

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038338**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.08.11**

**(21)** Номер заявки  
**201891895**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.02.23**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/08** (2006.01)  
**A61P 25/02** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

---

**(54) ИНГИБИТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ  $\beta$ -АРРЕСТИНА С РЕЦЕПТОРОМ  
НЕЙРОКИНИНА 1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛИ**

---

**(31)** 2016900635

**(32)** 2016.02.23

**(33)** AU

**(43)** 2019.02.28

**(86)** PCT/AU2017/050158

**(87)** WO 2017/143397 2017.08.31

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

**(72)** Изобретатель:  
**Баннет Найджел (AU)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** PAL, K et al.: "Divergent P-Arrestin-dependent Signaling Events Are Dependent upon Sequences within G-protein-coupled Receptor C Termini" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (2013), VOL. 288, NO. 5, PAGES 3265-3274

McCONALOGUE, K et al.: "Substance P-induced Trafficking of  $\beta$ -Arrestins. The role of  $\beta$ -arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1999), VOL. 274, NO. 23, PAGES 16257-16268

DeFEA, K A: "The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a  $\beta$ -arrestin-dependent scaffolding complex", PNAS (2000), VOL. 97, NO. 20, PAGES 11086-11091

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к соединениям и к их применению. В частности, к соединениям, которые ингибируют взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным C-концом активированного NK<sub>1</sub>R, и к их применению при лечении боли.

---

**B1**

**038338**

**038338  
B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям и их применению. В частности, изобретение относится к соединениям, которые ингибируют взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом активированного NK<sub>1</sub>R и к их применению для лечения боли.

### Уровень техники

Рецепторы G-белков (GPCR) являются наиболее крупным семейством поверхностно-клеточных рецепторов, участвуют в большинстве патофизиологических процессов и являются мишенью около 30% терапевтических препаратов (Audet, M. & Bouvier, M. *Nat Chem Biol* 2008, 4, 397-403). Находящиеся на поверхности клеток белки GPCR взаимодействуют с внеклеточными лигандами и связываются с гетеротримерными G-белками, которые запускают сигнальные каскады на плазматической мембране (синтез вторичных мессенджеров, трансактивацию рецептора фактора роста, регулирование ионных каналов). Удаление лиганда и связывание рецептора с  $\beta$ -аррестинами ( $\beta$ arr) терминирует сигнальные каскады на плазматической мембране.

До недавнего времени это было принято считать, что активация GPCR, следующие за ней сигнальные каскады и терминация сигнала происходят исключительно на плазматической мембране. Сигнальные каскады на плазматической мембране останавливаются через несколько минут после активации за счет фосфорилирования рецептора GPCR-киназами (GRK), которые являются избирательными в отношении активной лиганд-связанной конформации рецептора. GRK фосфорилируют С-концевые S/T-богатые домены GPCR (Sato, P. Y., et al., *Physiological reviews* 2015, 95, 377-404).

Фосфорилированные рецепторы затем связываются с  $\beta$ arr, который стерически предотвращает связывание между рецептором и G-белком, таким образом, прекращая агонист-опосредованную активацию G-белка.  $\beta$ -аррестины далее способствуют переносу лиганд-связанного рецептора с клеточной поверхности на ранние эндосомы посредством динамин- и клатрин-зависимого эндоцитоза. После эндоцитоза лиганд и фосфатные группы удаляются с GPCR и рецептор либо быстро возвращается на клеточную мембрану, либо переносится в лизосому для деградации.

Однако недавно было обнаружено, что множество GPCR не всегда следуют стандартной парадигме. Исследования показали, что после связывания лиганда и активации рецептора некоторые поверхностно-клеточные GPCR интернализуются и локализуются на ранних эндосомах, где сигнальный каскад от гетеротримерного G-белка сохраняется в течение длительного периода времени. Соответственно вместо того, чтобы просто действовать в качестве канала в трафике GPCR, возвращающихся на мембрану или деградирующих, эндосома может представлять собой жизненно важную точку сигнальной трансдукции (Murphy, J. E. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106, 17615-17622). Путем рекрутинга GPCR и митоген-активируемых протеинкиназ к эндосомам  $\beta$ -аррестины могут опосредовать эндосомные GPCR-сигнальные каскады (Murphy, J.E. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106, 17615-17622; DeFea, K. A. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 11086-11091; DeFea, K. A. et al. *J Cell Biol* 2000, 148, 1267-1281).

$\beta$ -аррестины рекрутируют различные сигнальные белки к активированным рецепторам на плазматической и эндосомальной мембранах и являются важными медиаторами сигнальных путей. MAPK-каскады (ERK, с-Jun-аминоконцевая киназа (JNK), p38) представляют собой наиболее хорошо охарактеризованные  $\beta$ arr-зависимые сигнальные пути. Первым доказательством того, что  $\beta$ -аррестины являются активными участниками сигнальных каскадов, было наблюдение, что доминантно негативные мутанты  $\beta$ arr ингибировали индуцированную  $\beta_2$ AR активацию ERK1/2 (Daaka Y, et al. *J Biol Chem* 1998, 273, 685-688). Впоследствии было найдено, что  $\beta$ arr связывают P<sub>2</sub>AR с с-Src и опосредуют активацию ERK1/2 (P<sub>2</sub>AR). Аналогично  $\beta$ arr участвуют в ERK1/2-сигнальных каскадах с другими GPCR, включая рецептор нейрокина-1 (NK<sub>1</sub>R), активируемый протеазами рецептор 2 (PAR<sub>2</sub>), рецептор ангиотензина II типа 1A (AT<sub>1A</sub>R) и рецептор вазопрессина V2 (V<sub>2</sub>R). Эти наблюдения привели к заключению, что  $\beta$ arr представляют собой каркасные белки, которые соединяют активированные GPCR с комплексами MAPK-сигнальных путей. Таким образом,  $\beta$ arr опосредуют вторую волну сигнальных каскадов GPCR, которая отличается от G-белок-зависимых сигнальных каскадов на плазматической мембране.

Рецептор вещества P (SP)/нейрокина-1 (NK<sub>1</sub>R) опосредует боль и воспаление (Steinhoff, M. S. et al. *Physiol Rev* 2014, 94, 265-301). Хотя доклинические исследования с антагонистами NK<sub>1</sub>R-сигнала на плазматической мембране подтверждали его участие в неврологических и воспалительных заболеваниях, эти антагонисты являются неэффективными для лечения хронических заболеваний. NK<sub>1</sub>R быстро и полностью перераспределяется в эндосомы в участках болевого сигнала в спинном мозге (Marvizon, J. C. et al. *J Neurosci* 1997, 17, 8129-8136) и воспаления в сосудистой сети (Bowden, J. J. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 8964-8968), и полагают, что он интернализуется у пациентов с хронической болью и воспалением (Jarcho, J. M. et al. *Pain*, 2013).

Было обнаружено, что эндосомный сигнальный путь NK<sub>1</sub>R генерирует внутриклеточные сигналы, которые лежат в основе нейрональной активации и гипералгезии. Болевые и провоспалительные стимулы, включая агонист ванилоидного рецептора 1 (TRPV1, transient receptor potential vanilloid) капсаицин, стимулируют высвобождение SP из первичных сенсорных ноцицепторов в пластинках I, II дорсального рога, где SP стимулирует эндоцитоз NK<sub>1</sub>R в нейронах спинного мозга. Было обнаружено, что ингибито-

ры динамина и клатрина при интратекальном введении ингибируют эндоцитоз NK<sub>1</sub>R у крыс и мышей, а также подавляет ноцицепцию.

