



# Конференция GLP Planet IV

## Доклинические исследования эффективности и безопасности нового неопиоидного анальгетика

*Потеряев Дмитрий Александрович,  
к.б.н.*

*Генеральный директор  
ООО «Анальгетики Будущего»*

Санкт-Петербург, 29 июня 2023

.future analgesics

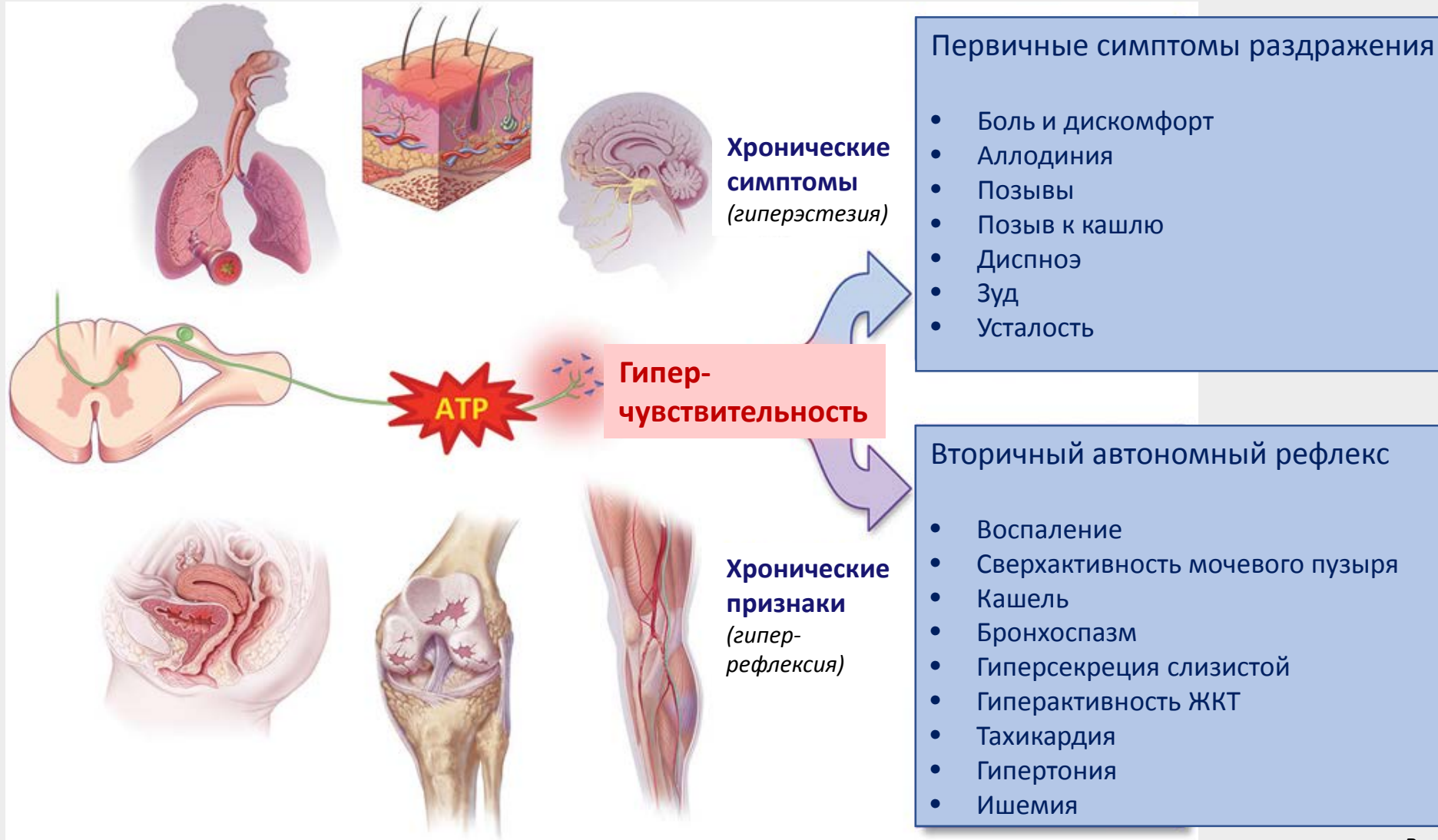


<https://www.precisionpaincarerehab.com/>

.future analgesics

# Пуринэргическая система - многообещающая мишень для разработки новых лекарств, например анальгетиков

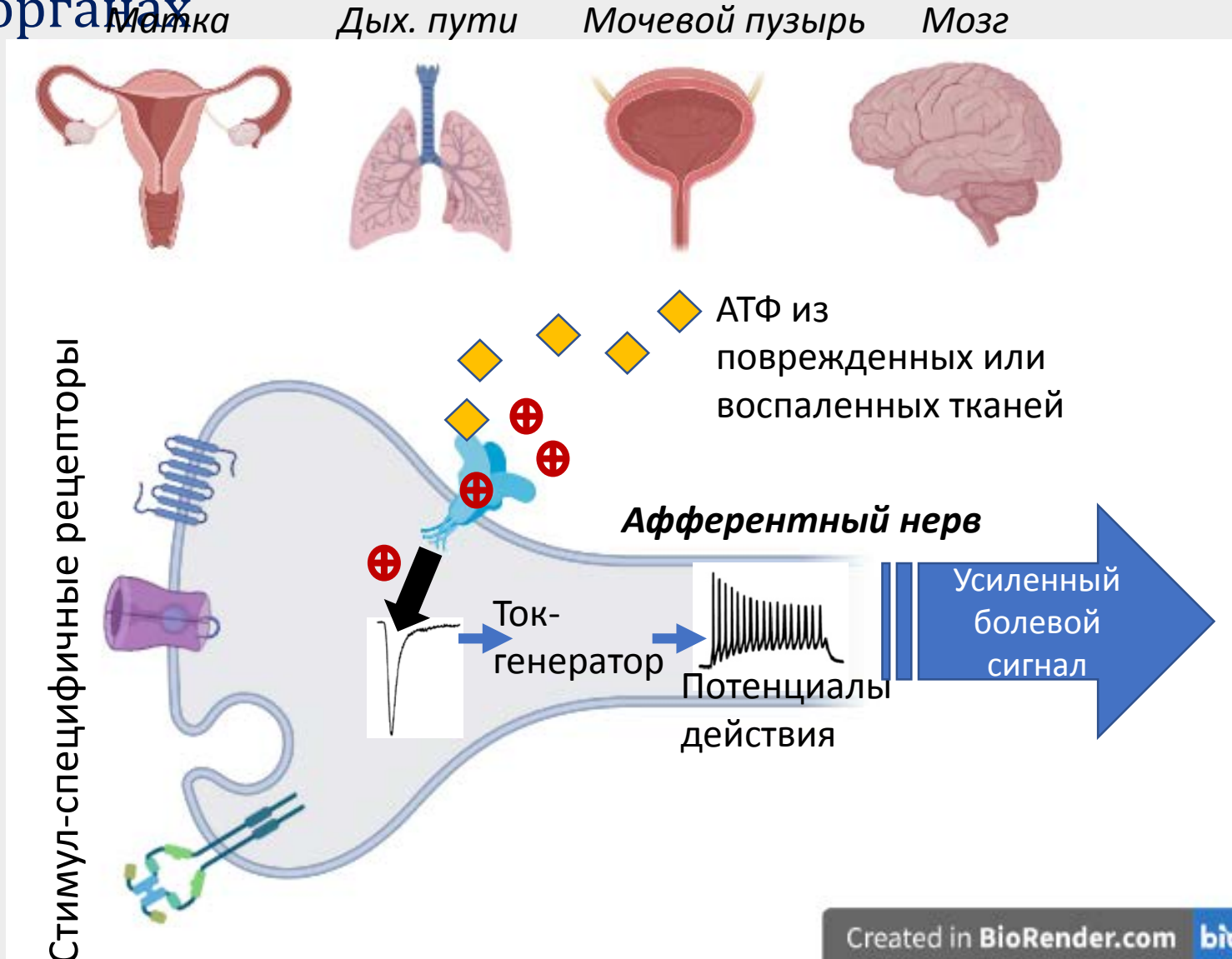
.анальгетики будущего



Нейроны, использующие в качестве нейротрансмиттеров АТФ или аденозин называются **пуринэргическими**

# Гиперсенситизация пуриnergического рецептора, ионного канала P2X3 является причиной раздражения и боли во многих органах

.анальгетики будущего



Афферентные нейроны периферической нервной системы экспрессируют рецептор P2X3. Активация P2X3 запускает нейрональную гиперсенситизацию, участвующую в

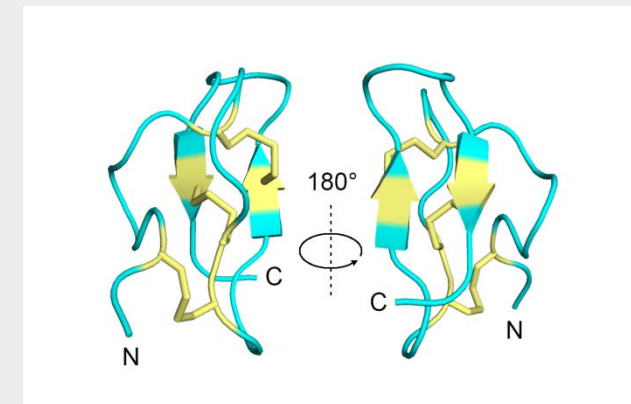
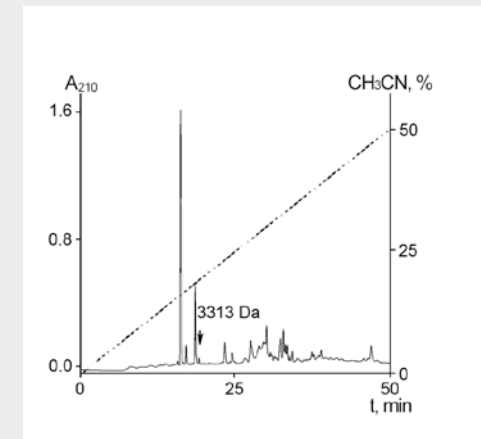
- Воспаление
- Восприятие боли
- Кашле

P2X3 является привлекательной и проверенной мишенью для разработки обезболивающих препаратов.

FA006 (Purotoxin-6, PT6) - пептид, открытый в составе яда паука.

