

О. А. Деева, М. А. Яркова, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева*, С. Б. Середенин

ДИПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ TSPO

ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8.
* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

Представлен обзор собственных работ по синтезу и изучению фармакологических свойств дипептидных лигандов транслокаторного белка TSPO. Соединения сконструированы на основе оригинальной химико-фармакологической стратегии дизайна коротких пептидных препаратов, подобных известным лекарственным средствам. Рассматриваются два ряда дипептидных лигандов TSPO — замещенные триптофанил-изолейцины и замещенные триптофанил-лейцины. Приводятся данные об их анксиолитической активности и предполагаемых молекулярных механизмах действия соединений-лидеров, связь структуры и анксиолитической активности в ряду их аналогов. Описываются фармакофорные элементы, необходимые для проявления анксиолитического эффекта этих соединений. Формулируется гипотеза о структуре эндогенного лиганда TSPO.

Ключевые слова: дипептиды; лиганды TSPO; дизайн; анксиолитическая активность; фармакологический ингибиторный анализ.

Строение, функции и механизм действия TSPO

Транслокаторный белок (18 кДа, TSPO) в течение ряда лет рассматривается в качестве мишени для разработки быстродействующих анксиолитических препаратов [1, 2]. Изначально известный как периферический бензодиазепиновый рецептор (peripheral benzodiazepine receptor, PBR), с 2006 года стал обозначаться как транслокаторный белок в свете нового понимания его строения и функций [3].

TSPO (человека, мыши, крысы, бычий и овечий) — обогащенный триптофаном белок, состоящий из 169 аминокислотных остатков [4–6]. В 2014 г. впервые была определена 3D-структура TSPO мыши (mTSPO) в комплексе с классическим лигандом PK11195 методом ЯМР-спектроскопии (идентификатор в Protein Data Bank: 2MGY) (рис. 1) [7].

Трехмерная структура комплекса mTSPO-PK11195 содержит 5 трансмембранных спиралей (ТМ), которые расположены в следующем порядке: ТМ1–ТМ2–ТМ5–ТМ4–ТМ3 (по часовой стрелке), с гидрофобной полостью в центре. При этом в комплексе mTSPO-PK11195 сайт связывания PK11195 располагается между спиралью ТМ-1 и ТМ-2 и включает следующие аминокислотные остатки: Ala23, Val26, Leu49, Ala50, Ile52, Trp107, Ala110, Leu114, Ala147 и Leu150 (рис. 1) [7].

К физиологическим функциям TSPO относят перенос холестерина от внешней к внутренней мембране митохондрий, что рассматривается в качестве лимитирующей стадии в синтезе нейростероидов [8–11]. Ферментативная биотрансформация холестерина в прегненолон происходит на внутренней мембране митохондрий, а затем прегненолон после транспорта в эндоплазматический ретикулум превращается в конеч-

ные нейростероиды — аллопрегненолон, тетрагидродеоксикортикостерон [12]. Последние имеют собственный сайт связывания на ГАМК_A-рецепторе [13, 14].

Эндогенные лиганды TSPO

В качестве эндогенных лигандов TSPO идентифицированы холестерин, порфирины и некоторые нейропептиды, названные эндозепинами.

Биологическое значение связывания порфиринов с TSPO неясно, предложена роль в регуляции образования гема и продукции активных форм кислорода. Низкие уровни свободного гема могут активировать TSPO и высвобождать АТФ в митохондриях [15, 16]. Наибольшим сродством обладают протопорфирин IX ($K_i = 14,5 \pm 10,7$ нМ), дейтеропорфирин IX ($K_i = 31,3 \pm 2$ нМ) и гемин ($K_i = 40,6 \pm 13,7$ нМ) [17, 18].

Холестерин рядом исследователей рассматривается как ключевой лиганд с наномолярным сродством к TSPO ($K_d < 10$ нМ) [19]. Известно, что сайт связывания холестерина расположен в CRAC-домене (cholesterol recognition amino acid consensus, аминокислотный участок, распознающий холестерин) спирали ТМ-5 [8, 9].

К числу эндогенных лигандов TSPO отнесён ингибитор связывания диазепама (DBI), полипептид массой 9 кДа, который был открыт в 1983 г. как белок, ингибирующий связывание бензодиазепинов с ГАМК_A-рецептором [20]. Основные посттрансляционные продукты DBI — октадеканейропептид DBI_{33–50} (octadecaneuropeptide, ODN) и триаконтатетрапейропептид DBI_{17–50} (triakontatetrapeptide, TTN) также обладают сродством к TSPO [21]. Известно, что их места связывания совпадают с местами связывания прототипного лиганда PK11195 [22].