Соответственно ингибирование эндоцитоза активированного NK<sub>1</sub>R в ранние эндосомы может предпочтительно обеспечить новый способ лечения боли.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на открытии, что ингибирование взаимодействия между β-аррестином и внутриклеточным С-концом активированного NK<sub>1</sub>R и последующего эндоцитоза рецептора может обеспечить новый способ лечения и профилактику заболеваний и расстройств, опосредованных NK<sub>1</sub>R.

Соответственно в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества Р (SP) или рецептора нейрокина 1 (NK<sub>1</sub>R), включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения, которое ингибирует взаимодействие между β-аррестином и внутриклеточным С-концом активированного NK<sub>1</sub>R.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, которое ингибирует взаимодействие между β-аррестином и внутриклеточным С-концом активированного NK<sub>1</sub>R, в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества Р (SP) или рецептора нейрокина 1 (NK<sub>1</sub>R).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, которое ингибирует взаимодействие между β-аррестином и внутриклеточным С-концом активированного NK<sub>1</sub>R, для применения при лечении заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества Р (SP) или рецептора нейрокина 1 (NK<sub>1</sub>R).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору β-аррестина, имеющему формулу



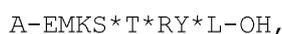
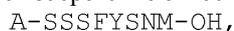
где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора β-аррестина через клеточную мембрану, и

D представляет собой фрагмент из одного или нескольких сайтов фосфорилирования на внутриклеточном С-конце NK<sub>1</sub>R, или

к его фармацевтически приемлемым солям.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору β-аррестина, выбранному из



где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора β-аррестина через клеточную мембрану, и

\* указывает на то, что аминокислота является фосфорилированной; или

к его фармацевтически приемлемым солям.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования эндоцитоза NK<sub>1</sub>R, включающему контакт клетки с ингибитором β-аррестина, предложенным в данном документе.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества Р (SP) или рецептора нейрокина 1 (NK<sub>1</sub>R), включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ингибитора β-аррестина, предложенного в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора β-аррестина, предложенного в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным SP- или NK<sub>1</sub>R-сигнальным путем.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору β-аррестина, предложенному в данном документе, для применения в лечении заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным SP- или NK<sub>1</sub>R-сигнальным путем.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут более очевидными специалистам в данной области после прочтения нижеследующего подробного описания вместе с прилагаемыми примерами и формулой изобретения.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: графическое представление эффектов βагг-киРНК на ноцицепцию. Эффекты интратекального введения (i.t.) β агг-киРНК. (а) Экспрессия βагг, (b, c) Ноцицепция у мышей. Реакция отдергивания по фон Фрею у мышей, которым вводили капсаицин (b) или не вводили капсаицин (c). \*P<0,05, \*\*P<0,01,

\*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  относительно контроля. (n) Число мышей.

Фиг. 2: графическое представление нарушения взаимодействия  $NK_1R/\beta arr$ . С-конец мышиногo  $NK_1R$ ; показаны усеченный вариант  $NK_1R\delta 312$  и Tat-конъюгированные  $NK_1R$ -пептиды и контрольный пептид. (b) Твердофазный ИФА (ELISA) на клеточной поверхности:  $NK_1R$  дикого типа (WT), неинтернализующийся усеченный вариант  $NK_1R\delta 312$ . (b-f) SP-индуцированный BRET: WT  $NK_1R$ -RLuc8/ или  $NK_1R\delta 312$ -RLuc8/ $\beta arr1$ -YFP,  $\beta arr2$ -YFP, KRas-Venus или Rab5a-Venus. (g) SP-индуцированный FRET. \*  $P < 0,05$ . Наблюдения проводились в трипликатах,  $n > 3$  экспериментов,  $n = 49-99$  клеток. (h, i) Эффекты контрольного и трех  $NK_1R$ -пептидов на SP-индуцированный  $NK_1R$ -RLuc8/ $\beta arr2$ -YFP BRET и эндоцитоз  $NK_1R$ . \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  относительно контроля.

Фиг. 3: графическое представление эффектов  $NK_1R$ -пептидов на ноцицепцию. (a-c) Эффекты интратекального (i.t.) введения  $NK_1R$ -пептидов на ноцицептивные реакции на капсаицин (a), формалин (b) или полный адьювант Фрейнда (CFA) (c).

### Подробное описание изобретения

При изучении рецептора вещества P (SP)/нейрокинина 1 ( $NK_1R$ ) в качестве прототипа GPCR, который быстро транслоцируется в эндосомы после активации, было показано, что эндосомный  $NK_1R$  передает постоянные сигналы, лежащие в основе возбуждения и ноцицептивной передачи в нейронах спинного мозга. Концепция, согласно которой эндосомы являются платформами для компартиментализированных сигнальных каскадов GPCR, лежащих в основе патофизиологически важных процессов, объясняет специфичность рецепторных сигнальных каскадов и позволяет найти мишени для направленного терапевтического воздействия. Эндосомальный трафик позволяет GPCR генерировать сигнал в субклеточных компартаментах, что может объяснить, каким образом различные рецепторы, которые активируют одни и те же G-белки и  $\beta$ -аррестины, могут специфически регулировать ответы. Ингибирование эндоцитоза  $NK_1R$  может позволить направленное воздействие на сигнальные пути, лежащие в основе болезнетворных процессов, с повышенной эффективностью и селективностью.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества P (SP) или рецептора нейрокинина 1 ( $NK_1R$ ), включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ .

Используемый в данном описании термин "ингибитор  $\beta$ -аррестина" обозначает соединение, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ .

Очевидно, что соединение, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестинами и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ , может действовать на любом участке или на нескольких участках пути между фосфорилированием внутриклеточного С-конца активированного  $NK_1R$  и последующим связыванием с  $\beta$ -аррестинами. Предусматривается, что в одном варианте осуществления ингибирование взаимодействия между  $\beta$ -аррестинами и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$  может быть достигнуто путем введения субъекту ингибитора  $\beta$ -аррестина, который конкурирует с сайтами фосфорилирования на внутриклеточном С-конце активированного  $NK_1R$ , предоставляя альтернативный сайт фосфорилирования для GPCR-киназы-2 (GRK2), тем самым уменьшая или ослабляя связывание  $\beta$ -аррестина с внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$  и последующий эндоцитоз рецептора.

В другом варианте осуществления предполагается, что ингибирование взаимодействия между  $\beta$ -аррестинами и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$  может быть достигнуто путем введения субъекту ингибитора  $\beta$ -аррестина, который ингибирует фосфорилирование GPCR-киназой-2 (GRK2) внутриклеточного С-конца активированного  $NK_1R$ . В одном варианте осуществления предполагается, что ингибитор  $\beta$ -аррестина, который ингибирует фосфорилирование GPCR-киназой-2 (GRK2) внутриклеточного С-конца активированного  $NK_1R$ , взаимодействует непосредственно с GRK2, например, путем связывания с центральным каталитическим доменом GRK2, ответственным за фосфорилирование рецептора. В другом варианте осуществления предполагается, что ингибитор  $\beta$ -аррестина может аллостерически связываться с GRK2, например, чтобы предотвратить распознавание сайтов фосфорилирования на внутриклеточном С-конце активированного  $NK_1R$ . В еще одном варианте осуществления предполагается, что ингибитор  $\beta$ -аррестина будет связываться с сайтами фосфорилирования или вблизи сайтов фосфорилирования на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ , тем самым предотвращая распознавание и фосфорилирование их киназой GRK2. Кроме того, предполагается, что соединение, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестинами и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ , может действовать путем прямого взаимодействия с  $\beta$ -аррестином, ингибируя его связывание с фосфорилированными участками на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ .