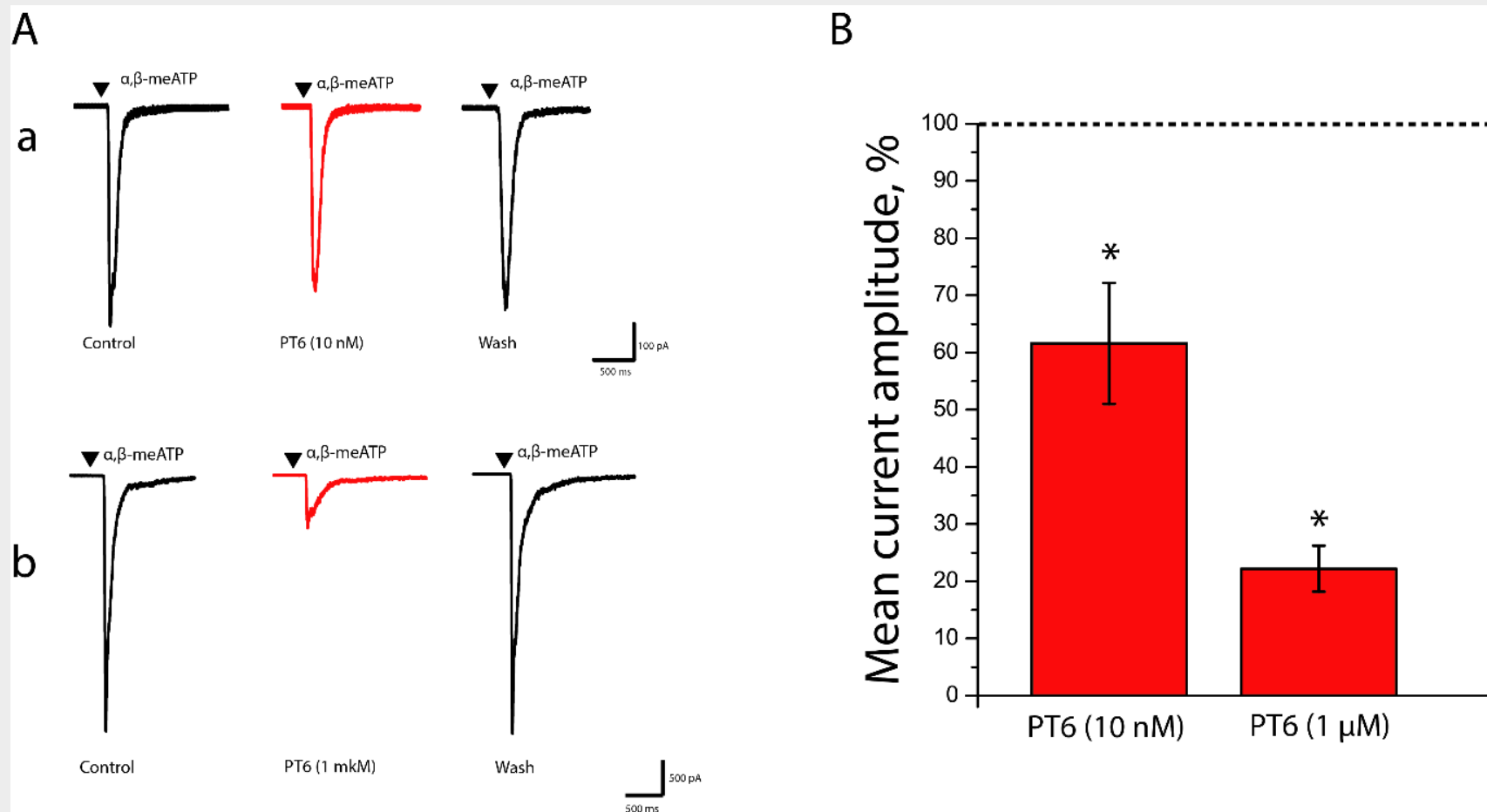
## *Ключевые исследования FA006 как лекарственного кандидата*

- Ингибирования ионного тока P2X3 в культуре болевых чувствительных нейрон
- Снижение активности тройничного нерва в ответ на АТФ в крысиных менингах
- Эффективность на животных моделях воспалительной и висцеральной боли, невралгии, синдрома болезненного мочевого пузыря, хронического кашля, синдрома отмены опиатов, зуда/атопического дерматита
- Не влияет на вкус в модели предпочтения/избегания вкусов
- Отсутствие обезболивающего эффекта у мышей с нокаутом рецептора P2X3
- Потенциально лучший в классе анальгетик и противокашлевой препарат



# FA006 специфически ингибирует активность P2X3 activity

Механизм действия FA006 отличается от известных неконкурентных антагонистов P2X3 находящихся в клинической разработке



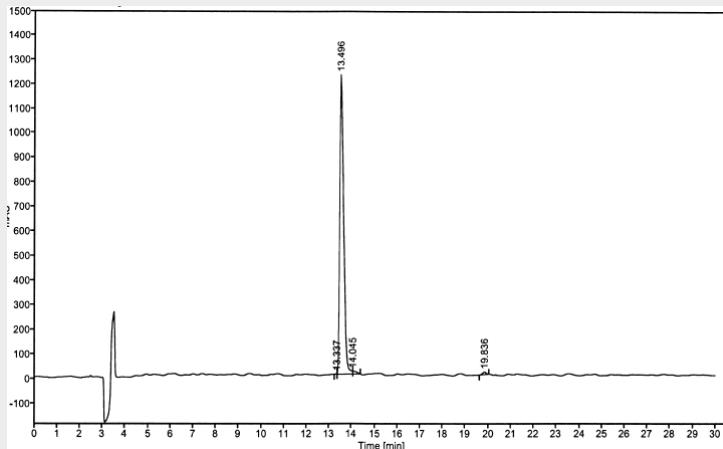
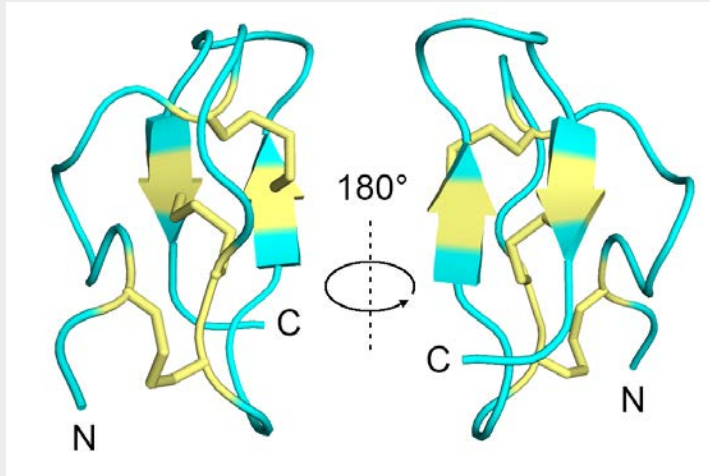
FA006/PT-6 механизм ингибирования заключается в сильном, зависимом от концентрации, продлении десенситизированного состояния P2X3.

Активность FA006/PT-6 зависит от применения: ингибирование происходит только когда пептид применен к десенситизированному состоянию рецептора.

## АФИ

Твердофазный пептидный синтез (SPPS)

Процесс готов к GMP (до шкалы в десятки кг)



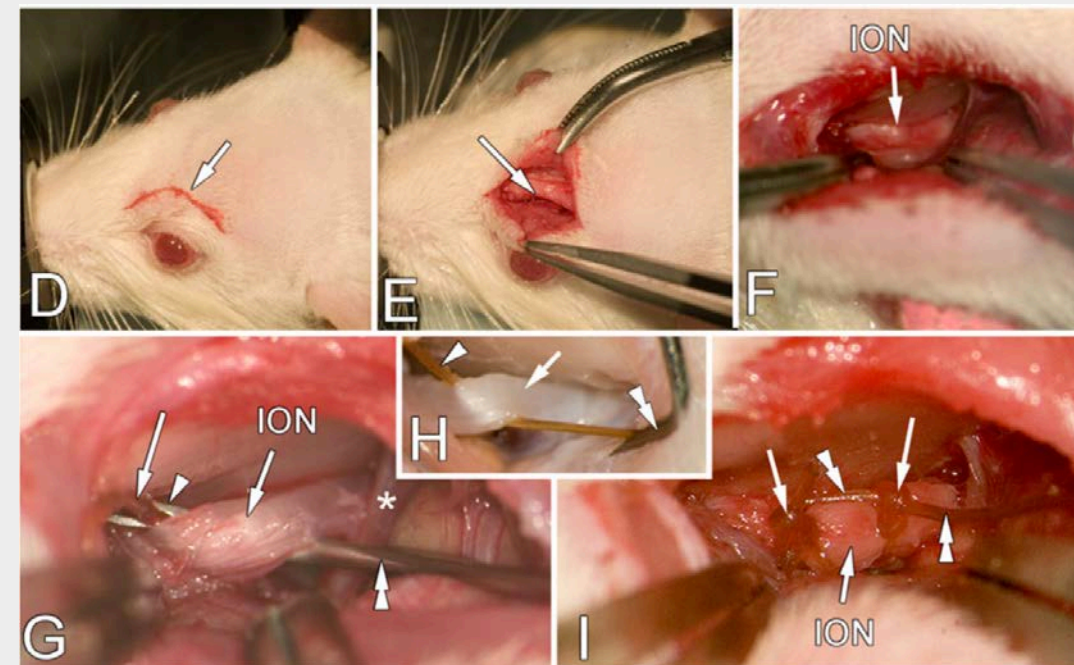
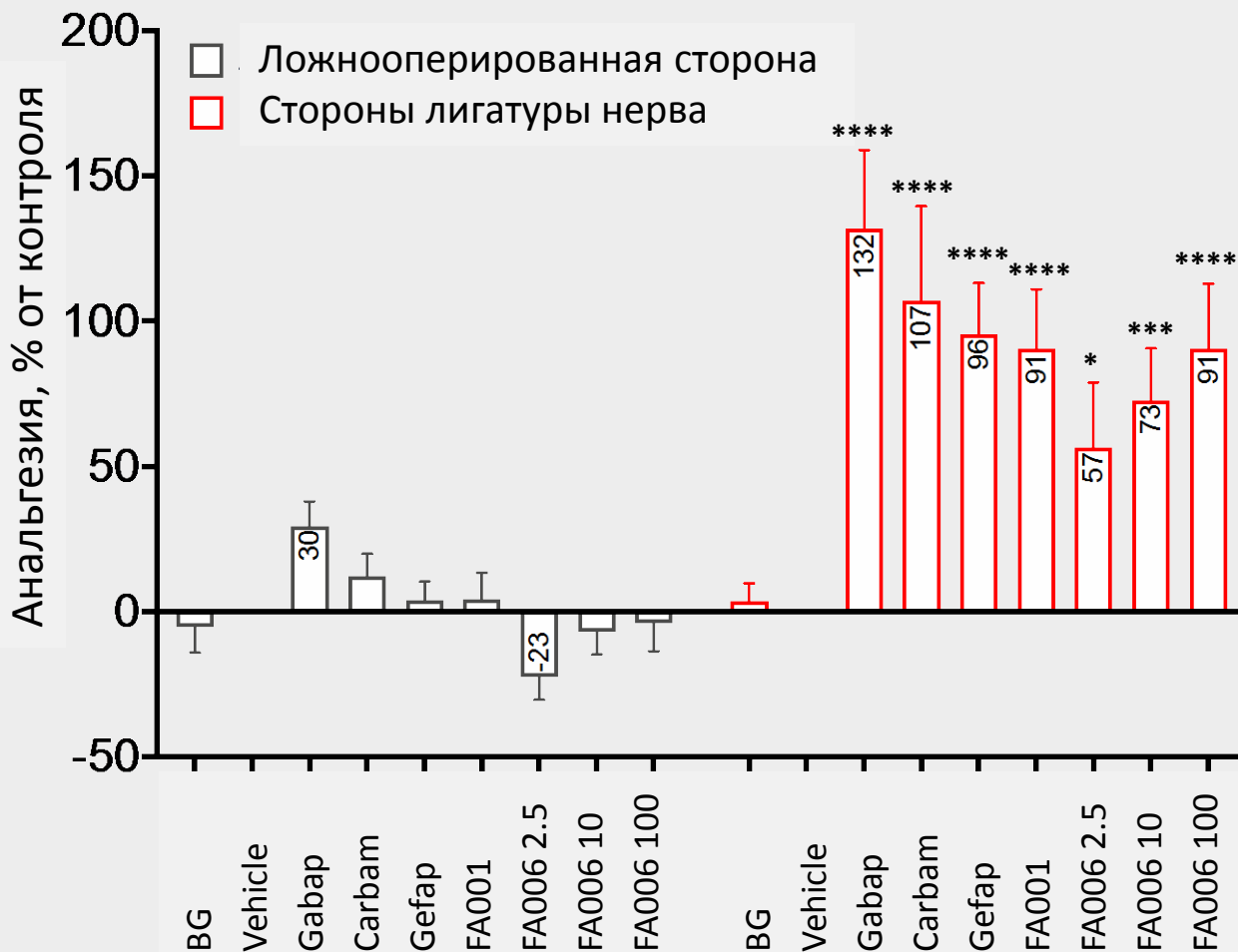
## ГЛФ