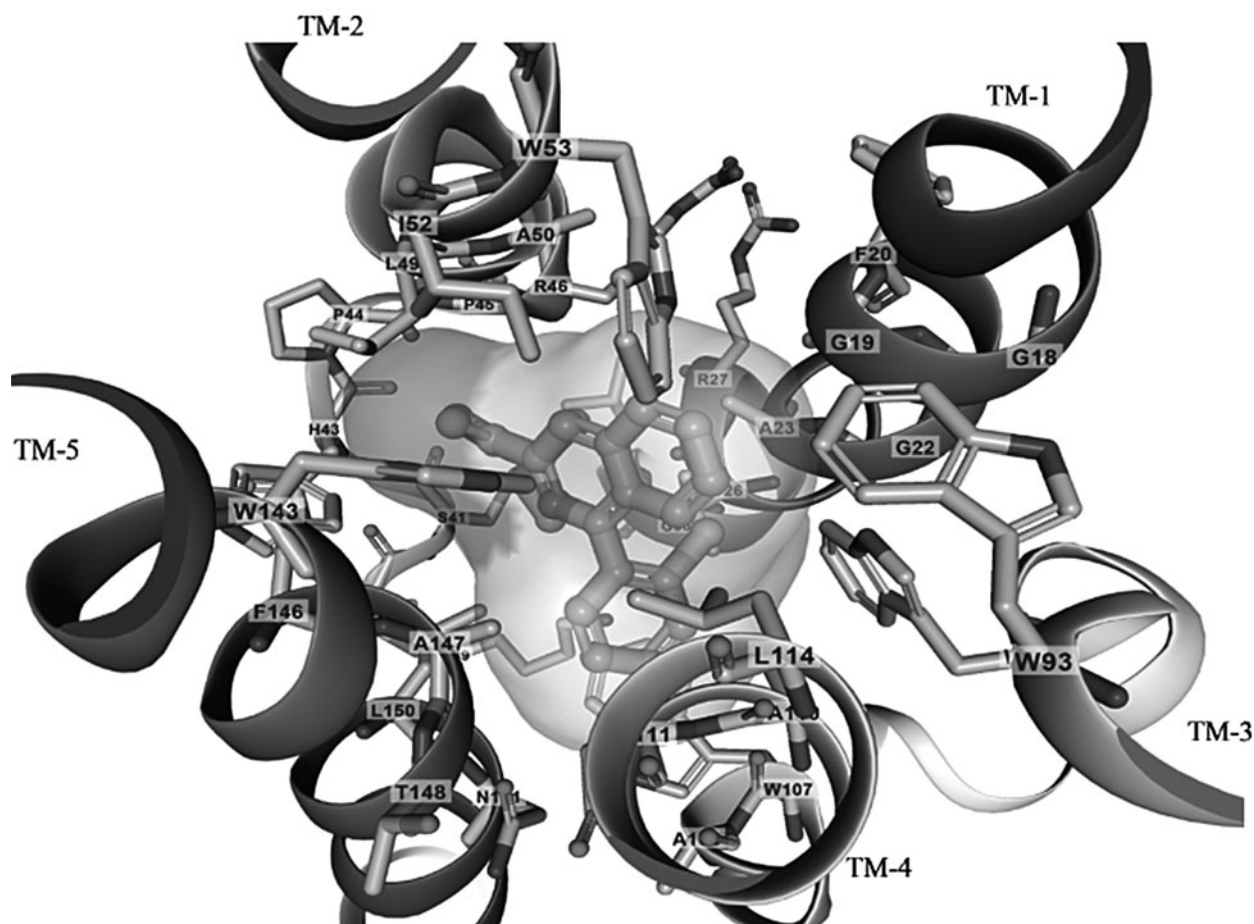


Рис. 1. Положение PK11195 в центральном сайте связывания комплекса mTSPO-PK11195, TM-1 – TM-5 — спиральные домены (взято из [7]).

В 2001 г. в тканях грызунов и человека, содержащих TSPO, установлен еще один эндогенный белковый лиганд TSPO, белок массой 52 кДа, получивший название “ассоциированный с ПБР (периферический бензодиазепиновый рецептор) протеин” (PBR-associated protein, PAP7) [23]. Показано, что PAP7 включен в белковый комплекс, необходимый для транспорта холестерина к внутренней мембране митохондрии [24].

Синтетические лиганды TSPO

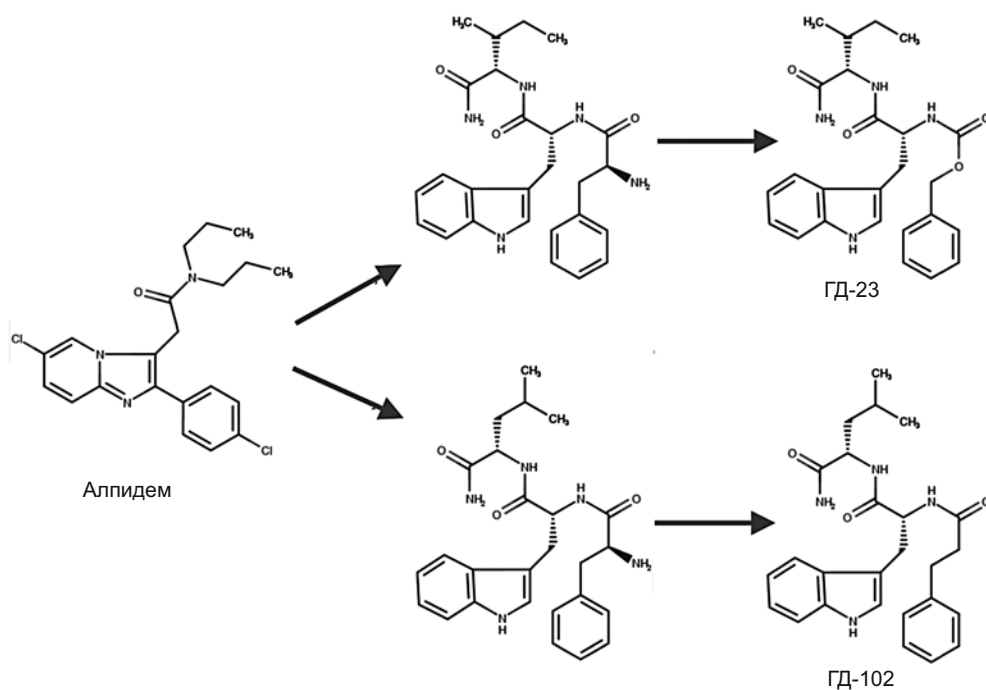
В настоящее время получено большое число синтетических лигандов TSPO, относящихся к различным химическим классам [25 – 27], в число которых входят бензодиазепины (Ro 5-4864) [28], изохинолиновые карбоксамиды (PK11195) [29], бензотиазепины (THIA-4i), бензоксазепины (OXA-11a), производные индола (FGIN-1-27) [30], имидазопиридины (алпидем) [31], производные феноксифенил-ацетамида (DAA1097, DAA1106) [32], пиразолопиримидины (DPA-713) [33], а также пирролпиразины (ГМЛ-1, ГМЛ-3) [34]. Следует отметить, что несмотря на высокое сродство к TSPO, некоторые из этих лигандов взаимодействуют с другими рецепторами, поэтому нельзя исключать их независимое от TSPO или комплексное действие.

Поиск эффективных фармакологических средств на основе структур гетероциклической природы продол-

жается в рамках стратегии повышения избирательности действия и снижения выраженности побочных эффектов [26, 27].

Нами развивается направление, связанное с переходом от гетероциклической к пептидной основе, в рамках которого логично ожидать снижение токсичности и большей селективности. Пептидные лиганды TSPO были получены в НИИ фармакологии имени В. В. Заскусова с применением оригинального подхода к созданию дипептидных лекарств, обозначаемая в литературе как “drug-based peptide design” (DBPD) [35 – 37]. В основе использованной стратегии лежит гипотеза о том, что многие лекарственные препараты гетероциклической структуры представляют собой топологические аналоги биологически активных эндогенных пептидов. Поскольку большинство гетероциклических лекарственных веществ имеет молекулярный вес 300 – 400 Да, то соответствующие им пептидные аналоги представляют собой ди- или трипептиды. С фармакологических позиций особый интерес представляют замещенные дипептиды (трипептоидные аналоги), имеющие физиологические системы активного транспорта через биологические барьеры. А малое число связей — мишеней протеаз определяет их энзиматическую стабильность, имеются примеры фармакотерапевтического применения внутрь [38, 39].

Схема 1



Конструирование дипептидных лигандов TSPO.