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ , в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества P (SP) или рецептора нейрокинина 1 ( $NK_1R$ ).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом активированного  $NK_1R$ , для применения при лечении заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным путем вещества Р (SP) или рецептора нейрокина 1 ( $NK_1R$ ).

В предпочтительном варианте осуществления соединение, которое ингибирует взаимодействие между  $\beta$ -аррестином и внутриклеточным С-концом  $NK_1R$ , конкурирует с сайтами фосфорилирования на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ .

В одном варианте осуществления ингибитор  $\beta$ -аррестина, который конкурирует с сайтами фосфорилирования на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ , представляет собой соединение, имеющее формулу:



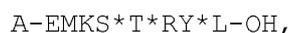
где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора  $\beta$ -аррестина через клеточную мембрану, и

D представляет собой фрагмент из одного или нескольких сайтов фосфорилирования на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ ; или

его фармацевтически приемлемые соли.

В другом варианте ингибитор  $\beta$ -аррестина, который конкурирует с сайтами фосфорилирования на внутриклеточном С-конце  $NK_1R$ , выбирают из



где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора  $\beta$ -аррестина через клеточную мембрану, и

\* указывает на то, что аминокислотный остаток является фосфорилированным; или их фармацевтически приемлемых солей.

В одном варианте осуществления изобретения A представляет собой жирную кислоту или представляет собой последовательность YGRKKRRQRRR проникающего через мембрану Tat-пептида.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения A представляет собой последовательность YGRKKRRQRRR проникающего через мембрану Tat-пептида. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения A представляет собой пальмитиновую кислоту.

Как указано выше, соединения по настоящему изобретению могут содержать один или несколько аминокислотных остатков, имеющих функциональные группы боковых цепей, включая, но не ограничиваясь ими, аминокислоты, выбранные из серина, тирозина и треонина. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что функциональная группа боковой цепи аминокислоты будет модифицирована. В одном варианте осуществления функциональные группы боковой цепи могут быть фосфорилированы. В других вариантах осуществления изобретения предусматривается, что боковая цепь аминокислоты будет модифицирована с образованием неприродной аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают в себя любое соединение с амино- и карбоксильной функциональными группами. Следует понимать, что неприродные аминокислоты образуют часть пептидной цепи путем присоединения через их амино- и карбоксильные группы.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным SP- или  $NK_1R$ -сигнальным путем, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ингибитора  $\beta$ -аррестина, предложенного в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора  $\beta$ -аррестина, предложенного в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным SP-или  $NK_1R$ -сигнальным путем.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору  $\beta$ -аррестина, предложенному в данном документе, для применения в лечении заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным SP- или  $NK_1R$ -сигнальным путем.

Модуляция SP-опосредованной активации  $NK_1R$  связана с лечением и профилактикой широкого спектра заболеваний, включая депрессии и аффективные расстройства, тревожные расстройства, связанные с наркоманией расстройства, связанные с алкоголизмом расстройства, расстройства сна, расстройства пищевого поведения, расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания/гиперактивности, расстройства личности и раковые заболевания. Модуляторы  $NK_1R$  также могут быть полезны для лечения и профилактики воспаления, аллергических заболеваний, неврологических расстройств, рвоты, боли и раковых заболеваний.

В предпочтительном варианте заболевание или расстройство, опосредованное эндосомальным  $NK_1R$ -сигнальным путем, выбирают из вызванной химиотерапией тошноты и рвоты (CINV), послеоперационной тошноты и рвоты, аффективных и аддиктивных расстройств, включая депрессии и тревоги, желудочно-кишечных расстройств, включая воспалительные заболевания кишечника и синдром раздраженного кишечника, респираторных заболеваний, включая ХОБЛ и астму, заболеваний мочеполовой системы, сенсорных расстройств и боли, включая соматическую боль и висцеральную боль, зуда, вирусных и бактериальных инфекций, а также пролиферативных заболеваний (раковых заболеваний).

В контексте настоящего изобретения термин "боль" включает хроническую воспалительную боль (например, боль, связанную с ревматоидным артритом, остеоартритом, ревматоидным спондилитом, подагрическим артритом и ювенильным артритом), скелетно-мышечную боль, боль в нижней части спины и шеи, боль при растяжении и вывихе, невропатическую боль, симпатическую боль, миозит, связанную с раком и фибромиалгией боль, связанную с мигренью боль, кластерную и хроническую ежедневную головную боль, боль, связанную с гриппом или другими вирусными инфекциями, такими как ОРВИ, ревматическая лихорадка, боль, связанную с функциональными расстройствами кишечника, такими как незвонная диспепсия, несердечная боль в груди и синдром раздраженного кишечника, боль, связанную с ишемией миокарда, послеоперационную боль, головную боль, зубную боль, дисменорею, невралгию, синдром фибромиалгии, комплексный региональный болевой синдром (типы КРБС I и II), невропатические болевые синдромы (включая диабетическую невропатию, вызванную химиотерапией невропатическую боль, ишиас, неспецифическую боль в пояснице, боль при рассеянном склерозе, связанную с ВИЧ невропатию, постгерпетическую невралгию, невралгию тройничного нерва) и боль в результате физической травмы, ампутации, рака, воздействия токсинов или хронического воспаления. В предпочтительном варианте осуществления изобретения боль представляет собой соматическую боль или висцеральную боль.

Известные методы синтеза на твердой фазе или в растворе могут быть использованы при синтезе соединений по настоящему изобретению, например, при присоединении N- или C-конца к твердой подложке (как правило, смоле) с последующим ступенчатым синтезом линейного пептида. Защитные группы для защиты аминокислотных остатков, включая боковые цепи, хорошо известны в данной области и могут быть найдены, например, в издании: Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Third Edition, John Wiley & Sons, Inc, 1999), полное содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут существовать в одной или нескольких стереоизомерных формах (например, в виде диастереомеров). Настоящее изобретение включает в себя все эти стереоизомерные формы либо выделенные (с помощью, например, энантиомерного выделения), либо комбинированные (включая рацемические смеси и диастереомерные смеси). Настоящее изобретение относится к применению аминокислот в обеих L- и D-формах, включая использование аминокислот, независимо выбранных из L- и D-формы, например, если пептид содержит два остатка серина, то каждый сериновый остаток может иметь одинаковую или противоположную абсолютную стереохимическую конфигурацию. Если не указано иное, то аминокислота имеет L-конфигурацию.

Таким образом, изобретение также относится к соединениям, по существу, в чистой стереоизомерной форме в отношении асимметричных центров аминокислотных остатков, например, выше примерно 90% (de, диастереомерный избыток), например от примерно 95 до 97% de, или выше 99% de, а также к смесям, включая их рацемические смеси. Такие диастереомеры могут быть получены с помощью асимметрического синтеза, например с использованием хиральных промежуточных продуктов, или же смеси могут быть разделены стандартными способами, например с помощью хроматографии или с использованием разделяющего агента.