Раствор для подкожных инъекций

Стабильность до 2 лет



# Обезболивающий эффект FA006 в модели хронической невралгии тройничного нерва у крыс

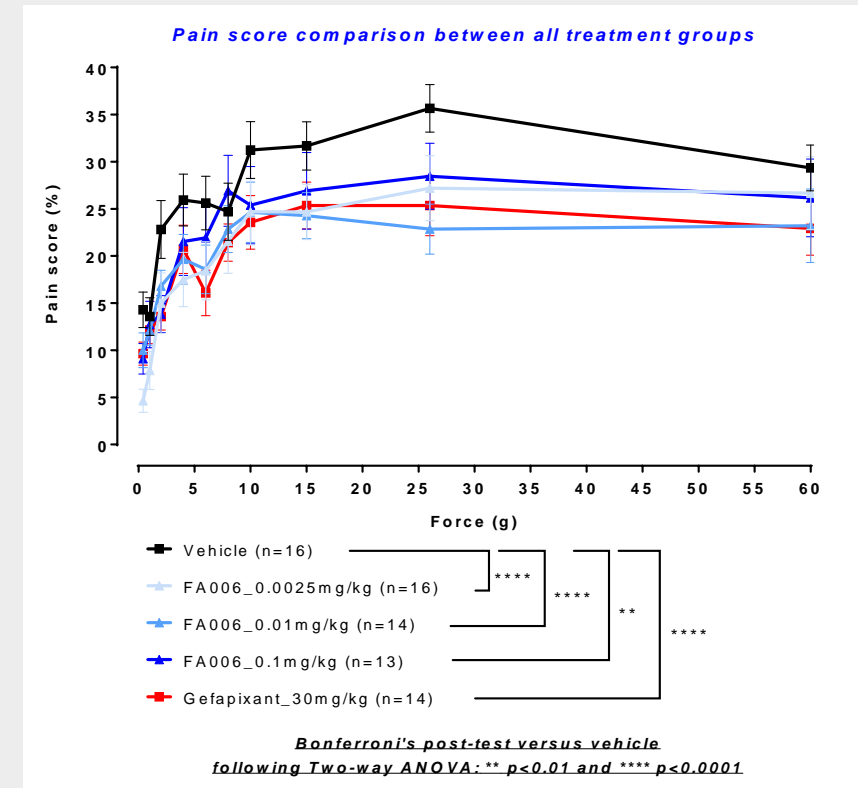
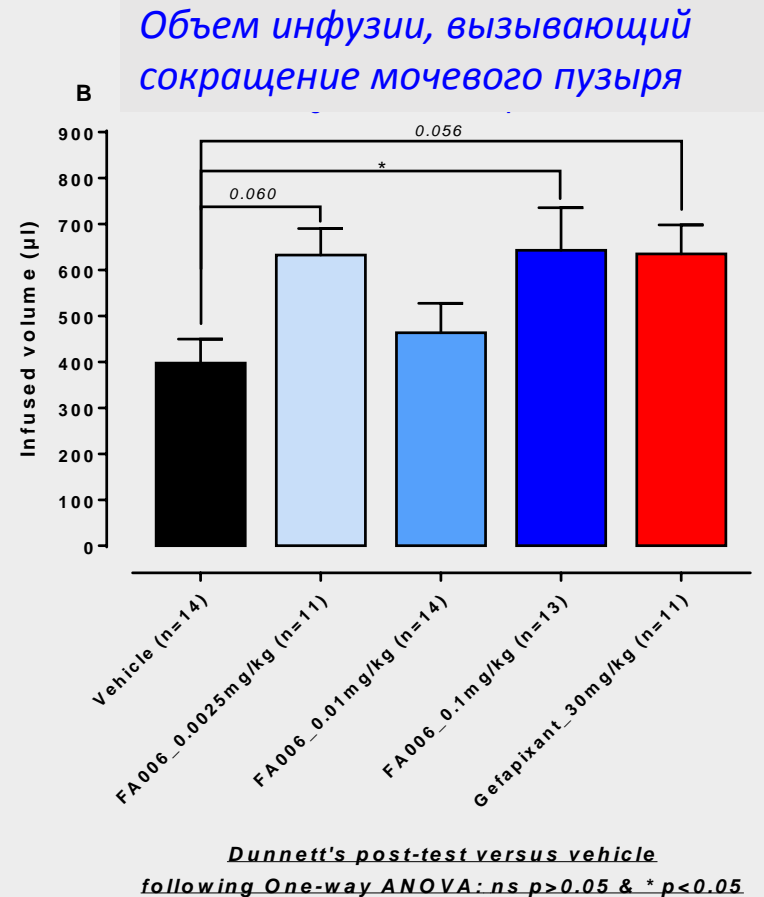
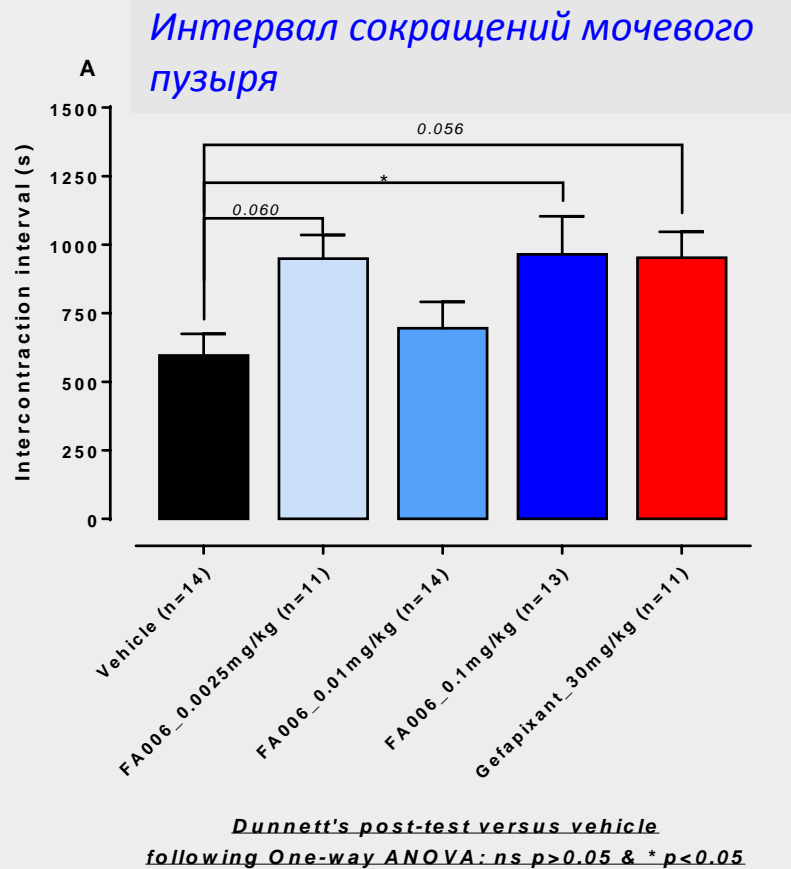


BG – фон, Vehicle – плацебо, Gabap – габапентин 100 мг/кг, Carbam – карбамазепин 50 мг/кг, Gefap – джефапиксант 10 мг/кг, FA001 – 10 мкг/кг, FA006 2.5, 10 и 100 мкг/кг

Пептид FA006 оказывал обезболивающее действие на модели невралгии тройничного нерва, сравнимое с таковым карбамазепина, габапентина и джефапиксанта в дозе 100 мкг/кг, что на три порядка меньше, чем у используемых референтных веществ.

# Эффективность FA006 в модели синдрома болезненного мочевого пузыря у крыс

Intercontraction Interval and Infused Volume of voiding contraction

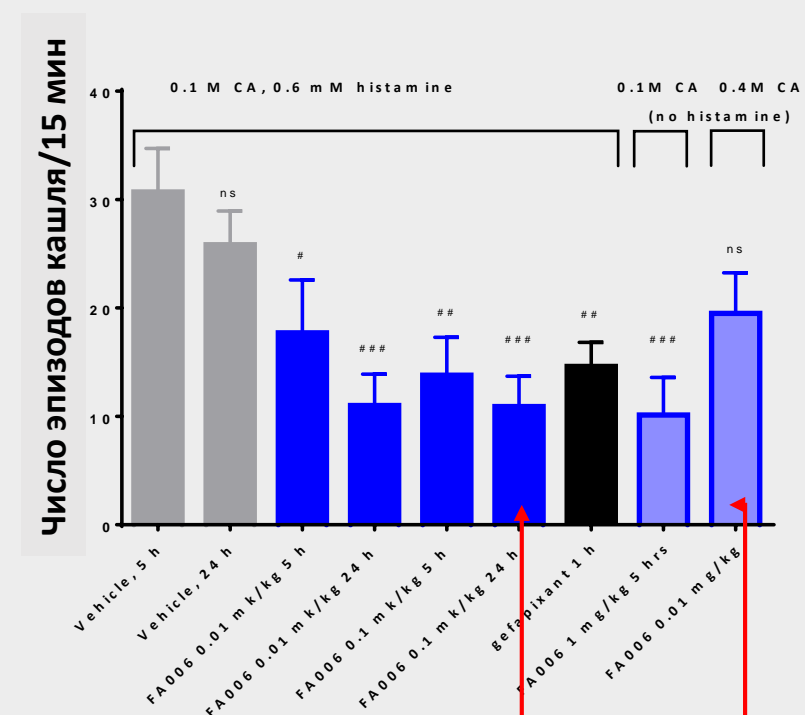
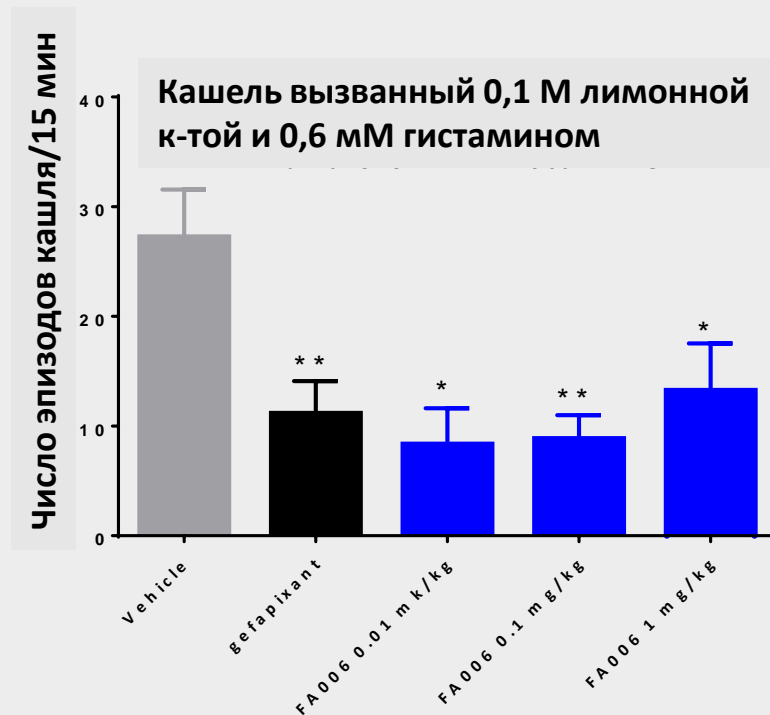
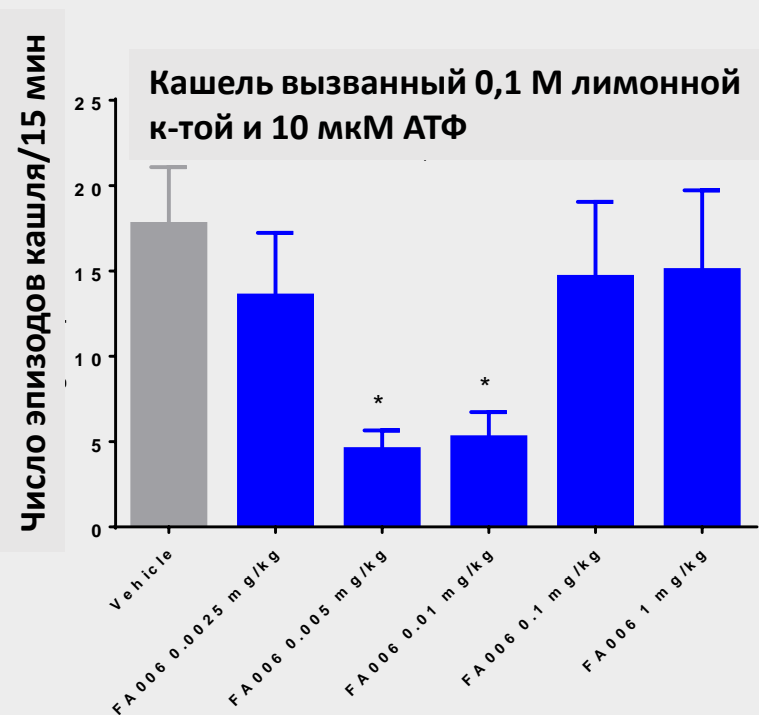


Цистометрия: интервал между сокращениями и объем инфузии значительно увеличиваются у крыс, получавших FA006

Показатель боли значительно снижается при лечении FA006 в любых дозах и при лечении джефапиксантом (для FA006 эффективная концентрация на 3 порядка ниже).