Конструирование пептидных лигандов TSPO [42 – 44]

Используя стратегию DBPD, были впервые получены дипептидные лиганды TSPO. В качестве непептидного прототипа использовали алпидем, лиганд TSPO из группы имидазо[1,2-*a*]пиридинов. Этот препарат разрабатывался в компании Synthélabo (Франция) [31] в качестве анксиолитического средства. Алпидем связывается с TSPO с наномолярной аффинностью ($K_i = 0,5 - 7$ нМ) [40], стимулирует нейростероидогенез и обнаруживает анксиолитическую активность [41]. Алпидем содержит в себе два ароматических ядра, фенильное и бициклическое азотсодержащее, и разветвленную алифатическую цепь, которые могут имитировать боковые радикалы фенилаланина, триптофана и изолейцина (или лейцина), соответственно. Кроме того, в структуру алпидема входит амидная группа, возможный прототип пептидной связи. Интересно отметить, что большинство известных синтетических лигандов TSPO имеют структуру, сходную с алпидемом. На этом основании молекула Алпидема была проимитирована нами трипептидными последовательностями -Phe-Trp-Ile- и -Phe-Trp-Leu- [42], и были сконструированы два соединения — амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина (лабораторный шифр ГД-23) [43, 44] и амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (лабораторный шифр ГД-102) [42, 44] (схема 1).

В сконструированных замещенных дипептидах сохраняли неизменными остатки триптофана и изолейцина (или лейцина), которые располагали в такой последовательности: -Trp-X- (где X = Ile для ГД-23 или X = Leu для ГД-102). Остаток фенилаланина заменяли

биоизоостером: изоморфными ему бензилоксикарбонильной (для ГД-23) или фенилпропионильной (для ГД-102) группами (см. схему 1), благодаря чему в замещенных дипептидах, как и в алпидеме, отсутствовала *N*-концевая заряженная аминогруппа. Следующий за Ile (Leu) возможный остаток представляли амидной группой, благодаря чему, как и в алпидеме, сохранялось отсутствие отрицательно заряженной карбоксильной группы [42].

Молекулярный докинг [42, 45]

Для подтверждения лигандных свойств проводили сравнительное молекулярное докирование сконструированных дипептидов ГД-23 и ГД-102 в активный центр TSPO. При этом использовали пространственную структуру мышинового рецептора TSPO в комплексе с лигандом PK11195, полученную при помощи ЯМР [7], представленную в базе данных PDB (PDB ID: 2MGY). Расчёты выполняли в режиме полужесткого докинга с помощью программы Glide Schrodinger. Для анализа выбрали комплексы с наименьшей расчётной энергией связывания [42, 45].

По данным докирования, молекула алпидема расположена в зоне связывания TSPO таким образом, что бициклическое ароматическое ядро имеет Ван-дер-Ваальсовы контакты с остатками Ala23, Val26, Pro40, Pro45, Arg46. Фенильное ядро имеет контакты с Ala23, Trp95, Leu114, Trp143. Алифатический участок молекулы алпидема взаимодействует с Ala23, Val26, Trp95, Trp107, Ala110, Ala147, Leu150 (рис. 2, *a*).

Молекула ГД-23 докируется в зону связывания TSPO так, что боковая группа триптофана (индолный фрагмент) окружена остатками Ala23, Leu49, Trp95, Leu114, Trp143, Ala147. Фенильный фрагмент бензи-

Схема 3

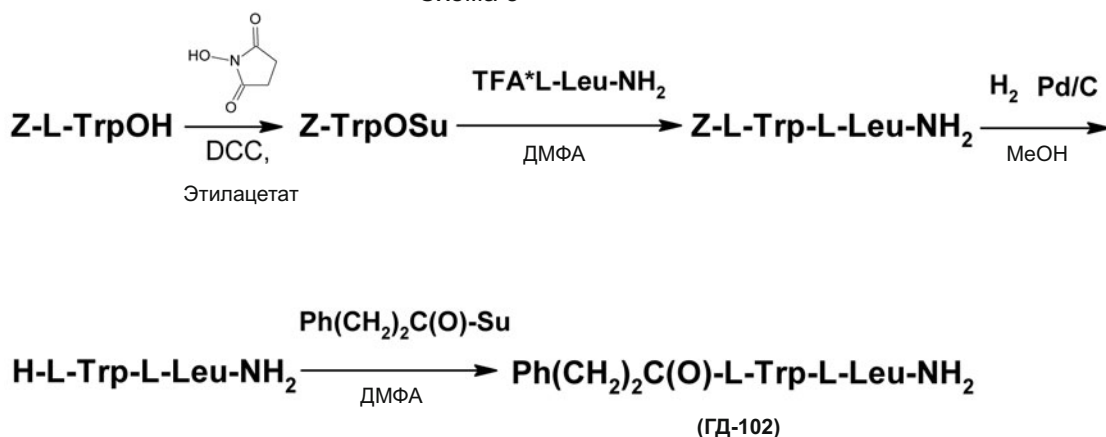


Схема синтеза дипептидного лиганда TSPO ГД-102 – амида фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина.

тем — на один из периферических кольцевых секторов белой круглой арены установки ОП диаметром 1 м с белыми бортами высотой 50 см. Арена разбита на сектора 4 концентрическими окружностями и 16 радиусами. Освещение осуществляется бестеневыми лампами, расположенными в метре над поверхностью поля. Уровень освещенности составляет 3000 люкс. Наблюдение над животными проводится в течение 3 мин с фиксацией числа пересеченных сторон секторов на периферии (ПА), в центральных областях (ЦА), числа заходов в центр (Ц), числа вертикальных стоек (ВА). Суммарное число пересеченных сторон кольцевых секторов вместе с числом вертикальных стоек обозначается как общая двигательная активность (ОДА). О наличии анксиолитического эффекта судят по увеличению ОДА у тестируемых животных [49].

Тест ПКЛ рассматривается в настоящее время наиболее адекватным для выявления анксиолитической активности. Сущность метода заключается в анализе соотношения реакции страха животных в незнакомом пространстве и высоты, с одной стороны, и исследовательской активности в новой обстановке, с другой. Результаты представляются в виде отношения времени пребывания мышей в открытых рукавах (T_0) к суммарному времени пребывания животных в открытых и закрытых рукавах ($T_0 + T_3$) лабиринта в процентах:

$$T(\%) = T_0 / (T_0 + T_3) \cdot 100 \%,$$

относительное время пребывания в открытых рукавах.

Также оценивается отношение числа заходов в открытые рукава (N_0) к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава ($N_0 + N_3$) в процентах, которое рассчитывают по формуле [50]:

$$N(\%) = N_0 / (N_0 + N_3) \cdot 100 \%,$$

относительное число заходов в открытые рукава.

Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 [43]

В тесте ОП у мышей BALB/c было выявлено, что дипептид ГД-23 в интервале доз 0,05 – 1,0 мг/кг внут-

рибрюшинно (в/б) обладал анксиолитической активностью. Максимальный эффект достигался в дозе 0,1 мг/кг, в которой ОДА животных увеличивалась в 2,7 раза ($p < 0,001$) (рис. 3). Дозозависимый эффект имел куполообразную форму, что характерно для пептидов.

Важно, что дипептид ГД-23 сохранял анксиолитическую активность и при пероральном введении в дозах 0,1 – 5,0 мг/кг, с максимальным эффектом в дозе 5,0 мг/кг (рис. 4).

В тесте ПКЛ дипептид ГД-23 также продемонстрировал анксиолитический эффект на мышах CD1 в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг в/б, достоверно ($p < 0,05$) уменьшая относительное время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта [44]. В дозах 0,1 и 5,0 мг/кг вещество было неактивно.

К механизму действия дипептида ГД-23 [43, 44, 51]

Введение специфического лиганда TSPO, антагониста РК11195 (*N*-метил-*N*-(1-метил-пропил)-амида 1-(2-хлорфенил)изохинолин-3-карбоновой кислоты), за полчаса до введения ГД-23 полностью блокировало анксиолитический эффект последнего в тесте ПКЛ на мышах CD1. Сам РК11195 не изменял процент време-

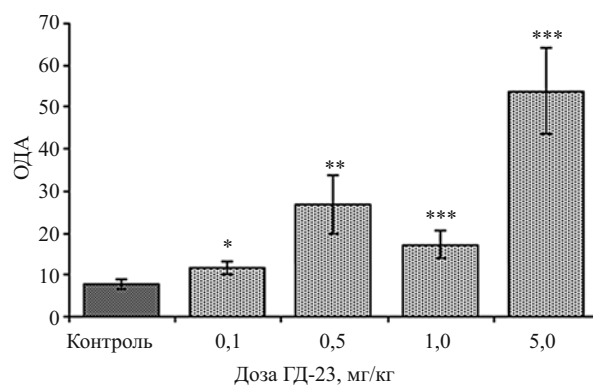


Рис. 3. Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 в тесте "Открытое поле" у мышей BALB/c при внутривенном введении. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой "Контроль" согласно критерию Манна – Уитни.

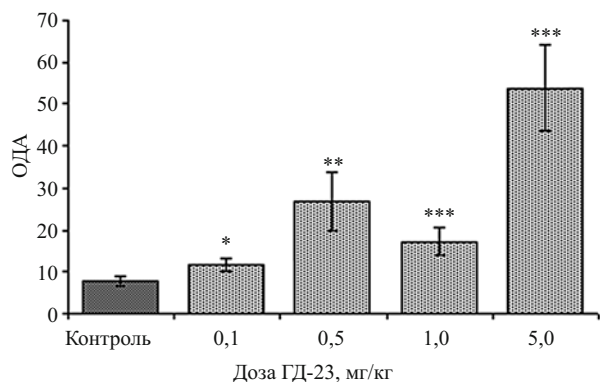


Рис. 4. Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 в тесте “Открытое поле” у мышей BALB/c при пероральном введении. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с группой “Контроль” согласно критерию Манна – Уитни.

ни нахождения в открытых рукавах и частоту заходов в открытые рукава лабиринта. Анализатор не влиял на анксиолитический эффект препарата сравнения Диазепам (рис. 5). Эти данные подтверждают зависимость анксиолитического эффекта ГД-23 от взаимодействия с сайтом связывания РК11195 на TSPO [43, 44].

С использованием ингибиторов двух ключевых ферментов синтеза нейростероидов из холестерина финастерида (селективного ингибитора 5 α -редуктазы) и трилостана (селективного ингибитора 3- α гидроксистероиддегидрогеназы) была доказана зависимость анксиолитического эффекта ГД-23 от нейростероидогенеза. Трилостан и финастерид каждый вводили в дозе 10 мг/кг (подкожно) за 30 мин до введения ГД-23. Ингибиторы полностью блокировали анксиолитический эффект ГД-23 в тесте ПКЛ на мышях CD1 и не влияли на анксиолитический эффект Диазепама (рис. 6) [51, 44].

На основании полученных данных сделано заключение, что дипептид ГД-23 обладает анксиолитической активностью, и его эффект опосредован взаимодействием с активным центром TSPO.

Анксиолитическая активность дипептида ГД-102 [42, 45]

Диапазон эффективных доз для дипептида ГД-102 в тесте ОП составлял 0,01 – 0,1 мг/кг внутрибрюшинно. При этом максимальный эффект достигался в дозе 0,05 мг/кг, в которой ОДА животных увеличивалась в 3 раза по сравнению с контролем. В интервале доз 0,5 – 5,0 мг/кг соединение было неактивно (рис. 7).

Также в тесте ПКЛ в диапазоне доз 0,1 – 0,5 мг/кг при внутрибрюшинном введении дипептид ГД-102 демонстрировал достоверный ($p < 0,05$) анксиолитический эффект как по относительному времени пребывания в открытых рукавах, так и по относительному числу заходов в открытые рукава лабиринта. Максимальный эффект по обоим показателям достигался в дозе 0,5 мг/кг (рис. 8).

К механизму действия дипептида ГД-102 [43]

Лигандные свойства ГД-102 к TSPO доказаны методом фармакологического ингибиторного анализа с ис-

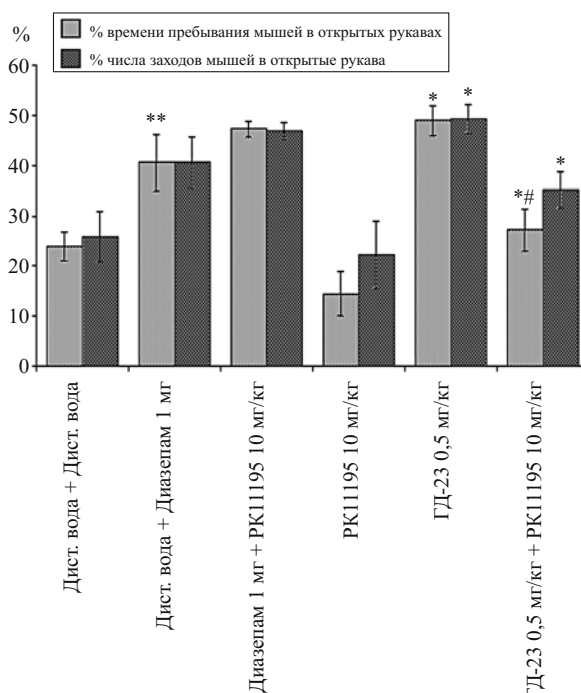


Рис. 5. Влияние специфического ингибитора TSPO РК11195 на анксиолитический эффект дипептида ГД-23 и препарата сравнения Диазепам в тесте ПКЛ у мышей CD1 (i.p.). Данные представлены в виде среднего арифметического; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с группой “Контроль” согласно критерию Манна – Уитни; # $p < 0,05$ – достоверные различия между группами “КИ + ГД-23 (0,5 мг/кг)” и “РК11195 (10,0 мг/кг) + ГД-23 (0,5 мг/кг)” согласно критерию Манна – Уитни. Число животных в каждой группе $n = 8$.