Если соединения по настоящему изобретению требуют очистки, то могут быть использованы хроматографические методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. Пептиды могут быть охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии и/или других подходящих способов.

Если соединение содержит одну или несколько функциональных групп, которые могут протонироваться или депротонироваться (например, при физиологическом pH), то соединение может быть получено и/или выделено в виде фармацевтически приемлемой соли. Следует понимать, что соединение может быть цвиттерионным при заданном значении pH. Используемый в данном описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли данного соединения, где соль пригодна для введения в качестве фармацевтического препарата. Такие соли могут быть получены, например, путем реакции кислоты или основания с амином или карбоксильной группой соответственно.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть получены из неорганических и органических кислот. Примеры неорганических кислот включают соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. 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, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, p-толуолсульфоновую кисло-

ту, салициловую кислоту и т.п.

Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли 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, включая изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диметиламиноэтанол, трометамин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, N-алкилглюкамины, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин и N-этилпиперидин.

Кислотные/основно-аддитивные соли, как правило, являются более растворимыми в водных растворителях, чем соответствующие свободные кислоты/основные формы.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения, описанного выше, или его фармацевтически приемлемой соли вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

Термин "композиция" включает композицию действующего ингредиента с инкапсулирующим материалом в качестве носителя, что дает в результате капсулу, в которой действующий ингредиент (с или без другого носителя) окружен носителями.

Хотя соединения, описанные выше, или их фармацевтически приемлемые соли, могут быть единственным действующим ингредиентом, вводимым субъекту, введение другого действующего ингредиента (действующих ингредиентов) с указанным соединением входит в объем настоящего изобретения. В одном или нескольких вариантах осуществления изобретения предусматривается, что субъекту будет вводиться комбинация двух или нескольких соединений по настоящему изобретению. Предусматривается, что соединение или соединения также могут вводиться с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами в комбинации. Комбинация может позволять раздельное, последовательное или одновременное введение соединения (соединений), описанных выше, с другим действующим ингредиентом (действующими ингредиентами). Комбинация может быть представлена в виде фармацевтической композиции.

Термин "комбинация", используемый в настоящем описании, относится к композиции или набору компонентов, где компоненты комбинации, описанные выше, могут вводиться независимо или независимо друг от друга или с использованием различных фиксированных комбинаций с различными количествами компонентов комбинации, т.е. одновременно или в разные моменты времени. Поэтому, компоненты комбинации могут, например, вводиться одновременно или разнесенные во времени, т.е. в различные моменты времени и с одинаковыми или различными интервалами времени для любой части из набора компонентов. Соотношение общих количеств компонентов комбинации, которые будут вводиться в комбинации, можно варьировать, например, для того, чтобы соответствовать потребностям части пациентов, подлежащих лечению, или потребностям индивидуального пациента, чьи отличающиеся потребности могут быть обусловлены возрастом, полом, массой тела и т.д.

Как будет очевидно специалистам в данной области техники, способ введения и характер фармацевтически приемлемого носителя будут зависеть от природы заболевания и млекопитающего, подлежащего лечению. Считается, что выбор конкретного носителя или системы доставки, а также способа введения может быть легко осуществлен специалистом в данной области. При изготовлении любого препарата, содержащего действующее соединение, должны быть приняты надлежащие меры, чтобы гарантировать, что активность соединения не пострадает в процессе и что соединение способно достичь своего места действия, не деградируя. В некоторых обстоятельствах может быть необходимо защитить соединение способами, известными в данной области техники, такими как, например, микроинкапсуляция. Аналогично выбранный способ введения должен быть таким, чтобы соединение могло достигнуть своего места действия.

Специалисты в данной области техники могут легко определить соответствующие составы для соединений по настоящему изобретению с использованием традиционных подходов. Идентификация предпочтительных диапазонов pH и подходящих вспомогательных веществ, например антиоксидантов, является обычной практикой в данной области техники. Для обеспечения значения pH в требуемом диапазоне обычно используются буферные системы, и включают буферы из карбоновых кислот, например ацетатный, цитратный, лактатный и сукцинатный. Для таких композиций доступны различные антиоксиданты, включая фенольные соединения, такие как ВНТ или витамин Е, восстанавливающие агенты, такие как метионин или сульфит, и хелаторы металлов, такие как ЭДТ.

Соединения, описанные выше, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть получены в парентеральных лекарственных формах, включая те, которые подходят для внутривенной, интратекальной и внутримозговой или эпидуральной доставки. Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные инъекционные растворы или дисперсии, а также стерильные порошки для приготовления стерильных растворов для инъекций. Они должны быть стабильными в условиях производства и хранения и могут иметь защиту от восстановления или окисления и загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии или грибы.

Растворитель или дисперсионная среда для инъекционного раствора или дисперсии могут содержать любую из традиционных систем растворителей или носителей для действующего соединения, и могут содержать, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие их смеси, а также растительные масла. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть осуществлено при необходимости путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать агенты для регулирования осмолярности, например сахара или хлорид натрия.

Предпочтительно, чтобы композиция для инъекций была изотонической относительно крови. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть осуществлено за счет использования в композициях агентов, задерживающих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина. Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, могут быть доставлены любым приемлемым способом, включая внутривенные, внутримышечные, внутримозговые, интратекальные, эпидуральные инъекции или инфузии.

Стерильные инъекционные растворы изготавливают путем включения соединений по настоящему изобретению в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, такими как те, которые перечислены выше, при необходимости с последующими стерилизацией и фильтрованием. Как правило, дисперсии получают включением различных стерильных действующих ингредиентов в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами изготовления являются вакуумная сушка или сублимационная сушка предварительно стерилизованного фильтрацией раствора действующего ингредиента плюс любые дополнительные желаемые ингредиенты.

Другие лекарственные формы включают пероральные и энтеральные составы по настоящему изобретению, где действующее соединение может быть объединено с инертным разбавителем или с усваиваемым съедобным носителем, или оно может быть заключено в твердую или мягкую желатиновую капсулу, или оно может быть спрессовано в таблетки, или оно может быть включено напрямую в принимаемую пищу. Для перорального терапевтического введения действующее соединение может быть включено с вспомогательными веществами и использовано в форме таблеток для приема внутрь, защечных или подъязычных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, пластинок и т.п. Количество действующего соединения в таких терапевтически применимых композициях является таким, чтобы можно было получить подходящую дозировку.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и аналогичные формы могут также содержать компоненты, которые перечислены ниже: связующее вещество, такое как смола, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как дикальцийфосфат; способствующий распадемости агент, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и т.п.; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; а также могут быть добавлены подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или вкусо-ароматический агент, такой как мята перечная, масло грушанки или вишневый ароматизатор. Когда лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, в дополнение к материалам указанного выше типа, жидкий носитель. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве покрытий или чтобы иным образом модифицировать физическую форму лекарственной формы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или ими обоими. Сироп или эликсир могут содержать действующее соединение, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, например вишневый или апельсиновый ароматизатор. Конечно, любой материал, используемый для приготовления любой стандартной лекарственной формы, должен быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в используемых количествах. Кроме того, соединения по настоящему изобретению могут быть включены в препараты и составы с замедленным высвобождением, включая те, которые позволяют направленную доставку действующего пептида в конкретные области кишечника.

Жидкие составы также могут быть введены энтерально через желудок или пищеводную трубку. Энтеральные препараты могут быть приготовлены в виде суппозиториев путем смешивания с соответствующими основами, такими как эмульсионные основы или водорастворимые основы. Также соединения по настоящему изобретению можно, но не обязательно, вводить местно, интраназально, интравагинально, внутриглазным способом и т.п.