FA006 эффективно подавляет кашель, вызванный АТФ или гистамином + лимонная кислота, в концентрациях, начиная с 0,005 мг/кг. Модель хронического кашля на морских свинках

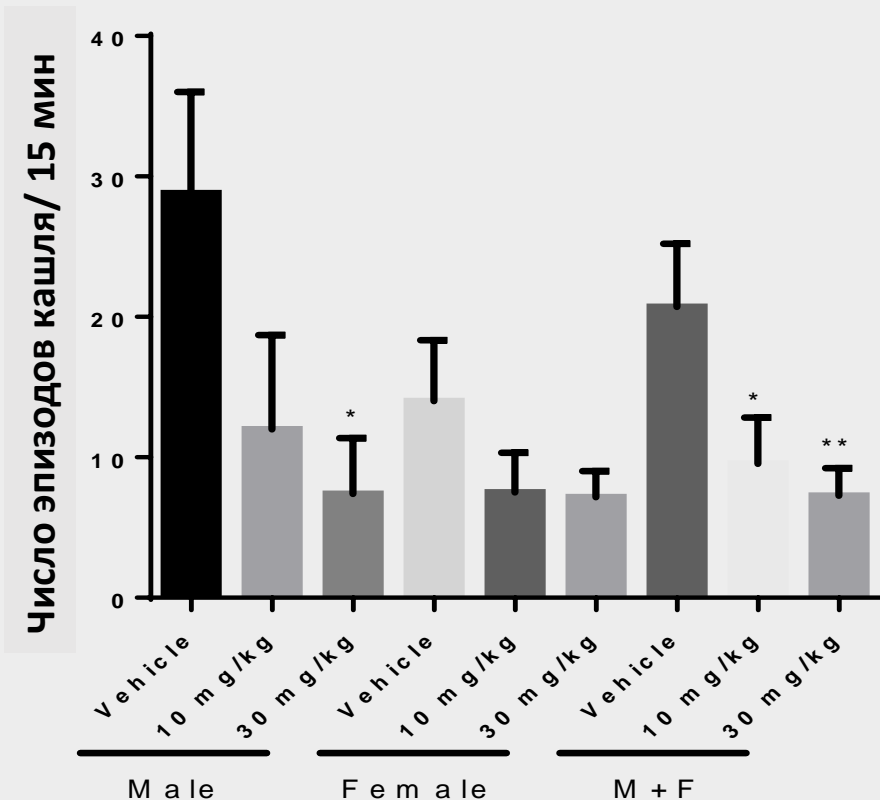


#-P<0.05, ##-P<0.01, ###-P<0.001

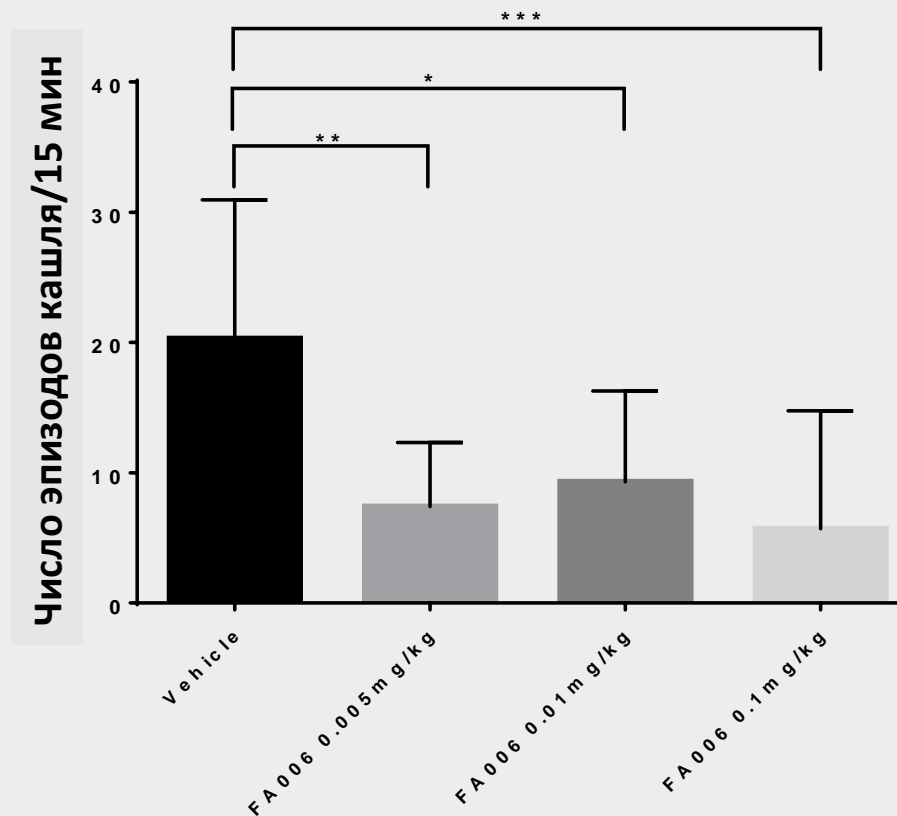
Противокашлевый эффект FA006 продолжается по крайней мере 24 часа после единственной дозы.

FA006 не влияет на кашель, не зависящий от рецепторов P2X3

# FA006 имеет выраженный противокашлевый эффект также в аналогичной модели хронического кашля, зависящего от сенситизации Р2Х3, у яванских макаков



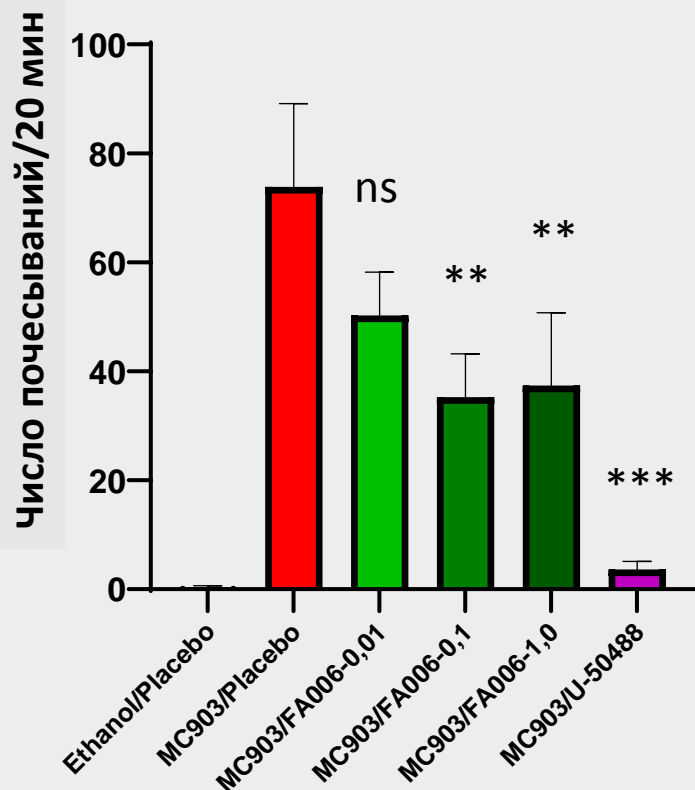
Модель кашля у обезьян была валидирована с использованием первого в своем классе антагониста Р2Х3, гефапиксанта. Гефапиксант в дозах 10 и 30 мг/кг эффективно подавляет кашель у обезьян.



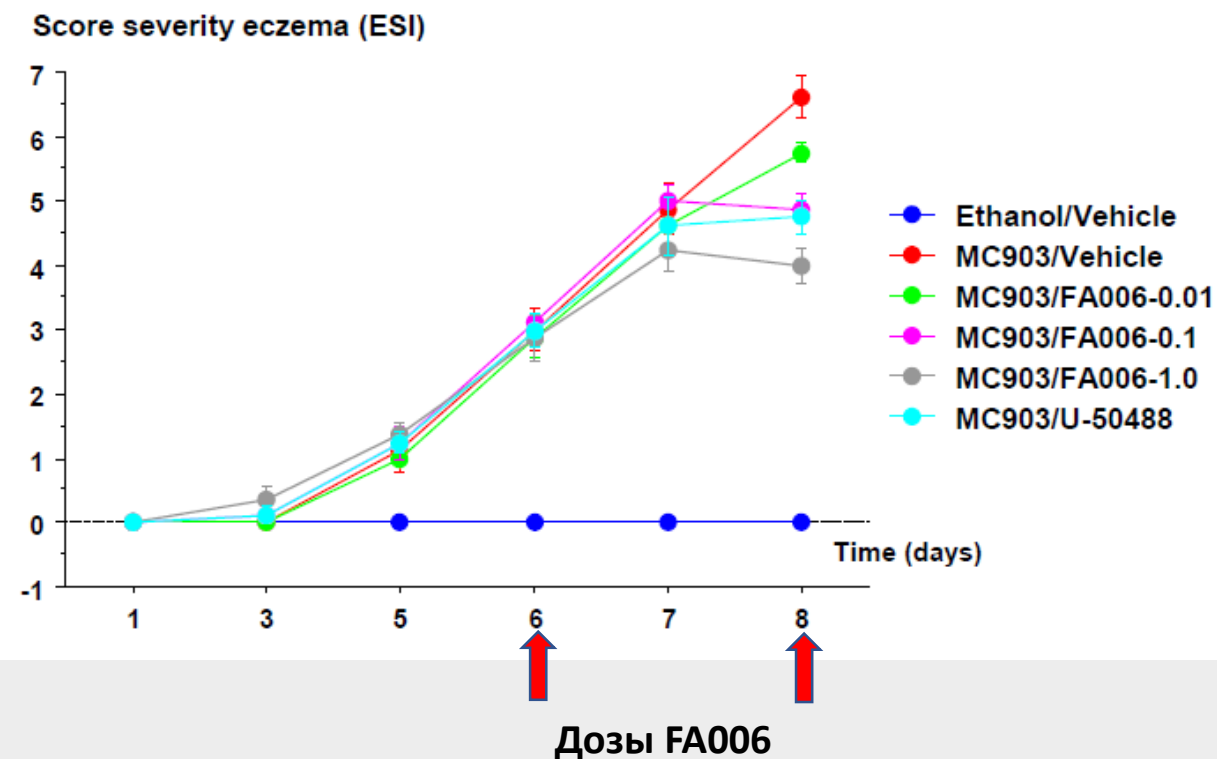
**FA006 эффективно подавляет кашель, вызванный гистамином и лимонной кислотой, у обезьян в дозах 0,005, 0,01 и 0,1 мг/кг.**

