ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОРИГИНАЛЬНЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

на правах рукописи



ДЕЕВА ОЛЬГА АЛЕКСЕЕВНА

Молекулярное конструирование, синтез дипептидных лигандов транслокаторного белка (18 кДа) и анализ связи «структура-активность» в их ряду

1.4.16 - Медицинская химия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН
Гудашева Татьяна Александровна

Москва – 2026

Оглавление

Введение.....6
Глава 1. Обзор литературы……...……12
1.1. Строение транслокаторного белка TSPO.....12
1.1.1.Структура TSPO……..……...12
1.1.2. Димеризация TSPO…….…….....17
1.2. Участие TSPO в транспорте холестерина и TSPO-опосредованный нейростероидогенез.…….....18
1.3. Вовлеченность TSPO в патогенез различных заболеваний……..……..22
1.3.1. Нейродегенеративные заболевания……....….....22
1.3.2. Психические расстройства…….…..…..…...23
1.3.3. Повреждения головного мозга…….……..……24
1.3.4. Повреждения периферической нервной системы……..….....24
1.3.5. Опухоли……...….…….25
1.3.6. Офтальмологические заболевания……..……..…..26
1.4. Лиганды TSPO……..……..…….28
1.4.1.Эндогенные лиганды TSPO…….…....…….28
1.4.1.1. Холестерин…….…..28
1.4.1.2. Порфирины…….…….…28
1.4.1.3. DBI и его производные…….…..…..29
1.4.1.4. Белок PAP7 31
1.4.2. Синтетические лиганды TSPO…….…….……...…….32
1.4.2.1. Бензодиазепины…….…….……...……..32
1.4.2.2. Бензоксиазепины и бензотиоазепины…….…...…….34
1.4.2.3. Изохинолиновые карбоксамиды…….…….…...35
1.4.2.4. Алпидем и родственные структуры…….……..…..37
1.4.2.5. Производные феноксифенилацетамида…….…….…….40
1.4.2.6. Индолы…….…..…….41
1.4.2.7. Производные пуринов……...…..…..42
1.4.2.8. Стероиды……...….....….43
1.5. Лиганды TSPO в клинических исследованиях…….…….....…..44
1.6. Нейростероиды и их биологические эффекты.....47
1.6.1. Взаимодействие нейростероидов с ГАМК-ергической системой…..……..…….47
1.6.2. Применение производных нейростероидов в клинической практике..……..…..50
1.7. Влияние TSPO и его лигандов на митохондриальные процессы…….……..54

1.8. Заключение.....56
Глава 2. Результаты и их обсуждение.....58
2.1. Молекулярный дизайн и синтез N-ацил- триптофансодержащих дипептидов, потенциальных лигандов TSPO.....58
2.1.1. Дизайн.....58
2.1.2. Синтез.....66
2.1.2.1. Синтез потенциального дипептидного лиганда TSPO, амида N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23) и его стереоизомеров……...…..67
2.1.2.2. Синтез потенциального дипептидного лиганда TSPO N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102) и его стереоизомеров……..69
2.2. Выявление анксиолитической активности дипептидов ГД-23 и ГД-102…….…..…...70
2.2.1. Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой на мышах…….…..….71
2.2.2. Анксиолитическая активность дипептида ГД-102 в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой на мышах…….…..….74
2.2.3. Анксиолитическая активность дипептидов ГД-23 и ГД-102 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах ……..…….……...75
2.2.4. Изучение механизма анксиолитического действия дипептидов ГД-23 и ГД-102 с использованием метода фармакологического ингибиторного анализа…….…….…...78
2.2.4.1. Доказательство TSPO-опосредованного анксиолитического эффекта дипептида ГД-23 с использованием антагониста TSPO, соединения PK-11195…….…..…..78
2.2.4.2. Доказательство TSPO-опосредованного анксиолитического эффекта дипептида ГД-102 с использованием антагониста TSPO, соединения PK11195……..…….…….....80
2.2.4.3. Доказательство нейростероидогенезного механизма анксиолитического действия дипептида ГД-23 с использованием блокаторов синтеза нейростероидов…….…..82
2.3. Выявление ноотропной активности дипептида ГД-23 в тесте распознавания нового объекта в условиях скополаминовой амнезии у крыс. Доказательство TSPO-опосредованного ноотропного эффекта с использованием блокатора TSPO, соединения PK11195……83
2.4. Выявление антидепрессивной активности дипептида ГД-102 на мышах…….…….86
2.5. Изучение острой токсичности дипептидов ГД-23 и ГД-102 на мышах……..89
2.6. Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду потенциальных дипептидных лигандов TSPO…….…….…….....…89
2.6.1. Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-23 на мышах…….....…89