Фармацевтически приемлемые носители и/или разбавители включают любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда обычная среда или агент несовместимы с действующим ингредиентом, рассмотрено их применение в терапевтических композициях. Также в композицию могут быть включены дополнительные действующие ингредиенты.

Особенно предпочтительным является представление композиции в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозы. Стандартная лекарственная форма в контексте настоящего изобретения относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов-млекопитающих, подлежащих лечению; причем каждая единичная доза содержит заданное количество действующего вещества, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтически приемлемым носителем. Спецификация для новых стандартных лекарственных форм по изобретению продиктована и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик действующего вещества и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и от (b) ограничений, свойственных методам изготовления препаратов из действующих веществ для лечения болезней у живых существ, имеющих патологии, нарушающие нормальную жизнедеятельность, подробно описанные в данном документе.

Как упоминалось выше, основной действующий ингредиент может быть смешан 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 действующее соединение в количествах в диапазоне от 0,25 мкг до примерно 2000 мг. Выраженное в пропорциях, действующее соединение может присутствовать в количестве от примерно 0,25 мкг до примерно 2000 мг/мл носителя. В случае композиций, содержащих дополнительные действующие ингредиенты, дозировки определяются по обычной дозе и способу введения указанных ингредиентов.

Используемый в данном описании термин "эффективное количество" относится к количеству соединения, которое при введении в соответствии с требуемой схемой введения обеспечивает желаемую терапевтическую активность. Введение может происходить одноразово, или с интервалом в несколько минут или часов, или непрерывно в течение любого из этих периодов. Подходящие дозировки могут находиться в диапазоне от примерно 0,1 нг на кг массы тела до 1 г на кг массы тела на дозу. Типичная дозировка находится в диапазоне от 1 мкг до 1 г на кг массы тела на дозу, например находится в диапазоне от 1 мг до 1 г на кг массы тела на дозу. В одном варианте осуществления изобретения доза может находиться в диапазоне от 1 мг до 500 мг на кг массы тела на дозу. В другом варианте осуществления изобретения доза может находиться в диапазоне от 1 мг до 250 мг на кг массы тела на дозу. В еще одном варианте осуществления изобретения, доза может находиться в диапазоне от 1 мг до 100 мг на кг массы тела на дозу, например составлять до 50 мг на кг массы тела на дозу.

Термины "лечение" и "терапия", используемые в настоящем описании, охватывают любое лечение состояния или заболевания у животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, и включают лечение любого заболевания или расстройства, которое опосредовано эндосомальным сигнальным путем  $NK_1R$ . Термины "профилактика" и "предотвращение", используемые в настоящем описании, охватывают предотвращение или профилактику состояния или заболевания у животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, и включают предотвращение заболевания или расстройства, которое опосредовано эндосомальным сигнальным путем GPCR.

В данном описании и в нижеследующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого или группы целых чисел.

Ссылка в данном описании на какую-либо предшествующую публикацию (или информацию, полученную из нее) или любой известный факт не является и не должна приниматься в качестве подтверждения, или принятия, или какой-либо формы предположения о том, что предшествующая публикация (или информация, полученная из нее) или известный факт образуют часть общего знания в области деятельности, к которой относится данное описание.

Далее изобретение будет описано на следующих неограничивающих примерах.

### **Экспериментальные способы**

#### **Ингибиторы $\beta$ -аррестинов**

Предполагаемые сайты фосфорилирования киназы-2 рецептора G-белков (GRK2) во внутриклеточном C-конце мышинного  $NK_1R$  были предсказаны с помощью Group Based Prediction System (<http://gps.biocuckoo.org/wsresult.php?p=1>). Были синтезированы пептиды, соответствующие этим доменам ( $S^{398}SSFYNSM^{405}$ ,  $S^{390}NSKTMTE^{397}$ ,  $L^{382}TSNGSSR^{389}$ ) или контрольный пептид (MSNSYSFS) с N-концевой, проникающей через мембрану Tat-последовательностью (YGRKKRRQRRR). Также был синтезирован фосфорилированный пептид ( $E^{335}MKS^*T^*RY^*L^{342}$ ) и конъюгирован с Tat.

кДНК

BRET-сенсорные белки  $NK_1R$ -R.Luc8, KRas-Venus, Rab5a-Venus,  $\beta$ arr1-YFP,  $\beta$ arr2-YFP были описаны (Kocan, M. et al., *Frontiers in endocrinology* 2010, 1, 12; Lan, T. H. et al., *Traffic* 2012, 13, 1450-1456). Сенсоры CytoEKAR и NucEKAR были приобретены в Addgene (плазмиды 18680, 18681 соответственно). Полноразмерный и укороченный (5312) крысиный HA- $NK_1R$  был описан ранее (Dery, O. et al., *American journal of physiology. Cell physiology* 2001, 280, C1097-1106). Слитые с RLuc8 эти конструкции были по-

лучены путем удаления стоп-кодона с помощью ПЦР и субклонирования в вектор pcDNA3.1-RLuc8.

#### Клеточные линии, трансфекция

Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие крысиный NK<sub>1</sub>R с N-концевым эпитопом HA11, были описаны (Roosterman, D. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007, 104, 11838-11843). Клетки HEK293 были трансфицированы с помощью полиэтиленимина (Polysciences) или Fugene (Promega). Клетки выращивали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 5% FBS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### BRET

Клетки HEK293 трансфицировали следующими кДНК: 1 мкг NK<sub>1</sub>R-RLuc8 или NK<sub>1</sub>Rδ312-RLuc8+4 мкг βarr1-YFP, βarr2-YFP, KRas-Venus или Rab5a-Venus. Через 48 ч клетки уравнивали в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS) при 37°C и инкубировали с субстратом RLuc - коэлюцентразином h (5 мкМ, 15 мин). Соотношения флуоресценции в BRET определяли с использованием микропланшетного ридера LUMIstar Omega (BMG LabTech) до и после активации SP (0,1-10 нМ) или носителем (dH<sub>2</sub>O).