# FA006 для терапии хронического зуда: признаки эффективности в доклинической модели

Кальципотреол (MC903) - 8 дней  
Calcipotriol (MC903) for 8 days



Средние баллы тяжести экземы (ESI) в месте ее индукции на протяжении эксперимента (n=8) (Средн. ± SEM)



FA006 снизил зуд и общую тяжесть экземы в мышинной модели хронического зуда и атопического дерматита, вызванных кальципотреолом (аналог витамина D). Препарат сравнения – κ-опиоидный агонист U-50488

# FA006 снижает симптомы отмены морфина

## Эффект FA006 на поведенческие признаки синдрома отмены

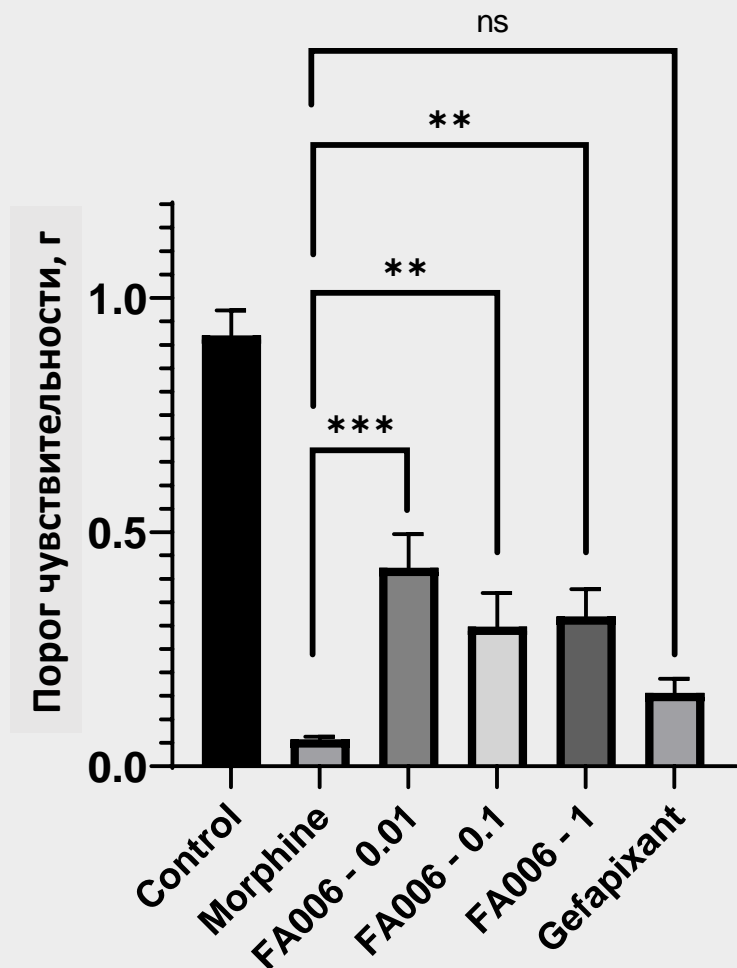
Сообщалось, что активация рецепторов P2X2 и P2X3 может играть роль в гипералгезии, вызванной отменой героина\*.

Поведение	Экспериментальные группы						ANOVA
	Контроль	Морфин	FA006 0.01 мг/кг	FA006 0.1 мг/кг	FA006 1 мг/кг	Gefapixant 20 мг/кг	
Скрежетание зубами	0,3 (0,7)	1,4 (1,5) **	0,4 (1,3) +	0,0 (0,0) ++	0,3 (0,7) ++	0,2 (0,4) ++	F(5, 54)=2,9381, p=0,02036
Побег	0,1 (0,3)	0,8 (0,4) **	0,3 (0,5) +	0,3 (0,5) +	0,6 (0,5) *	0,6 (0,5) *	F(5, 54)=3,1461, p=0,01453
Стереотипия	0,0 (0,0)	0,8 (0,4) ***	0,1 (0,3) +++	0,6 (0,5) **	0,4 (0,5) * +	0,3 (0,5) ++	F(5, 54)=5,2085, p=0,00057
Отряхивание	0,0 (0,0)	0,3 (0,5) *	0,3 (0,5) *	0,0 (0,0) +	0,0 (0,0) +	0,0 (0,0) +	F(5, 54)=3,0857, p=0,01602
Нарушение позы	0,1 (0,3)	0,8 (0,4) ***	0,7 (0,5) **	1,0 (0,0) ***	0,7 (0,5) **	0,8 (0,4) ***	F(5, 54)=6,0940, p=0,00015
Взъерошенность	0,2 (0,4)	0,9 (0,3) ***	0,8 (0,4) **	0,8 (0,4) **	0,9 (0,3) ***	0,8 (0,4) **	F(5, 54)=4,6537, p=0,00133
Диспноэ	0,3 (0,5)	0,8 (0,4) **	0,9 (0,3) ***	0,8 (0,4) **	0,9 (0,3) ***	0,9 (0,3) ***	F(5, 54)=3,6900, p=0,00605

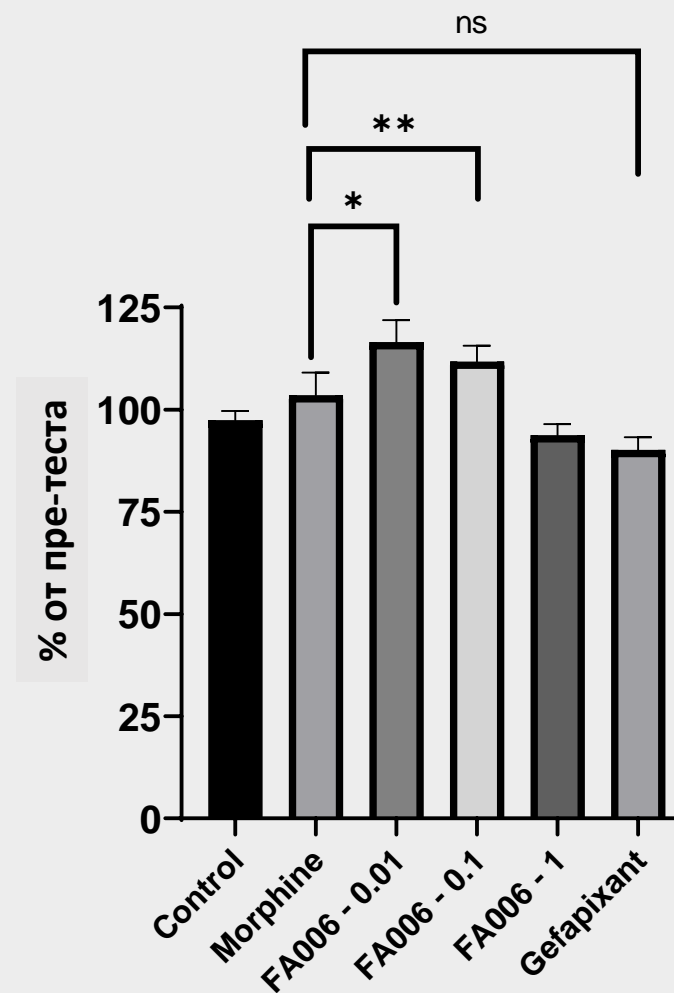
\*Leng, Changlong, et al. "Upregulation of P2X2 and P2X3 receptors in rats with hyperalgesia induced by heroin withdrawal." *Neuroreport* 29.8 (2018): 678-684.

# FA006 снижает симптомы отмены морфина

## Эффект FA006 на вызванную отменой гиперальгезию и аллодинию у крыс



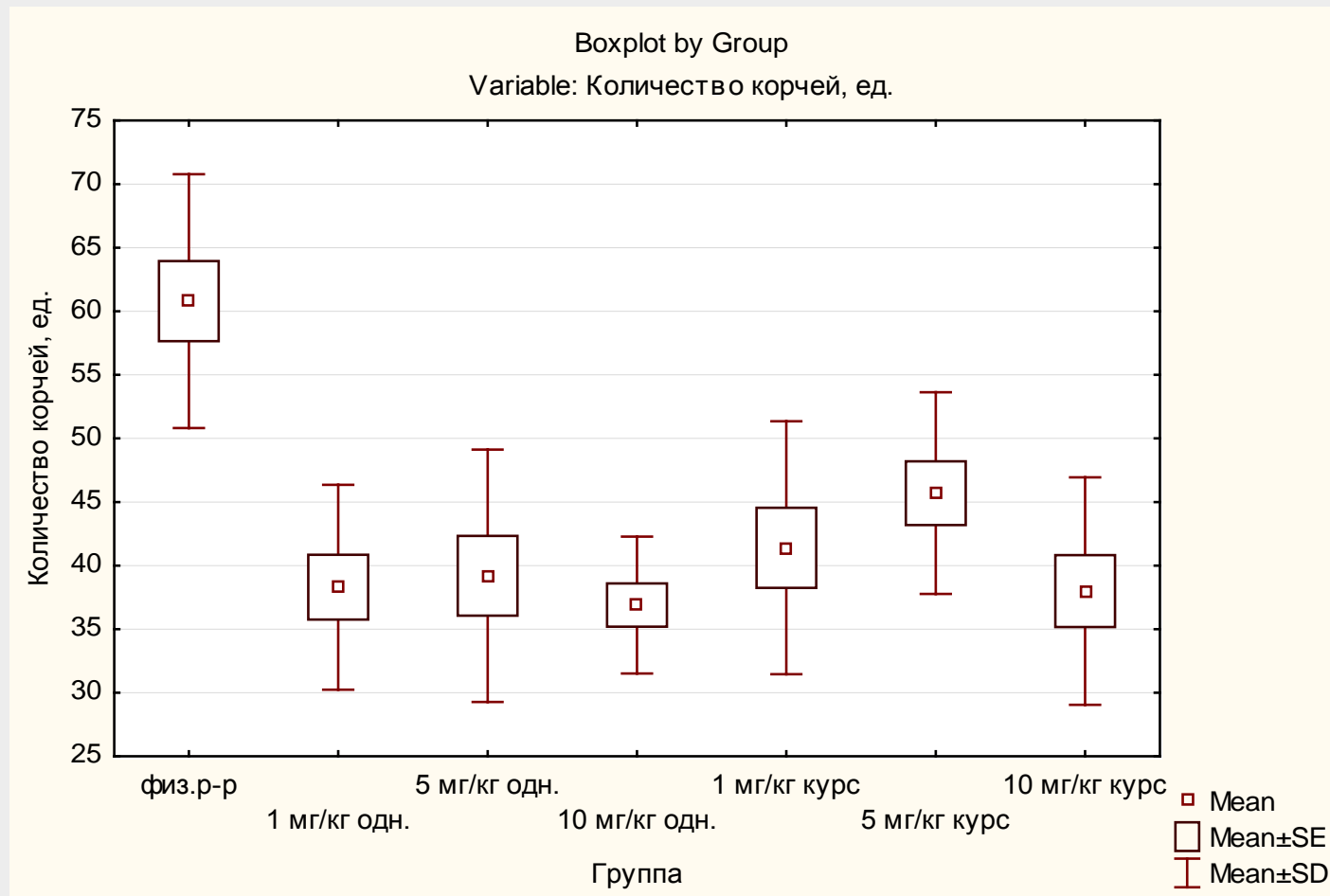
Эффект FA006 и джефапиксанта на порог тактильной чувствительности после отмены морфина



