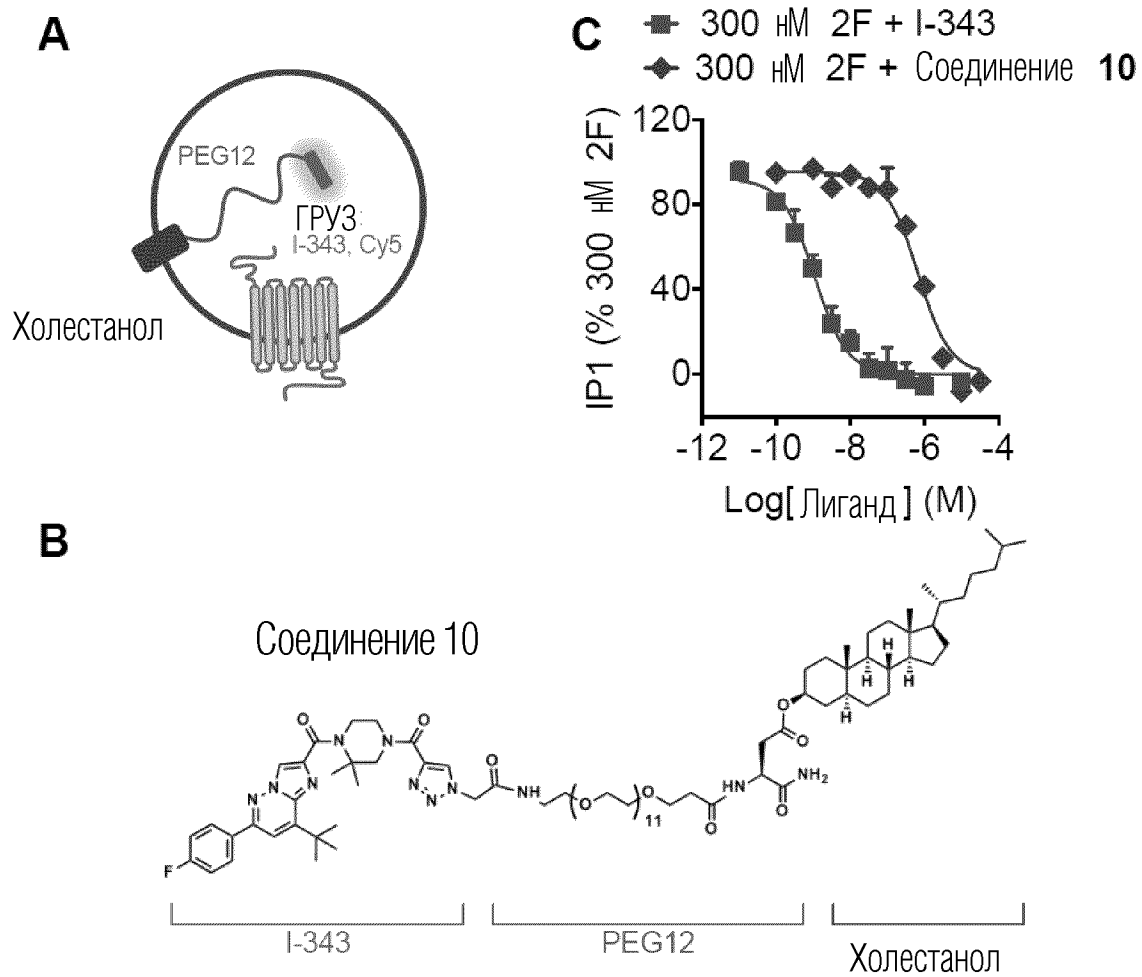
ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21