#### FRET-биосенсоры для компартиментализированных сигнальных каскадов

Клетки HEK293 трансфицировали 55 нг/лунку крысиного NK<sub>1</sub>R с N-концевым тегом эпитопом HA.11 (HA-NK<sub>1</sub>R) или CLR плюс RAMP1 и 40 нг/лунку FRET-биосенсоров. FRET оценивали через 48 ч после трансфекции и депривации сыворотки (0,5% FBS в течение ночи). Для экспериментов с использованием кИПНК к клатрину или динамину клетки трансфицировали 55 нг/лунку крысиного HA-NK<sub>1</sub>R, 40 нг/лунку FRET-биосенсора и по 25 нМ/лунку коммерческих кИПНК "ON-TARGETplus SMARTpool": контрольные неспецифичные кИПНК, кИПНК к клатрину или кИПНК к динамину (GE Dharmacon). FRET оценивали через 72 ч после трансфекции и депривации сыворотки (0,5% FBS в течение ночи). Клетки уравнивали в HBSS при 37°C и FRET анализировали с использованием GE Healthcare INCell 2000 Analyzer. Для анализа соотношения эмиссии GFP/RFP клетки последовательно возбуждали с использованием FITC-фильтра (490/20) с измерением испускаемого излучения с использованием фильтров DsRed (605/52) и FITC (525/36) и полихромной оптимизированной для FITC/DsRed пары фильтров (Quad4). Для анализа соотношения эмиссии CFP/YFP последовательно возбуждали с использованием CFP-фильтра (430/24) с измерением испускаемого излучения с использованием фильтров YFP (535/30) и CFP (470/24) и полихромной оптимизированной для CFP/YFP пары фильтров (Quad3). Клетки снимали раз в 1 мин, что позволяет получать изображения для 14 лунок/мин. Изображения для соотношения фоновых эмиссий получали в течение 4 мин. Клетки стимулировали (в концентрациях, соответствующих EC<sub>50</sub>) SP (1 нМ), GGRP (1 нМ) или носителем и изображения получали в течение 20 мин. Затем клетки стимулировали положительным контролем (200 нМ форбол-12,13-дибутиратом для ERK; 200 нМ форбол-12,13-дибутиратом с коктейлем фосфатазных ингибиторов для PKC; 10 мкМ форсколином, 100 мкМ 3-изобутил-л-метилксантином, 100 нМ PGE<sub>1</sub> для цАМФ) в течение 10 мин, чтобы получить максимальное увеличение, и изображения соотношений положительных эмиссий получали в течение 4 мин. Данные были проанализированы, как описано, и представлены в виде соотношений эмиссий относительно фона для каждой лунки (F/F<sub>0</sub>). Для анализа были отобраны клетки с изменением >10% в F/F<sub>0</sub> после стимуляции положительным контролем.

#### ELISA на клеточной поверхности

Клетки HEK293, транзитивно трансфицированные HA-NK<sub>1</sub>R или HA-NK<sub>1</sub>Rδ312, фиксировали в PFA (30 мин). После фиксации для анализа общей экспрессии клетки пермеабелизовали с использованием 0,5% NP-40 в TBS (30 мин). Клетки инкубировали в блокирующем буфере (1% порошкового обезжиренного молока, 0,1M NaHCO<sub>3</sub>, 4 ч, RT), а затем с анти-НА антителами (1:5000, Sigma, в течение ночи, 4°C). Клетки промывали и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена анти-мышинными антителами (1:2000, 2 ч, RT). Клетки промывали и окрашивали с использованием субстрата SIGMAFAST® (Sigma-Aldrich). Поглощение при 490 нм измеряли при помощи планшетного ридера Envision (PerkinElmer Life Sciences). Значения нормировали на клетки HEK293, трансфицированные pcDNA3, или на необработанные клетки.

#### Механическая гипералгезия, ноцицептивное поведение у мышей

Мышей акклиматизировали к экспериментальной установке и окружающей среде в течение 1-2 ч за 2 дня перед экспериментами. Механическую гипералгезию оценивали по отдергиванию лапы при стимуляции подошвенной поверхности задней лапы с градуированными нитями фон Фрея. За день до исследования определяли оценку по фон Фрею в трипликатах, чтобы установить базовый уровень для каждого животного. Для оценки отека лапы толщину задней лапы измеряли с цифрового штангенциркуля до и после лечения. Для внутripодошвенных инъекций мышей седировали (5% изофлураном). Капсаицин (5 мкг), полный адьювант Фрейнда (CFA, 2 мг/мл) или носитель (капсаицин - 20% этанол, 10% Твин-80, 70% солевой раствор; CFA - физиологический раствор) вводили подкожно в подошвенную поверхность левой задней лапы (10 мкл). Оценка фон Фрея (левая и правая лапы) и толщину лапы (левая лапа) определяли через 30-240 мин после введения капсаицина и через 36-40 ч после инъекции CFA. Результаты выражали в виде процентов от значений до инъекций. Для оценки ноцицептивного поведения мышей седировали и вводили подкожно формалин (4%, 10 мкл) в подошвенную поверхность левой задней лапы. Мышей по-

мещали в контейнеры Perspex и ноцицептивное поведение (вздрагивание, облизывание, кусание получившей инъекцию лапы) регистрировали в течение 60 мин. Общее количество ноцицептивных событий делили на острую (I, 0-10 мин) и тоническую (II, 10-60 мин) фазы.

#### Инtrateкальные инъекции пептидов у мышей

Инtrateкальные инъекции (5 мкл, L3/L4) проводили находящимся в сознании мышам. Проникающие в клетки пептиды NK<sub>1</sub>R (Tat-конъюгированные S<sup>398</sup>SSFYSNM<sup>405</sup>, S<sup>390</sup>NSKTMTE<sup>397</sup>, L<sup>382</sup>TSNGSSR<sup>389</sup>, каждый 30 мкМ), 100 мкМ контрольный пептид (Tat-конъюгированный MSNSYSFS) или носитель (1% ДМСО/солевой раствор) инtrateкально вводили за 30 мин до внутривидовой инъекции капсаицина или формалина или через 36 ч после введения CFA.

#### Инtrateкальное введение кРНК мышам

Катионные липосомы и адьювантный анионный полимер (полиглутамат) были использованы для доставки кРНК. кРНК, направленные на мышинный  $\beta$ arr1 (смысловая последовательность: 5' AGC CUU CUG CGC GGA GAA U dTdT 3', антисмысловая последовательность: 5' dTdT U CGG AAG ACG CGC CUC UUA 5'), плюс кРНК, направленные на мышинный  $\beta$ arr2 (смысловая последовательность: 5' CCU ACA GGG UCA AGG UGA A dT dT 3', антисмысловая последовательность: 5' UUC ACC UUG ACC CUG UAG G dT dT 3'), или контрольные кРНК (смысловая последовательность: 5' AAG GCC AGA CGC GAA UUA U dT dT 3', антисмысловая последовательность: 5' AUA AUU CGC GUC UGG CCU U dT dT 3') (Dharmacon) (50 нг, 0,5 мкл из стока 100 нг/мкл) смешивали с 0,5 мкл адьювантного полиглутамата (сток 0,1 мкг/мл) и 1,5 мкл стерильного 0,15 M NaCl. Раствор липосом, катионного липида 2-{3-[бис-(3-амино-пропил)амино]пропиламино}-N-дитетрадецилкарбамоилметил-ацетамида (DMAPAP) и L- $\alpha$ -диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) (DMAPAP/DOPE, 1/1 M:M) (2,5 мкл, 200 мкМ) добавляли к смеси кРНК и адьюванта, встряхивали на вортексе в течение 1 мин и инкубировали (30 мин, RT). Липосомные комплексы кРНК вводили мышам с помощью инtrateкальной инъекции (L1-L4, 5 мкл). После тестирования поведения (через 36 ч), собирали спинной мозг (L1-L4), для анализа экспрессии  $\beta$ arr1 и  $\beta$ arr2 с помощью кПЦР.