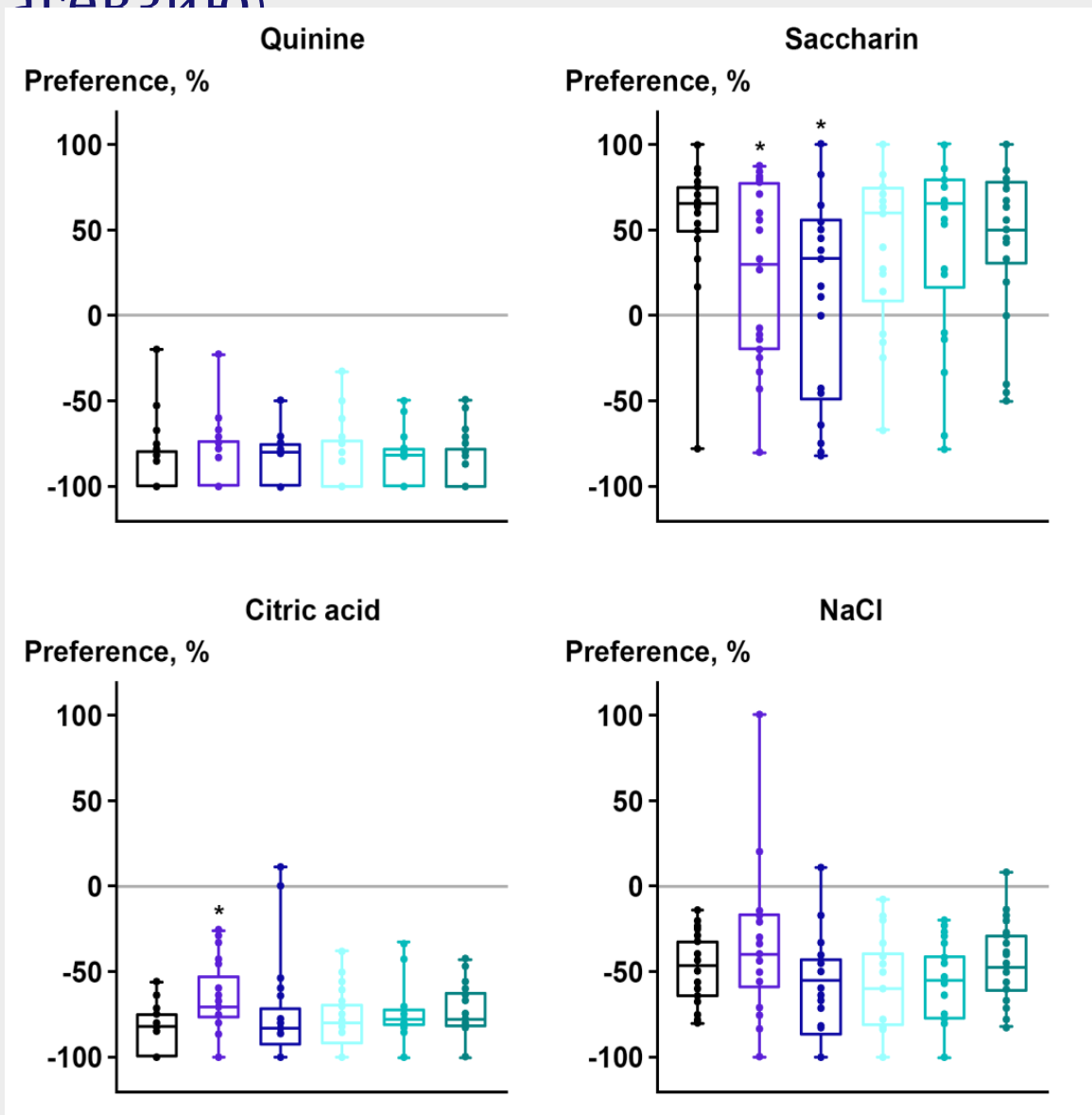
Эффект FA006 и джефапиксанта на латентный период в «подошвенном тесте» термальной чувствительности после отмены морфина

# FA006 не вызывает толерантности при многократном введении .анальгетики будущего в мышинной модели висцеральной боли.

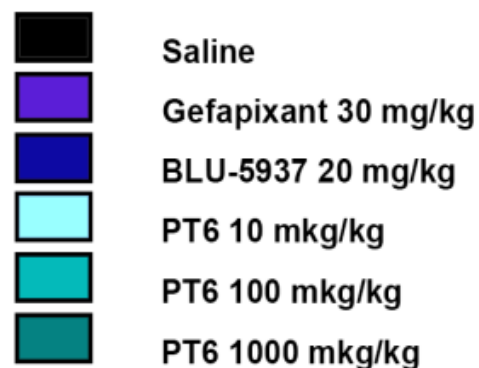
Анальгетический эффект FA006 был одинаково выражен как при однократном, так и при многократном ежедневном введении в течение 11 дней. Обезболивающее действие FA006 тестировали на модели укусных корчей у мышей либо через 6 часов после однократного введения FA006, либо через 6 часов после последней дозы 11-дневного многократного введения.



# В отличие от малых молекул, антагонистов P2X3, FA006 не изменяет чувство вкуса (не вызывает дизгевзию или агевзию)



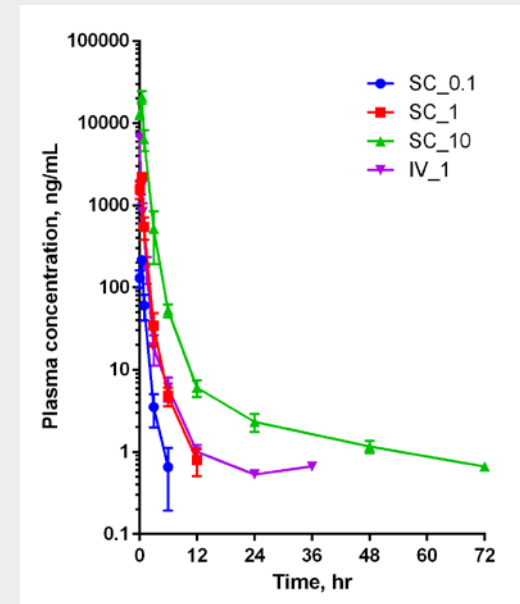
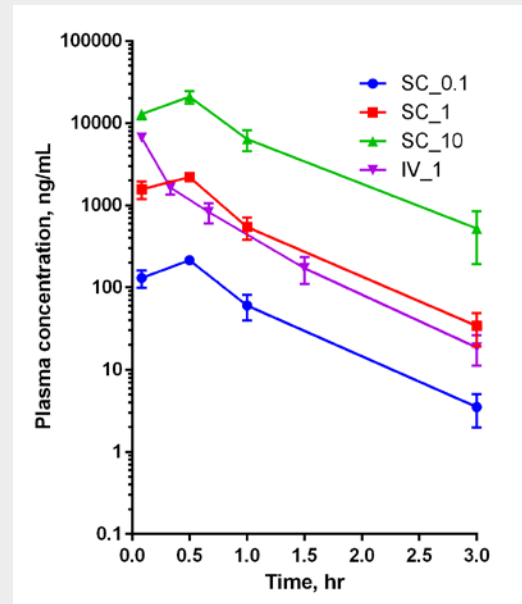
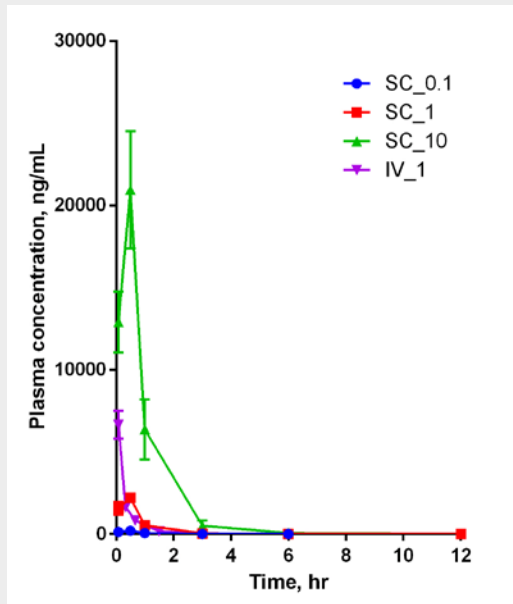
FA006/PT6 не влияет на вкусовую чувствительность. Предпочтение горьких (0,3 мМ хинина), сладких (10 мМ сахарина), кислых (10 мМ лимонной кислоты) и соленых (300 мМ NaCl) растворов, измеренных в 5-минутном тесте «двух бутылок» против воды в отдельных группах по 20 самцов, C57BL/6 мышей каждая. Перед испытанием мышам вводили 0,9% NaCl (п/к; физиологический раствор), 0,01–1 мг/кг PT6 (п/к), 30 мг/кг джефапиксанта (п/о) или 20 мг/кг VLU-5937 (в/б). \* $p < 0,05$ , критерий Тьюки.



# Фармакокинетика FA006 при 1-кратном введении мышам

.анальгетики будущего

- При п/к введении всасывание происходит быстро ( $T_{max} = 0,5$  ч), биодоступность составляет около 75%.
- Экспозиция ( $C_{max}$ , AUC) увеличивается пропорционально введенной дозе.
- Профиль ФК-кривой двухфазный: 1 фаза (до 3 часов) - быстрое снижение концентрации ( $t_{1/2} = 0,4-0,5$  часа); 2 фаза (выявляется только при максимальной дозе) - медленное снижение ( $t_{1/2} = 26,5$  ч).
- Препарат активно распределяется из центрального компартмента (плазмы) в ткани в течение обеих фаз. Объем распределения в 1 фазе превышает объем плазмы примерно в 10 раз, во 2 фазе - в 600 раз.
- Эти результаты обосновывают и подтверждают частоту дозирования в исследованиях токсичности повторных доз Q2D и предполагают введение один раз в два дня в клинических исследованиях FIIH. Это также подтверждается тем фактом, что обезболивающий или противокашлевой эффект однократного введения FA006 проявляется через 24 часа после введения дозы.



Administration route	SC			IV	
Dose, mg/kg	0,1	1	10	1	
$T_{max}$	h	0,5	0,5	0,5	n/a
$C_{max}$	ng/mL	215	2205	20948	6644
AUCinf	ng/mL*h	184	1873	19264	2512
$T_{1/2}$ (alpha)	h	0,439	0,436	0,490	0,431
$T_{1/2}$ (beta)	h	-	-	26,5	-
Vss	mL/kg	237			
Vz	mL/kg	14818			
Cl	(mL/kg)/h	398			
F	%	74,5%			



## **Оценка общей токсичности у крыс при 28-дневном введении с 14-дневным периодом восстановления.**

**Крысы Sprague-Dawley 7-10 недель обоего пола. FA006 вводили п/к в дозах 1, 3 или 9 мг/кг раз в 2 суток (режим введения, планируемый у человека) в течение 28 дней. Дополнительная группа животных получала лекарственную форму FA006 с примесями в дозе 9 мг/кг. Исследование проведено в соответствии с GLP.**

**Конечными точками: оценка смертности, клинические наблюдения, измерения массы тела, потребления пищи, температуры тела, оценку состояния ЦНС, офтальмология, биохимия крови, гематология, коагуляция и анализ мочи, измерение массы органов, макроскопическая и микроскопическая патоморфология, токсикокинетика и иммуногенность.**

**В группах, получавших изучаемые вещества, у всех животных не наблюдалось неблагоприятных изменений. В диапазоне доз 1,0-9,0 мг/кг после введения на 1-й и 27-й день увеличение  $C_{max}$  и  $AUC_{last}$  было пропорционально увеличению дозы. Не было выявлено существенной разницы между одинаковыми дозировками FA006 и FA006 с примесями в средних значениях  $C_{max}$  и  $AUC_{last}$ .**

**Изучаемые соединения обладали низкой иммуногенностью, антилекарственные антитела в низких титрах были подтверждены не более чем у 3% животных.**

**Максимальная переносимая доза (NOAEL) составляет 9 мг/кг как для FA006, так и для смеси FA006 с примесями.**

## **Оценка общей токсичности у яванских макак при 28-дневном введении с 14-дневным периодом восстановления (исследование ТК и АЛА не завершено).**