пользованием специфического антагониста TSPO, РК11195. Предварительное введение РК11195 за полчаса до ГД-102 полностью блокировало анксиолитический эффект последнего (рис. 9).

Таким образом, дипептид ГД-102 обладал анксиолитическим эффектом в двух поведенческих тестах на мышях, ОП и ПКЛ, и его эффект опосредован взаимодействием с TSPO.

Связь структуры и анксиолитической активности в ряду дипептидных лигандов TSPO

Анксиолитическая активность аналогов дипептида ГД-23 в тесте ОП [44]

Для выявления зависимости анксиолитической активности от структуры дипептидного лиганда синтезирован и изучен в тесте ОП на мышях BALB/c ряд аналогов дипептида ГД-23 [44]. Показана зависимость эффекта от конфигурации аминокислотных остатков: D,L-диастереомер (Z-D-Trp-L-Ile-NH₂, ГД-25) был неактивен, а L,D-диастереомер (Z-L-Trp-D-Ile-NH₂, ГД-69) имел тенденцию к обратному эффекту.

Замена амидной группы при С-конце на метиламид (Z-L-Trp-L-Ile-NHCH₃, ГД-33) приводила к снижению эффекта, причем достоверный эффект наблюдался только в дозе 1 мг/кг. Метилловый эфир (Z-L-Trp-L-Ile-OSCH₃, ГД-30) и соединение со свободной карбоксильной группой (Z-L-Trp-L-Ile-OH, ГД-32) анксиолитическим эффектом не обладали. В ряду N-фенилалкано-

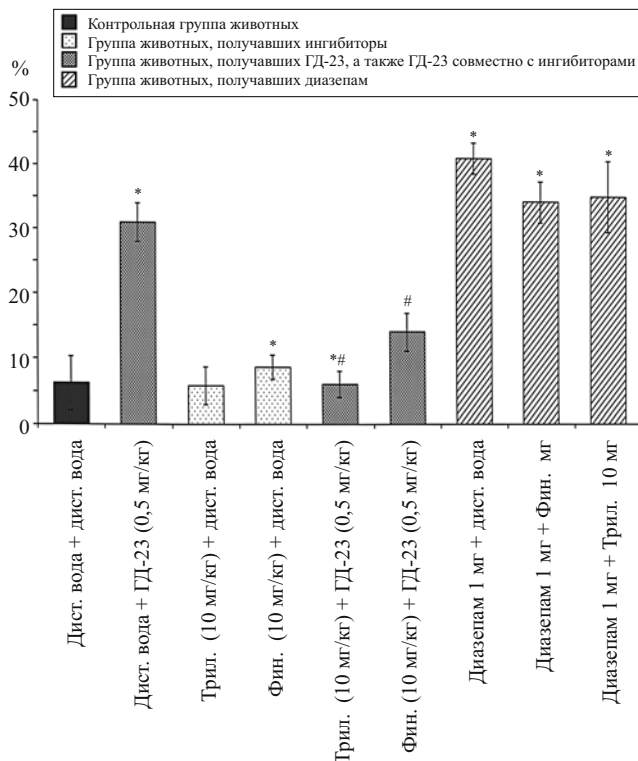


Рис. 6. Влияние ингибиторов стероидогенеза трилостана и финастерида на анксиолитический эффект дипептида ГД-23 в сравнении с Диазепамом в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах CD1 по проценту времени пребывания животных в открытых рукавах. * $p < 0,005$ – относительно контроля, # $p < 0,005$ относительно ГД-23, согласно критерию Манна – Уитни.

илзамещенных аналогов дипептида ГД-23 с различной длиной алканоильного остатка общей формулы $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Ile-NH}_2$, где $n = 1, 2, 5$ (ГД-36, ГД-57, ГД-28, соответственно) анксиолитической активностью обладало только соединение ГД-57, амид фенилпропионил-L-триптофанил-L-изолейцина. Это говорит о важности расстояния между двумя ароматическими ядрами, фенильным и индольным.

Для выявления роли боковых групп аминокислотных остатков в дипептиде получили глициновые аналоги ГД-23, в которых каждый из аминокислотных остатков был поочередно заменен на глицин: амид *N*-карбобензоксиглицил-L-изолейцина (ГД-56) и амид *N*-карбобензоксиглицил-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-56) неактивен, а у амида *N*-карбобензоксиглицил-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-39) эффект снижался по дозам.

Таким образом, наибольшую активность в синтезированном ряду дипептидов проявило соединение ГД-57, содержащее незамещенную амидную группу на *C*-конце пептида — остаток фенилпропионовой кислоты при аминогруппе триптофана. При этом расстояние между фенильным фрагментом и индольным радикалом триптофана составляет 7 σ -связей, что, по-видимому, важно для проявления дипептидным лигандом анксиолитической активности. Это мо-

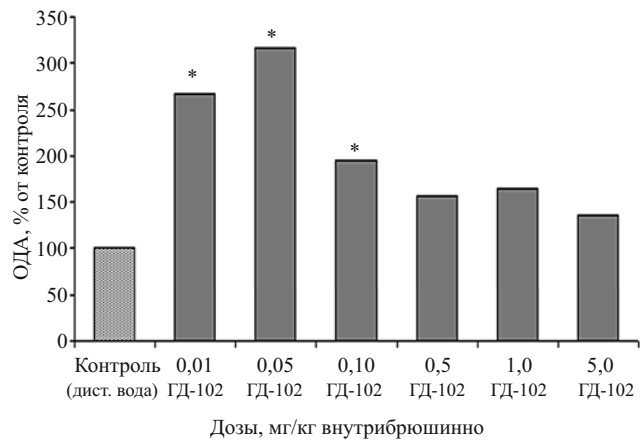


Рис. 7. Анксиолитическая активность ГД-102 у мышей BALB/c в тесте ОП со световой вспышкой (i.p.), * $p < 0,05$ – достоверные различия с контролем согласно U-критерию Манна – Уитни.