#### кПЦР

Поясничный отдел спинного мозга мыши (L1-L4) помещали в буфер RNeasy (Qiagen) и выделяли суммарную РНК с использованием набора для выделения РНК RNeasy (Qiagen). Суммарную РНК (500 нг) обратно транскрибировали с использованием набора для синтеза кДНК Superscript<sup>TM</sup> III (Invitrogen). кДНК амплифицировали с использованием набора для синтеза кДНК RealPlex Real Time PCR System. Двадцать микролитров реакции амплификации включали кДНК-матрицу, TaqMan Universal Master Mix и TaqMan Gene Expression Assays для одного из следующих генов: (№ по каталогу) ARRB2 (Mm00520666\_g1), ARRB1 (Mm00617540\_m1), ACTB (Mm0261958G\_g1), GAPDH (hs00363153\_m1). Образцы были амплифицированы в трипликатах. Оценивали относительное содержание (R) каждого транскрипта способом  $\Delta\Delta C_t$  с использованием следующей формулы:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $C_t$  представляет собой средний критический порог, при котором увеличение флуоресценции является экспоненциальным. Предполагая, что эффективность ПЦР-реакции составляла 100%, что соответствует 2-кратному увеличению количества ампликона с каждым циклом ПЦР. При таком предположении использовали  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  для расчета относительного содержания транскриптов. Эти величины нормализовали на  $\beta$ -актин и GAPDH.

#### Пример 1. Эффекты $\beta$ arr1 кРНК на ноцицепцию.

Инtrateкально введенные  $\beta$ arr1+2 кРНК ингибировали вызываемую капсаицином гипералгезию через 36 ч (фиг. 1a, b). кРНК не влияли на реакцию отдергивания на не получившей инъекции лапе (фиг. 1c).

#### Пример 2. Фармакологический антагонизм взаимодействий $\beta$ arr-NK<sub>1</sub>R.

Для того, чтобы обосновать участие эндоцитоза NK<sub>1</sub>R в передаче боли, был разработан фармакологический подход, блокирующий взаимодействия NK<sub>1</sub>R/ $\beta$ arr. Киназы рецептора G-белков (GRK) фосфорилируют С-концевые S/T-богатые домены GPCR, что вызывает взаимодействие с  $\beta$ arr. Делеционный мутант NK<sub>1</sub>R $\delta$ 312 не имеет С-конца и соответствует природному варианту NK<sub>1</sub>R (Steinhoff, M. S. et al. *Physiol Rev* 2014, 94, 265-301). NK<sub>1</sub>R $\delta$ 312 в норме экспрессировался на плазматической мембране клеток HEK293, но не связывался с  $\beta$ arr или интернализировался (фиг. 2a-f). SP стимулировал цитозольную, но не ядерную ERK в клетках HEK-NK<sub>1</sub>R $\delta$ 312, в соответствии с эндоцитоз-зависимой сигнальной активностью ядерной ERK (фиг. 2g). Пептиды, соответствующие предсказанным сайтам фосфорилирования GRK2 в С-конце мышинного NK<sub>1</sub>R, были конъюгированы с проникающим через мембрану Tat-пептидом (YGRKKRRQRRR) (фиг. 2a). Эти соединения ингибировали связывание полноразмерного NK<sub>1</sub>R с  $\beta$ arr и предупреждали эндоцитоз по сравнению контрольным пептидом (фиг. 2h, i).

#### Пример 3. Влияние пептидов NK<sub>1</sub>R на ноцицепцию.

При инtrateкальном введении ингибиторы  $\beta$ -аррестинов, описанные в данном документе, ингибировали вызываемую капсаицином гипералгезию (фиг. 3a). Инtrateкально вводимые ингибиторы  $\beta$ -аррестинов ингибировали обе фазы ноцицептивного ответа на внутривидовое введение формалина, и уменьшали устойчивую механическую гипералгезию, измеряемую через 37-40 ч после внутривидового введения адьюванта Фрейнда (CFA) (фиг. 3b, c). В соответствии с ролью эндоцитоза NK<sub>1</sub>R и

ваг в индуцированном SP сигнальном каскаде ядерной ERK (DeFea, K.A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97, 11086-11091) интратекально введенный ингибитор MEK, U0126, ингибировал вызванную капсаицином гипералгезию (Ji, R.R. et al., The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 2002, 22, 478-4850).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор  $\beta$ -аррестина, имеющий формулу

A-D

где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора  $\beta$ -аррестина через клеточную мембрану, и

D представляет собой фрагмент из одного или нескольких сайтов фосфорилирования на внутриклеточном C-конце  $NK_1R$ ; или

его фармацевтически приемлемая соль.

2. Ингибитор  $\beta$ -аррестина по п.1, выбранный из

A-SSSFYSNM-OH,

A-SNSKTMTE-OH,

A-LTSNGSSR-OH и

A-EMKS\*T\*RY\*L-OH,

где

A представляет собой проникающий через мембрану остаток, который облегчает транспортировку ингибитора  $\beta$ -аррестина через клеточную мембрану; и

\* указывает на то, что аминокислотный остаток является фосфорилированным; или

его фармацевтически приемлемая соль.

3. Ингибитор  $\beta$ -аррестина по п.1 или 2, где A представляет собой последовательность проникающего через мембрану Tat-пептида YGRKKRRQRRR.

4. Ингибитор  $\beta$ -аррестина по п.1 или 2, где A представляет собой пальмитиновую кислоту.

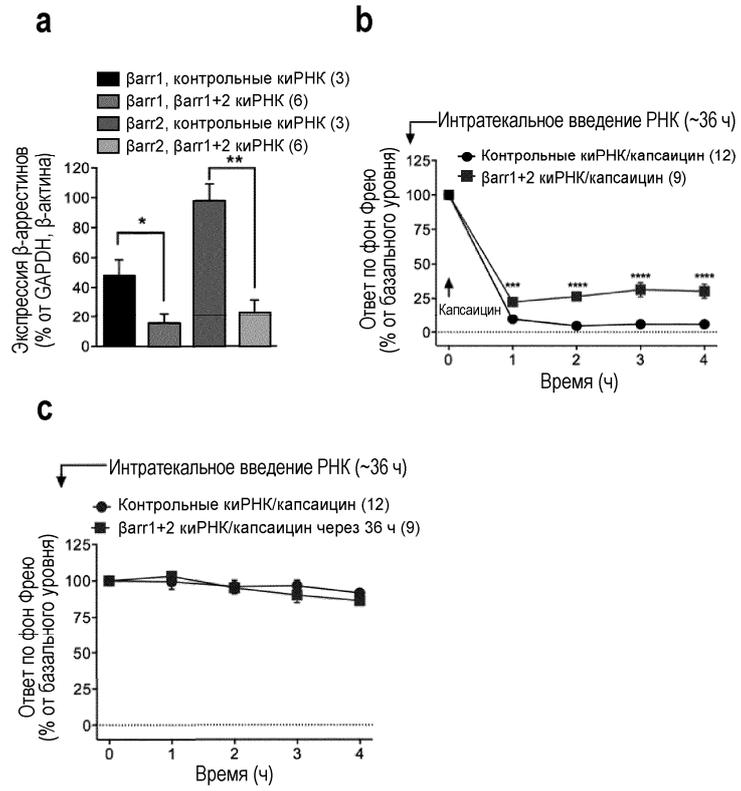
5. Применение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибитора  $\beta$ -аррестина по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемой соли вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в способе лечения заболевания или расстройства, опосредованного эндосомальным сигнальным каскадом SP или  $NK_1R$ , где заболевание или расстройство выбраны из группы, состоящей из депрессии и аффективных расстройств, тревожных расстройств, связанных с наркоманией расстройств, связанных с алкоголизмом расстройств, расстройств сна, расстройств пищевого поведения, расстройств аутистического спектра, синдрома дефицита внимания/гиперактивности, расстройств личности, воспаления, аллергических заболеваний, неврологических расстройств, рвоты, боли и раковых заболеваний.