**Яванские макаки 2-7 лет обоего пола. FA006 вводили п/к в дозах 1, 3 или 9 мг/кг раз в 2 суток (режим введения, планируемый у человека) в течение 28 дней. Дополнительная группа животных получала лекарственную форму FA006 с примесями в дозе 9 мг/кг. Исследование проведено в соответствии с GLP.**

**Конечные точками: оценка смертности, клинические наблюдения, измерения массы тела, потребления пищи, температуры тела, оценку неврологического состояния, ЭКГ, дыхания, офтальмология, биохимия крови, гематология, коагуляция и анализ мочи, измерение массы органов, макроскопическая и микроскопическая патоморфология, токсикокинетика и иммуногенность.**

**Тестируемые объекты обладают удовлетворительным профилем безопасности в диапазоне доз 1 – 9 мг/кг. У всех животных не наблюдалось неблагоприятных изменений по изучавшимся конечным точкам в дозах 1 – 3 мг/кг.**

**По результатам патоморфологических исследований селезенку можно отнести к органам-мишеням для самок яванских макак, для самцов органы-мишени не установлены. По результатам клинико-лабораторных и патоморфологических исследований NOAEL для самцов и самок составила – 3 мг/кг.**

# Свойства FA006 как лекарственного кандидата

- ✓ Превосходная биодоступность при подкожном введении, потенциальное пероральное введение
- ✓ Хорошая стабильность в человеческой плазме. Структура цистинового узла обеспечивает пептиду исключительно высокую устойчивость к протеазам
- ✓ Предполагаемый режим дозирования у людей: раз в 2 дня (Q2D)
- ✓ Не проникает через гематоэнцефалический барьер
- ✓ Отсутствие НЯ на общее поведение/неврологическую функцию у грызунов и приматов
- ✓ Высокий уровень безопасности в токсикологических исследованиях у грызунов и нечеловекообразных приматов. ЛД<sub>50</sub> > 2000 мг/кг при 1-кратном введении и NOAEL 9 мг/кг и 3 мг/кг у крыс и обезьян при 28-дневном введении. Эти дозы примерно в 100 – 1500 раз выше, чем предполагаемые терапевтические дозы у человека.
- ✓ Характеристики FA006 и доказательство терапевтической концепции на животных моделях поддерживают дальнейшую клиническую разработку FA006

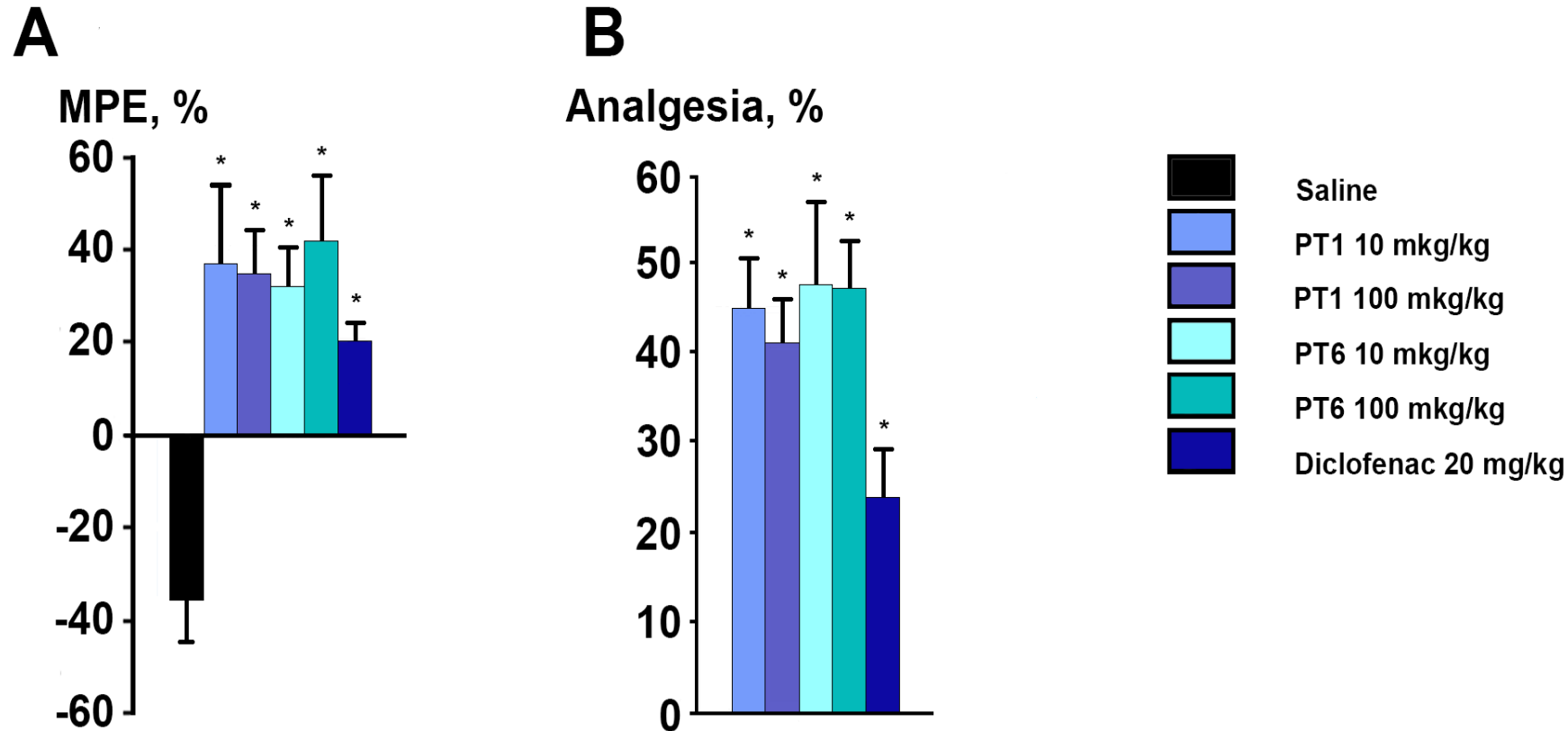
# Партнеры «Анальгетики Будущего» (CRO, CDMO)



ИБХ РАН  
 НИИФ им Закусова  
 НИИ Митоинженерии МГУ  
 ИБГ РАН  
 OCT Clinical

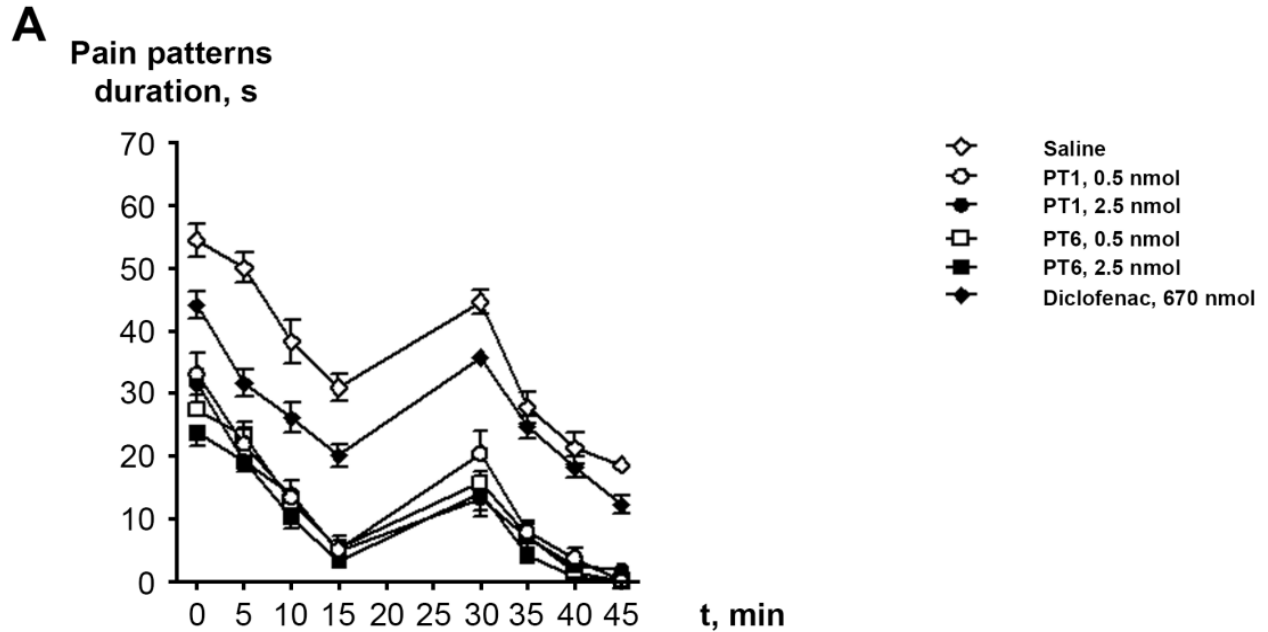
Инст. Биомед. Химии  
 НИИ Иммунологии ФМБА





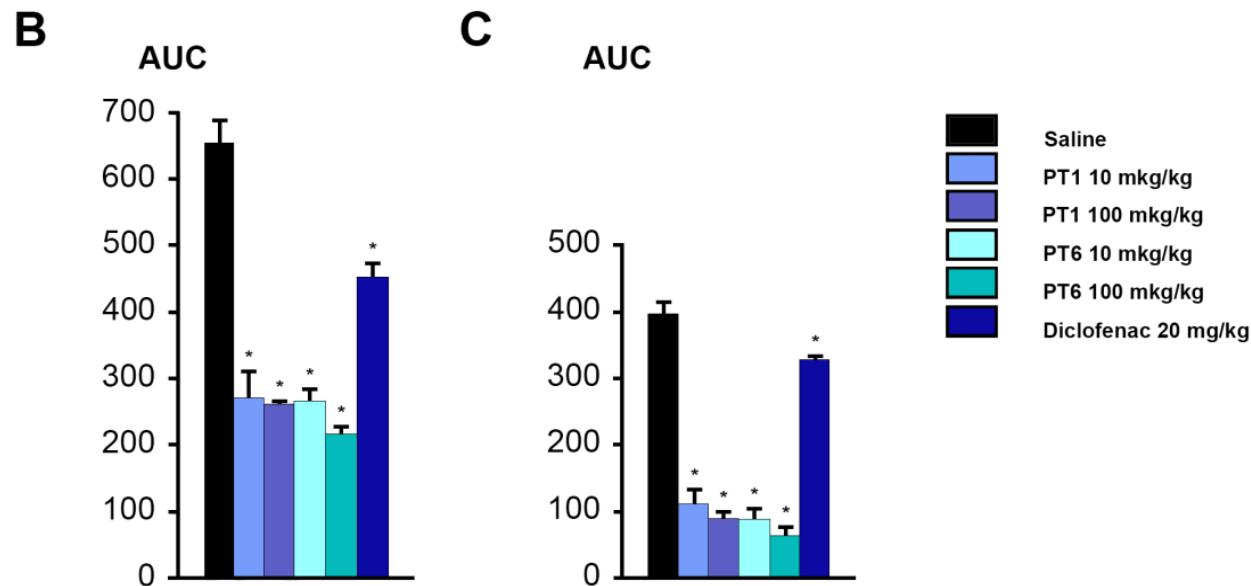
Analgesic effect of PT6, PT1, and diclofenac in the CFA-induced inflammatory pain model (A) and acetic acid-induced visceral pain model (B). Bars are color-coded. \*p < 0.05.