жет быть связано с тем, что остаток фенилпропионовой кислоты является биоизомером фенилаланина. Показана важность наличия обоих аминокислотных остатков, триптофана и изолейцина, в структуре лиганда в их природной L-конфигурации.

Анксиолитическая активность аналогов дипептида ГД-102 в тесте ОП [42]

Также для выявления зависимости анксиолитической активности от структуры дипептидного лиганда синтезирован и изучен в тесте ОП на мышах BALB/c ряд аналогов дипептида ГД-102 [42]. Показана зависимость эффекта от хиральности аминокислотных остатков: D,L-диастереомер ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-D-Trp-L-Leu-NH}_2$, ГД-128) был достоверно активен только в дозе 0,5 мг/кг (эффект 157 % по сравнению с контролем), а L,D-диастереомер ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-D-Leu-NH}_2$, ГД-123) имел обратный эффект.

Для изучения влияния природы *C*-концевого заместителя в структуре дипептида ГД-102 синтезированы следующие соединения: метиловый эфир фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Leu-OCH}_3$, ГД-116), метиламид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Leu-NHCH}_3$, ГД-119), *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцин ($\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Leu-OH}$, ГД-118). Соединения были исследованы на наличие анксиолитической активности в тесте ОП со световой вспышкой на мышах линии BALB/c в интервале доз 0,1 – 1,0 мг/кг. ГД-118 достоверно ($p < 0,5$) обладало анксиолитической активностью в указанном интервале доз, достоверно увеличивая общую двигательную активность животных на 84 % в дозе 0,1 мг/кг, на 54 % в дозе 0,5 мг/кг и на 113 % в дозе 1,0 мг/кг. Соединение, представляющее собой метиловый эфир (ГД-116), также обладало анксиолитической активностью в указанном интервале доз, достоверно увеличивая общую двигательную активность животных на 133 % в дозе 0,1 мг/кг, на 91 % в дозе 0,5 мг/кг и на 65 % в дозе 1,0 мг/кг. Замещенный амид (ГД-119) в указанном интервале доз проявлял анксиолитическую активность,

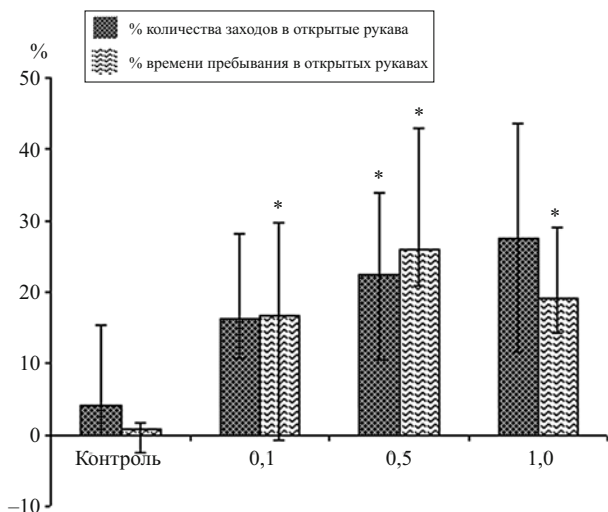


Рис. 8. Влияние дипептида ГД-102 при однократном внутрибрюшинном введении на поведение мышей ICR в тесте ПКЛ. Данные представлены в виде арифметического среднего, * $p < 0,05$ – достоверные различия с контролем согласно U -критерию Манна – Уитни.

достоверно увеличивая общую двигательную активность животных на 77 % в дозе 0,1 мг/кг, на 142 % в дозе 0,5 мг/кг и на 186 % в дозе 1,0 мг/кг.

Для выявления природы N -замещения были синтезированы аналоги с укороченной цепью фенилалканольного заместителя — $\text{PhCH}_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Leu-NH}_2$ (ГД-107), а также соединение с удлиненной цепью, но не содержащее ароматического ядра — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-Leu-NH}_2$ (ГД-108). Дипептид ГД-107 обладал анксиолитической активностью в исследованном интервале доз, достоверно увеличивая общую двигательную активность животных на 103 % в дозе 0,1 мг/кг, на 189 % в дозе 0,5 мг/кг и на 74 % в дозе 1,0 мг/кг. Дипептид ГД-108 достоверно обладал анксиолитической активностью в дозах 0,5 (157 %) и 1,0 мг/кг (216 %). Таким образом, показана важность наличия фенильного ядра в N -ацильном заместителе при аминокислотном остатке триптофана в структуре дипептидного лиганда TSPO.

Для выявления роли боковых радикалов аминокислот был проведен “глициновый скан” соединения ГД-102 по двум аминокислотам: для этого были получены два глициновых аналога соединения ГД-102, в которых каждый из аминокислотных остатков последовательно был заменен на остаток глицина (соединения $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-Gly-L-LeuNH}_2$ и $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-GlyNH}_2$, ГД-129 и ГД-125 соответственно). Было показано наличие достоверного ($p < 0,05$) анксиолитического эффекта у соединения ГД-125 в дозах 0,5 (171 % по сравнению с контролем) и 1,0 мг/кг (134 %). У соединения ГД-129 достоверный ($p < 0,05$) анксиолитический эффект выявлен в дозе 0,5 мг/кг (158 %), в то время как для первоначального ГД-102 выявлен эффект в дозе 0,01 мг/кг 267 %, в дозе 0,05 мг/кг — 316 %, в дозе 0,1 мг/кг — 195 %, в дозе 0,5 мг/кг — 157 %, в дозе 1,0 мг/кг — 164 %. Таким образом, заме-

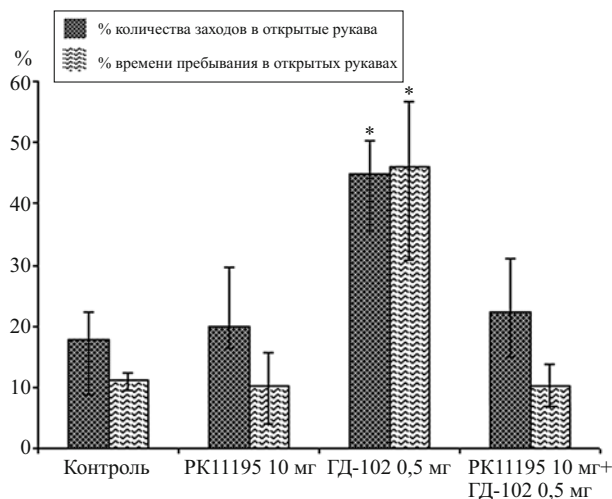


Рис. 9. Влияние специфического ингибитора TSPO (PK1195) на анксиолитический эффект соединения ГД-102 у мышей ICR при внутрибрюшинном введении. Данные представлены в виде арифметического среднего (среднеквадратичного отклонения), * $p < 0,05$ – достоверные различия с контролем согласно U -критерию Манна – Уитни.