6. Применение по п.5, где заболевание или расстройство, опосредованные эндосомальным сигнальным каскадом  $NK_1R$ , выбирают из вызванной химиотерапией тошноты и рвоты (CINV), послеоперационной тошноты и рвоты, аффективных и аддиктивных расстройств, включая депрессию и тревогу, желудочно-кишечных расстройств, включая воспалительные заболевания кишечника и синдром раздраженного кишечника, хронических воспалительных заболеваний, включая артрит, респираторных заболеваний, включая астму и ХОБЛ, урогенитальных расстройств, сенсорных расстройств и боли, включая соматическую боль и висцеральную боль, зуда, вирусных и бактериальных инфекций и пролиферативных заболеваний (рака).

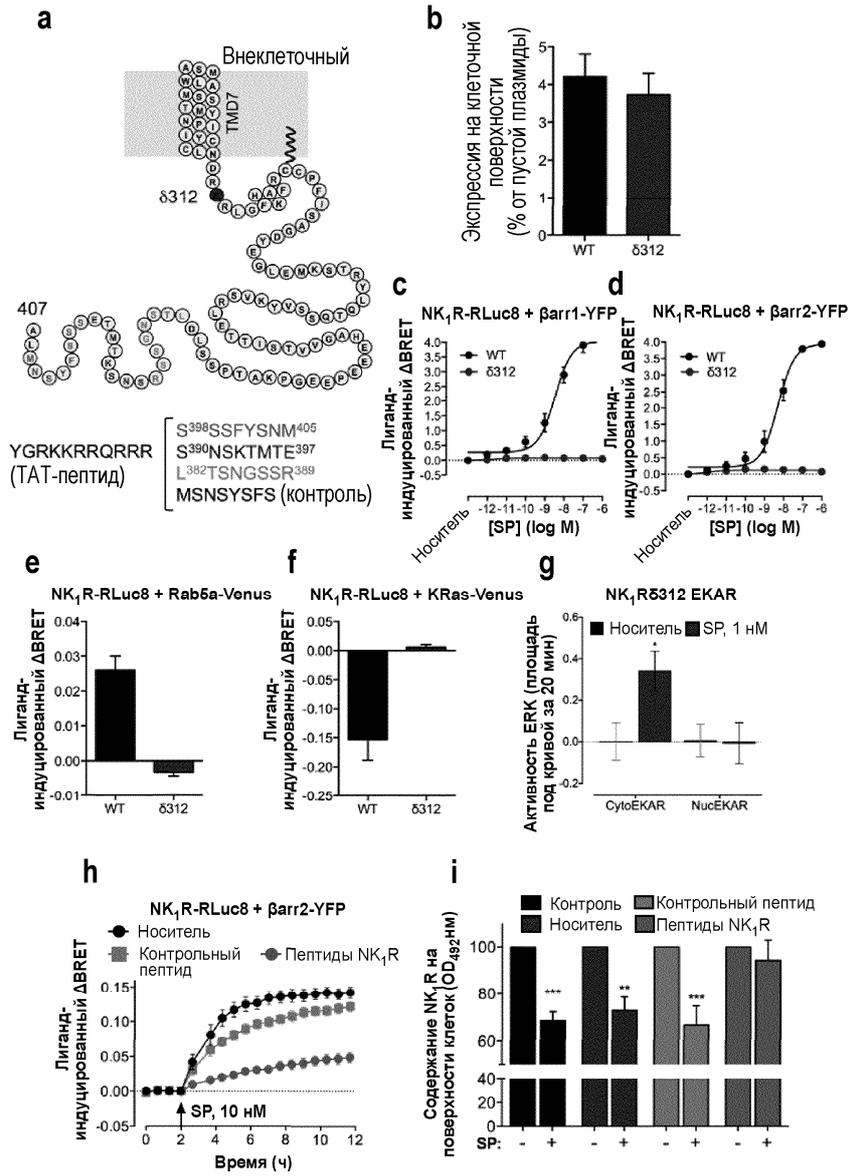
7. Применение по п.6, где заболевание или расстройство, опосредованные эндосомальным сигнальным каскадом  $NK_1R$ , представляет собой соматическую боль или висцеральную боль.

8. Применение по п.6 или 7, где заболевание или расстройство, опосредованные эндосомальным сигнальным каскадом SP или  $NK_1R$ , представляет собой хроническое заболевание или расстройство.

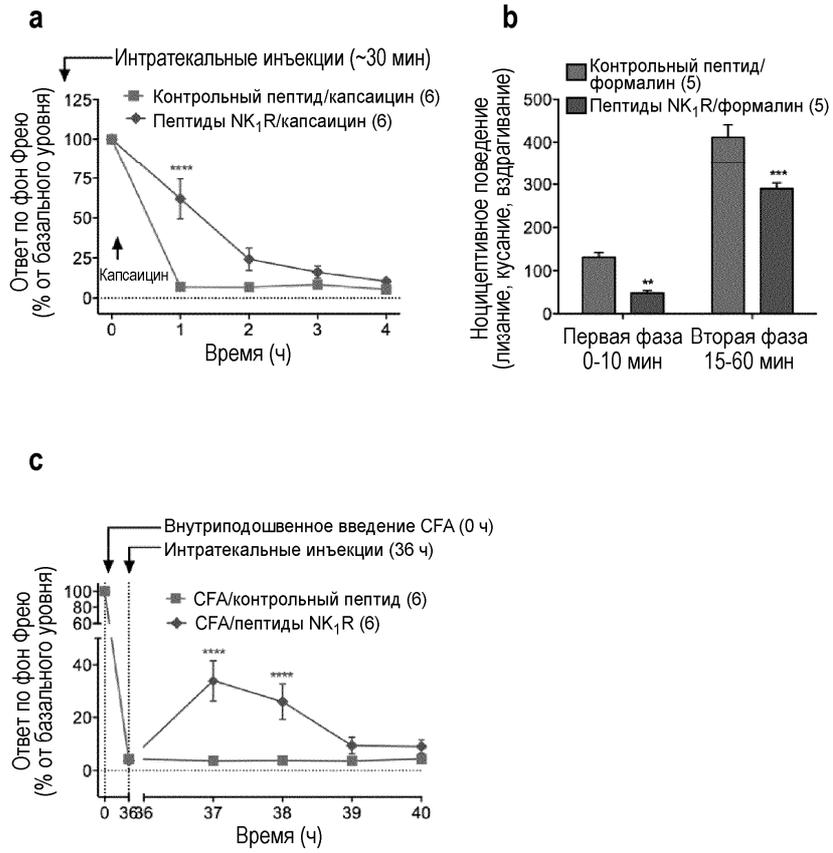
9. Применение ингибитора  $\beta$ -аррестина по любому из пп.1-4 для лечения заболевания или расстройства, опосредованных эндосомальным сигнальным каскадом SP или  $NK_1R$ , где заболевание или расстройство, опосредованные эндосомальным сигнальным каскадом  $NK_1R$ , выбирают из вызванной химиотерапией тошноты и рвоты (CINV), послеоперационной тошноты и рвоты, аффективных и аддиктивных расстройств, включая депрессию и тревогу, желудочно-кишечных расстройств, включая воспалительные заболевания кишечника и синдром раздраженного кишечника, хронических воспалительных заболеваний, включая артрит, респираторных заболеваний, включая астму и ХОБЛ, урогенитальных расстройств, сенсорных расстройств и боли, включая соматическую боль и висцеральную боль, зуда, вирусных и бактериальных инфекций и пролиферативных заболеваний (рака).



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