*PT1 is a related to PT6/FA006 peptide. PT6 is its smaller, drug-like optimized version*

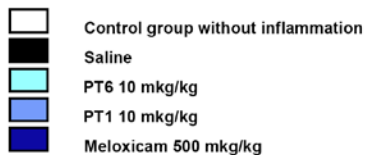
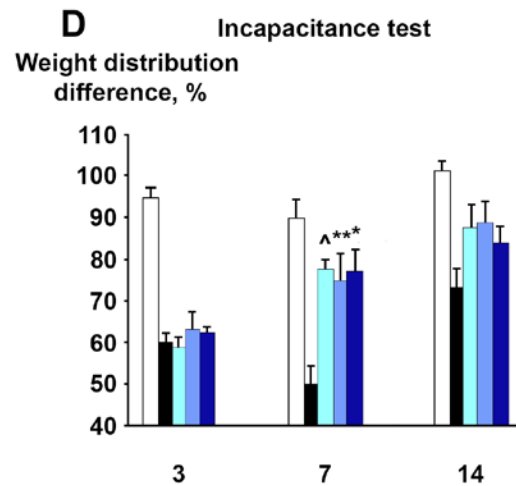
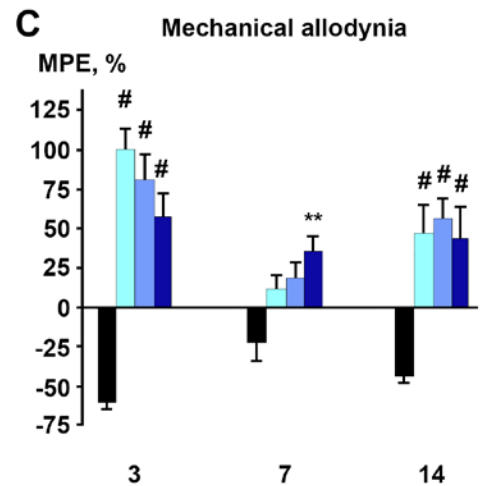
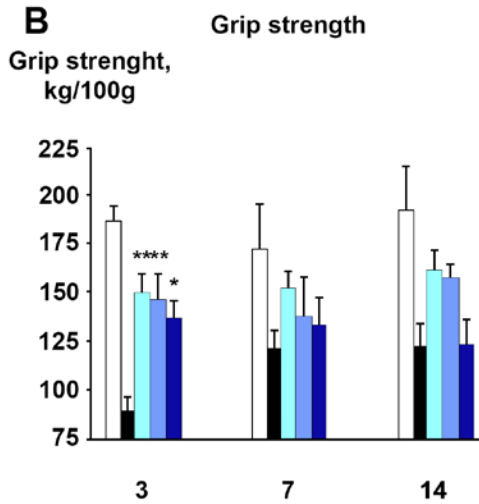
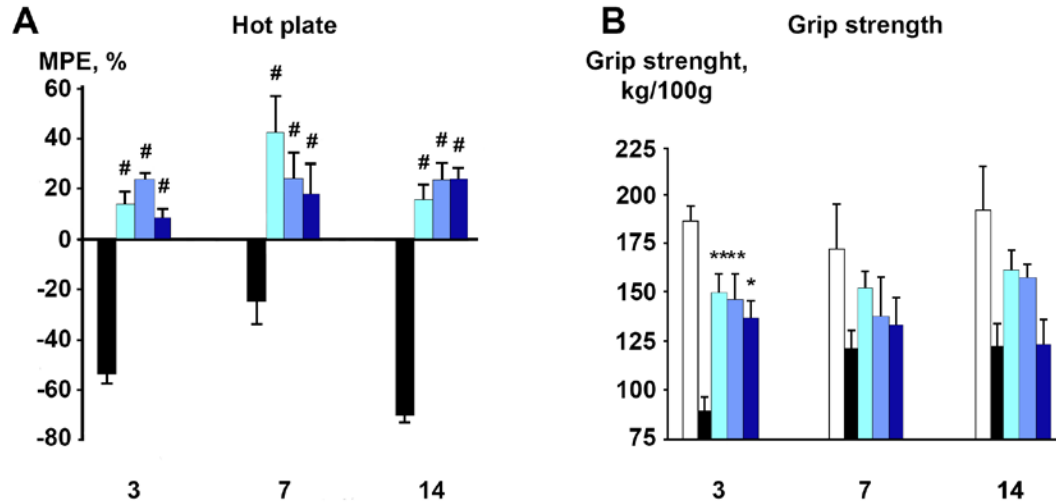


Analgesic effect of PT6, PT1, and diclofenac in the formalin-induced nociception test.

(A) The time course of 2.5% formalin-induced flinching behavior in rats treated with saline, PT1 (0.25 or 0.5 nmol/paw), PT6 (0.25 or 0.5 nmol/paw) or diclofenac (670 nmol/paw) followed by formalin injection into the right hind paw (50  $\mu$ l).



(B, C) The area under the duration of pain patterns against the time curve (AUC) observed during phase 1 (B) and phase 2 (C). \* $p < 0.05$  vs. saline values.



## Analgesic effect of PT6, PT1, and meloxicam in the MIA-induced osteoarthritis model.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ^ $p < 0.001$ , # $p < 0.0001$  vs. the corresponding time-point in the MIA+saline group, two-way analysis of variance (ANOVA-2) and Dunnett's post-hoc test.

(A) Reversal of thermal hyperalgesia (%MPE) in the hot-plate test.

(B) Hind paw grip strength (g) adjusted to 100 g of body weight.

(C) Hind paw withdrawal threshold in the von Frey allodynia test normalized to the mean value of threshold in the non-MIA group (%MPE).

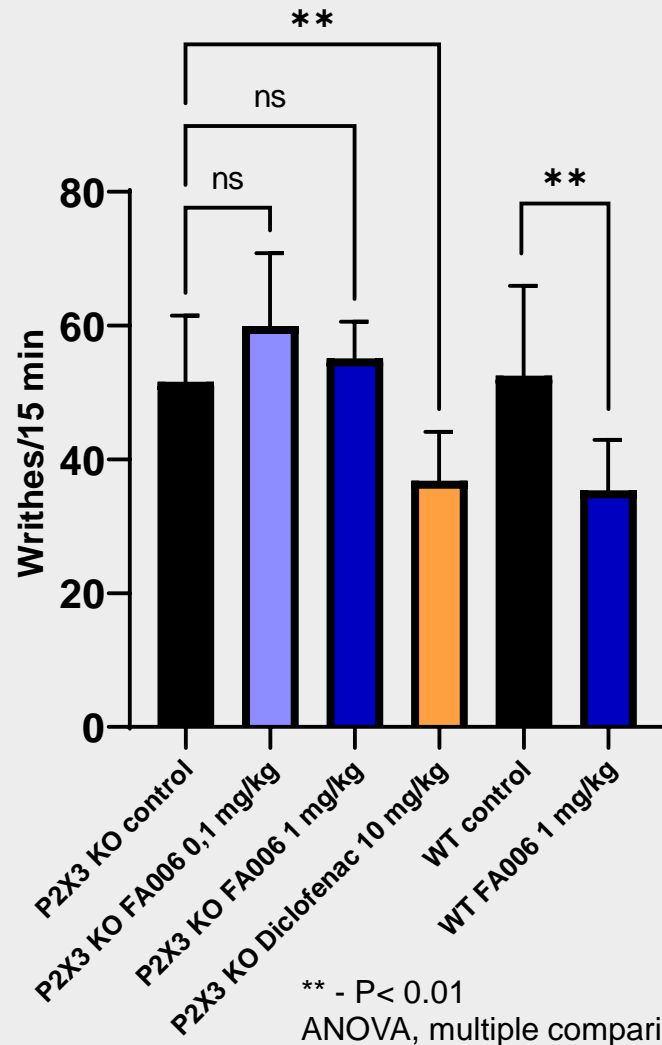
(D) Hind paw weight distribution (g) normalized to the 100% value of non-injured paw.

PT6/FA006 significantly reduced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in the MIA-induced osteoarthritis model. It also facilitated the recovery of the grip strength of the inflamed limb and reduced the difference in weight distribution between the inflamed and healthy limbs at different time points. In all cases PT6/FA006 was at least 50 times more potent than meloxicam, which is routinely used in therapy of osteoarthritis [Richards et al, 2019] and even opioid drugs produced similar effects at doses  $>1$  mg/kg [Garcia et al., 2019]

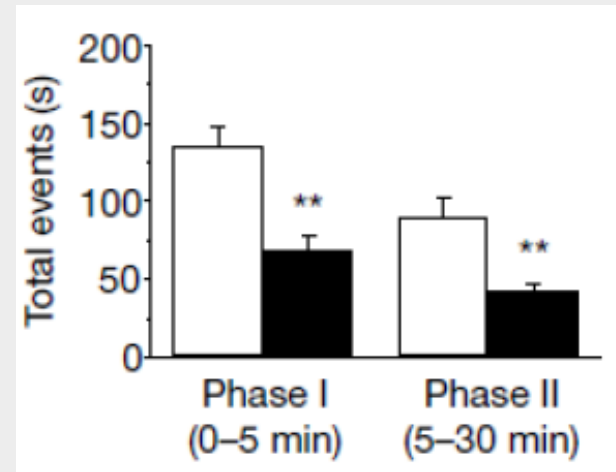
P2X3 receptor is the ultimate target for FA006.

In P2X3R<sup>-/-</sup> (knockout) mice the analgesic activity of FA006 is completely lost

Analgesic activity of FA006 in visceral pain model (acetic acid induced writhes) in wild type (WT) mice and in mice with null-allele (knockout, KO) of *P2X3R*

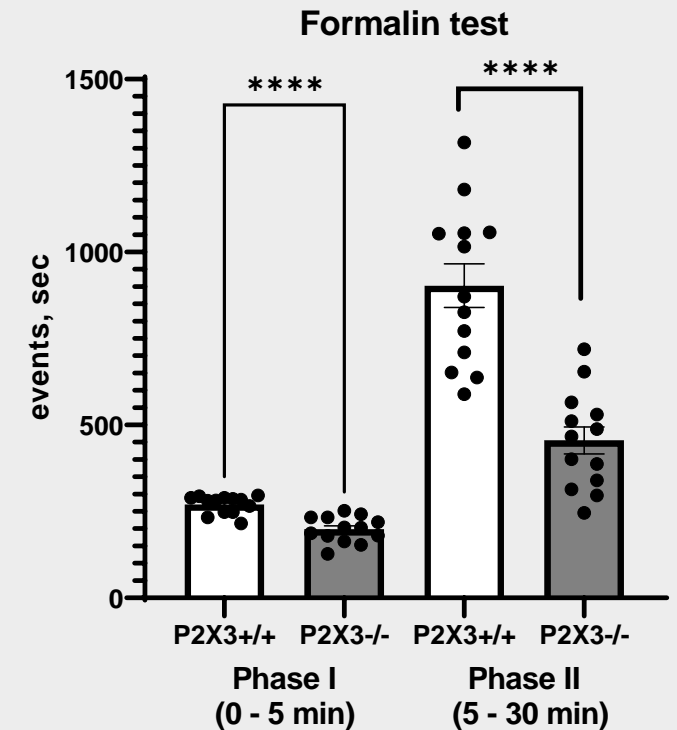


In P2X3R<sup>-/-</sup> (knockout) mice the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> phase of formalin-induced pain behavior is significantly attenuated comparing to the wild type, consistent with previous work (Cockayne et al, *Nature*, 2000)



From *Cockayne et al, 2005*

Formalin-induced behavioural responses. Hindpaw-lifting and licking responses in 3±4-month-old male P2X3<sup>+/+</sup> (open bars) and P2X3<sup>-/-</sup> (filled bars) mice (n = 10) following intraplantar injection of 5% formalin in a total volume of 20 µl. \*\* - P < 0.01 for P2X3<sup>+/+</sup> and P2X3<sup>-/-</sup> mice; Student's t-test.



Future Analgesics' own data on P2X3 KO

\*\* - P < 0.0001 for P2X3<sup>+/+</sup> and P2X3<sup>-/-</sup> mice; Student's t-test