на каждой из аминокислот на глицин приводила к снижению выраженности анксиолитического эффекта.

Анксиолитическая активность аналогов дипептида ГД-102 с обратной последовательностью аминокислотных остатков [52]

В развитие исследований по уточнению фармакофорного элемента дипептидного лиганда TSPO синтезированы соединения с обратной последовательности аминокислотных остатков по сравнению с ГД-102 и изучена связь структуры и анксиолитической активности в этом ряду [52].

Получены следующие дипептиды: амид N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана (ГД-136), отличающийся от ГД-102 только обратной последовательностью аминокислотных остатков, амид N -фенилацетил- L -лейцил- L -триптофана (ГД-141) с укороченным на одну CH_2 -группу ацильным радикалом, метиловый эфир N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана (ГД-138), N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофан (ГД-139), метиламид N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана (ГД-140).

Наиболее активным в тесте ОП оказался дипептид ГД-140 (метиламид N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана), обладавший анксиолитическим действием в дозах 0,1, 0,5, 1,0 мг/кг в/б. Менее активными были дипептиды ГД-139 (N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофан) и ГД-141 (амид N -фенилацетил- L -лейцил- L -триптофана). Дипептид ГД-138 (метиловый эфир N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана) в дозе 0,1 мг/кг снижал двигательную активность животных. Активность соединения ГД-136 (амид N -фенилпропионил- L -лейцил- L -триптофана) в интервале исследуемых доз (0,1 – 5,0 мг/кг) не зарегистрирована. Следовательно, последовательность аминокислотных остатков Trp-Leu для дипептидных ли-

гандов TSPO предпочтительнее последовательности Leu-Trp.

Таким образом, анализ данных скрининга анксиолитической активности дипептидных лигандов TSPO показал, что для проявления эффекта необходимы следующие фармакофорные элементы: аминокислотные остатки триптофана и лейцина в их природной L-конфигурации, ароматический алканоильный радикал при N-конце дипептида, незамещенная амидная группа при C-конце дипептида, расстояние между фенильным фрагментом и индолильным радикалом триптофана, равное 7 σ -связям [42, 44], а также выявлена предпочтительная последовательность аминокислотных остатков Trp-Leu [52].

Заключение

С использованием оригинальной стратегии пептидного дизайна был получен новый класс системно-активных дипептидных триптофансодержащих лигандов TSPO. Среди синтезированных соединений замещенные дипептиды Z-L-Trp-L-Ile-NH₂ (ГД-23) и N-фенилпропионил-L-Trp-L-Leu-NH₂ (ГД-102) обладали выраженной анксиолитической активностью в тестах Открытого поля и Приподнятого крестообразного лабиринта. Дипептид ГД-23 имел достоверный анксиолитический эффект как при внутривенном (в интервале доз 0,05 – 1,0 мг/кг), так и при пероральном (в интервале доз 0,1 – 5,0 мг/кг) введении. Дипептид ГД-102 проявлял анксиолитическую активность в двух поведенческих тестах на мышах в интервале доз 0,01 – 0,5 мг/кг в/б. Лигандные свойства к TSPO дипептидов ГД-23 и ГД-102 были подтверждены как методом молекулярного докинга, показавшего комплементарность обоих дипептидов связывающему центру рецептора, так и методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием специфического антагониста TSPO — соединения РК11195, а в случае ГД-23 — подтвержден и нейростероидный механизм действия с использованием ингибиторов нейростероидогенеза.

Изучение связи структуры и активности в ряду дипептидных лигандов позволило определить фармакофорные элементы, необходимые для проявления анксиолитического эффекта, — показана важность природной L-конфигурации аминокислотных остатков в структуре дипептида, наличия незамещенной амидной группы при C-конце и фенилалканоильного остатка при аминогруппе триптофана. Установлено, что необходимой последовательностью аминокислотных остатков является фрагмент Trp-Leu. Таким образом, общий фармакофор представляет собой амид гидрофобного замещенного дипептида. Полученные данные позволили предположить, что эндогенный лиганд TSPO является природным пептидом, в структуру которого входит фрагмент -Phe-Trp-Leu-NH₂. Анализ базы данных пептидов EROP-Moscow (А. А. Замятин) [53] показал, что из 19327 пептидов только два содержат последовательность Phe-Trp-Leu:

Gastrin/cholecystokinin like peptide D1 (SEGGQDFWL) и Natalisin 2 (TLVMGSDGAFWLTRz). Эти пептиды могут быть предшественниками активного трипептида Phe-Trp-Leu.

Таким образом, фармакологически активные дипептидные лиганды TSPO можно рекомендовать как основу для создания новой группы быстродействующих анксиолитиков с нейростероидным механизмом действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Costa, E. Da Pozzo, C. Martini, *Curr. Topics in Med. Chem.*, **12**(4), 270 – 285 (2012).
2. B. Costa, E. Da Pozzo, C. Martini, *Biochem. Pharmacol.*, **177**, 114015 (2020).
3. V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte, et al., *Trends in Pharm. Sci.*, **27**(8), 402 – 409 (2006).
4. Y. Z. Guo, R. C. Kalathur, Q. Liu, et al., *Science*, **347**(6221), 551 – 555 (2015).
5. S. Murail, J. C. Robert, Y. M. Coïc, et al., *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes*, **1778**(6), 1375 – 1381 (2008).
6. Y. Xia, K. Ledwitch, G. Kuenze, et al., *J. Biomol. NMR*, **73**(6), 347 – 364 (2019).
7. L. Jaremko, M. Jaremko, K. Giller, et al., *Science*, **343**, 1363 – 1366 (2014).
8. H. Li, V. Papadopoulos, *Endocrinol.*, **139**(12), 4991 – 4997 (1998).
9. N. Jamin, J. M. Neumann, M. A. Ostuni, et al., *Mol. Endocrinol.*, **19**(3), 588 – 594 (2005).
10. R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, et al., *Nature Rev. / Drug Discov.*, **9**, 971 – 988 (2009).
11. J.-J. Lacapere, V. Papadopoulos, *Steroids*, **68**, 569 – 585 (2003).
12. J. Maguire, I. Mody, *J. Neurosci.*, **27**(9), 2155 – 2162 (2007).
13. R. M. Mihalek, P. K. Banerjee, E. R. Korpi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(22), 12905 – 12910 (1999).
14. W. Sieghart, *Adv. in Pharmacol.*, **54**, 231 – 263 (2006).
15. F. Li, J. Liu, Y. Zheng, et al., *Science*, **347**(6221), 555 – 558 (2015).
16. P. Gut, M. Zweckstetter, R. B. Banati, *Trends in Endocrinol. & Metabolism*, **26**(7), 349 – 356 (2015).
17. S. H. Snyder, A. Verma, R. R. Trifiletti, *FASEB J.*, **1**(4), 282 – 288 (1987).
18. A. Verma, J. S. Nye, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(8), 2256 – 2260 (1987).
19. T. Bordet, B. Buisson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**(2), 709 – 720 (2007).
20. A. Guidotti, C. M. Forchetti, M. G. Corda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**(11), 3531 – 3535 (1983).
21. P. Ferrero, M. R. Santi, B. Conti-Tronconi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(3), 827 – 831 (1986).
22. E. Slobodyansky, A. Guidotti, C. Wambebe, et al., *J. Neurochem.*, **53**(4), 1276 – 1284 (1989).
23. H. Li, B. Degahardt, D. Tobin, et al., *Mol. Endocrinol.*, **15**, 2211 – 2228 (2001).
24. J. Fan, J. Liu, M. Culty, et al., *Progr. Lipid Res.*, **49**(3), 218 – 234 (2010).
25. E. Barresi, M. Robello, B. Costa, *Eur. J. Med. Chem.*, **209**, 112924 (2021).
26. T. К_п, А. N. Пae, *Expert Opinion on Ther. Patents*, part 1, **26**(11), 1325 – 1351 (2016).
27. T. К_п, А. N. Пae, *Expert Opinion on Ther. Patents*, part 2, **26**(11), 1353 – 1366 (2016).
28. S. Giatti, M. Pesaresi, G. Cavaletti, et al., *Neuroscience*, **164**(2), 520 – 529 (2009).
29. G. Le Fur, M. L. Perrier, N. Vaucher, et al., *Life Sci.*, **32**(16), 1839 – 1847 (1983).
30. J. Guillon, M. Boulouard, V. Lelong, et al., *J. Pharmacy & Pharmacol.*, **53**(11), 1561 – 1568 (2001).
31. US Patent 4382938 A (1983).

32. S. Okuyama, S. Chaki, R. Yoshikawa, et al., *Life Sci.*, **64**, 1455 – 464 (1999).
33. M. L. James, R. R. Fulton, J. Vercoullie, et al., *J. Nucl. Medicine*, **49**(5), 814 – 822 (2008).
34. G. V. Mokrov, O. A. Deeva, T. A. Gudasheva, et al., *Bioorg. & Med. Chem.*, **23**(13), 3368 – 3378 (2015).
35. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Med. Chem.*, **41**(3), 284 – 290 (1998).
36. Т. А. Гудашева, *Изв. Академии наук. Сер. химическая*, **9**, 2012 – 2012 (2015).
37. T. A. Gudasheva, R. U. Ostrovskaya, S. B. Seredenin, *Curr. Pharm. Des.*, **24**(26), 3020 – 3027 (2018).
38. R. U. Ostrovskaya, T. K. Mirsoev, G. A. Romanova, et al., *Bull. Exp. Biol. & Med.*, **132**, 959 – 962 (2001).
39. Р. У. Островская, Н. А. Крупина, Т. А. Гудашева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **72**(5), 3 – 7 (2009).
40. S. Z. Langer, S. Arbilla, J. Benavides, et al., *Adv. in Biochem. Psychopharm.*, **46**, 61 – 72 (1990).
41. B. Zivkovic, *Synthelabo Recherche, L. E. R. S., Bagneux, France*, **23**, S. 3, 108 – 113 (1990).
42. T. A. Gudasheva, O. A. Deeva, A. S. Pantileev, et al., *Molecules*, **25**(21), 5132 (2020).
43. Т. А. Гудашева, О. А. Деева, Г. В. Мокров и др., *Докл. Академии наук*, **464**(3), 361 – 364 (2015).
44. T. A. Gudasheva, O. A. Deeva, G. V. Mokrov, et al., *Med. Chem.*, **15**(4), 383 – 399 (2019).
45. О. А. Деева, А. С. Пантлеев, И. В. Рыбина и др., *Докл. Академии наук*, **484**(2), 228 – 232 (2018).
46. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**(9), 1839 – 1842 (1964).
47. П. М. Бородин, Л. Шюлер, Д. К. Беляев, *Генетика*, **12**(12), 62 – 71 (1976).
48. С. Б. Серединин, А. А. Ведерников, *Бюл. эксп. биол. мед.*, **88**(7), 38 – 40 (1979).
49. D. Sarkar, *Clin. Psychopharmacol. & Neurosci.*, **18**(3), 341 – 351 (2020).
50. S. E. File, *Behav. Brain Res.*, **125**(1 – 2), 151 – 157 (2001).
51. Т. А. Гудашева, О. А. Деева, М. А. Яркова, С. Б. Серединин, *Докл. Академии наук*, **469**(5), 621 – 624 (2016).
52. О. А. Деева, А. С. Пантлеев, А. Г. Ребеко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **54**(6), 24 – 34 (2020); *Pharm. Chem. J.*, **54**(6), 568 – 578 (2020).
53. А. А. Замыатин, А. С. Борчиков, М. Г. Владимиров, et al., *Nucl. Acids Res.*, **34**(suppl. 1), 261 – 266 (2006).

Поступила 14.07.22

DIPEPTIDE LIGANDS OF TSPO

O. A. Deeva, M. A. Yarkova, G. V. Mokrov, T. A. Gudasheva*, and S. B. Seredenin

Research Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, 125315 Russia

* e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

The article represents the review of our own investigations of synthesis and studying the pharmacological properties of dipeptide ligands of the translocator protein (TSPO). The compounds were designed using as the basis the original chemo-pharmacological strategy of the design of short peptides which are similar to the known drugs. Two series of TSPO dipeptide ligands, substituted tryptophanyl isoleucines and substituted tryptophanyl leucines, were designed and synthesized. The data of their anxiolytic activity and the proposed molecular mechanisms of action of the leading compounds, the relationship between the structure and anxiolytic activity among their analogs are presented. The pharmacophore elements that are necessary for the manifestation of the anxiolytic effect of these compounds are described. A hypothesis about the structure of the putative endogenous TSPO ligand is formulated.

Keywords: dipeptides; TSPO ligands; design; anxiolytic activity; pharmacological inhibitory assay.