2.6.2. Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-102 на мышах…….95
2.6.3. Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-102 с обратной последовательностью аминокислотных остатков (Leu-Trp) на мышах...100
2.6.4. Синтез потенциального эндогенного трипептидного лиганда TSPO, амида L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, ГД-186……..107
2.6.5. Выявление анксиолитической активности трипептидного лиганда ГД-186 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»……...110
2.6.6. Выявление антидепрессивной активности трипептидного лиганда ГД-186 в тесте вынужденного плавания по Порсолту……..111
2.6.7. Выявление нейропротекторной активности трипептидного лиганда ГД-186 *in vitro*...112
2.7. Разработка оптимальной схемы синтеза наиболее активного дипептидного лиганда TSPO, амида N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102)……113
Глава 3. Экспериментальная часть.....123
3.1. Материалы и методы.....123
3.1.1. Исходные вещества и вспомогательные реагенты.....123
3.1.2. Аналитические методы.....124
3.2. Синтез……125
3.3. Методы молекулярного моделирования…….165
3.3.1. Стратегия конструирования дипептидных лигандов транслокаторного белка TSPO с использованием оригинального подхода Drug-Based Peptide Design……..165
3.3.2. Молекулярный докинг.....165
3.4. Изучение биологических эффектов потенциальных лигандов TSPO ……166
3.4.1. Изучение анксиолитической активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO……..166
3.4.1.1. Тест «Открытое поле со световой вспышкой»……166
3.4.1.2. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»……167
3.4.2. Изучение антидепрессивной активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO..……169
3.4.2.1. Тест вынужденного плавания по Порсолту……169
3.4.3. Изучение ноотропной активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO…...170
3.4.3.1. Тест «Распознавание нового объекта» в условиях скополаминовой амнезии……...170
3.4.4. Изучение нейропротективной активности потенциального трипептидного эндогенного лиганада TSPO, ГД-186……..172

Заключение……174
Выводы.....175
Практические рекомендации.....177
Список сокращений…….……..…..178
Список литературы.....182
Благодарности.....212

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. По данным ВОЗ, нарушения, связанные с тревожными состояниями, включающими по МКБ-10 генерализованные тревожные, фобические, панические и обсессивно-компульсивные расстройства, наблюдаются примерно у 10% населения [1]. При тревоге высок риск коморбидных психических заболеваний, в числе которых большое депрессивное расстройство. Также повышен риск соматических заболеваний, включая болевые синдромы, гипертонию, проблемы с сердечно-сосудистой системой и желудочно-кишечным трактом.

Применяющиеся в настоящее время в клинической практике анксиолитики реализуют свой эффект через различные молекулярные мишени. Например, буспирон действует преимущественно как частичный агонист 5-$НТ_{1А}$-рецепторов, прегабалин связывается с α2δ-субъединицей потенциалзависимых кальциевых каналов, гидроксизин блокирует центральные Н1-рецепторы [2]. Этифоксин аллостерически связывается с $ГАМК_А$-рецептором [3], а также усиливает синтез нейростероидов [4], которые, в свою очередь, также являются положительными модуляторами $ГАМК_А$.

Селективный небензодиазепиновый анксиолитик фабомотизол, производное меркаптобензимидазола, разработанный в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» [5, 6], проявляет выраженную анксиолитическую активность и не имеет характерных для бензодиазепиновых транквилизаторов побочных эффектов [7]. Фабомотизол действует через систему сигма-1 рецепторов и не обнаруживает прямого связывания с $ГАМК_А$ [8]. При этом он восстанавливает сниженное стрессом бензодиазепиновое связывание с модуляторными сайтами $ГАМК_А$ [9]. Однако, максимальный анксиолитический эффект достигается только спустя 6 недель после начала приёма препарата [10].

Согласно клиническим рекомендациям Минздрава РФ [11] и Международному клиническому руководству по лечению психических расстройств [12] для лечения тревожного состояния широко используются и бензодиазепиновые транквилизаторы, которые быстро снимают тревожный синдром, но их применение сопровождается многочисленными побочными явлениями, включая миорелаксацию, дневную сонливость, атаксию, ухудшение памяти, снижение концентрации внимания, лекарственную зависимость и синдром отмены [13, 14]. Разработка новых бензодиазепиновых транквилизаторов практически прекратилась к концу XX века.

Другой группой лекарственных препаратов для лечения тревожного состояния являются трициклические антидепрессанты и ингибиторы моноаминоксидазы (ИМАО). Они могут

применяться в случаях, когда симптомы имеющегося тревожного расстройства сочетаются с депрессивными симптомами [15]. Отложенность анксиолитического эффекта антидепрессантов, а также угроза обострения симптоматики остаются серьезными недостатками этой группы препаратов [16].

Вследствие вышесказанного в настоящее время актуальным является создание быстродействующего анксиолитика с принципиально новым механизмом действия и свободного от побочных эффектов бензодиазепиновых транквилизаторов.

Степень разработанности проблемы. Перспективной мишенью для создания анксиолитического препарата является 18 кДа транслокаторный белок TSPO [17]. TSPO, известный ранее под названием периферический бензодиазепиновый рецептор [18], был открыт в 1977 году [19]. TSPO экспрессируется в различных периферических тканях, богатых митохондриями и продуцирующих стероидные гормоны [20]. В центральной нервной системе TSPO в основном локализуется в глиальных клетках мозга, но также присутствует в нейронах [21].

TSPO (человека, мыши, крысы, быка и овцы) представляет собой богатый триптофаном белок, состоящий из пяти α-спиралей, интегрированных в наружную митохондриальную мембрану [22]. В 2014 году впервые была определена 3D-структура TSPO мыши (mTSPO) в комплексе с классическим лигандом PK11195 методом ЯМР-спектроскопии (PDB ID: 2MGY) [23]. TSPO способствует транспорту холестерина в митохондриальный матрикс, что является лимитирующим этапом биосинтеза нейростероидов. Холестерин метаболизируется до прегненолона, который далее превращается в другие нейростероиды, такие как аллопрегнанолон и 3-альфа-5-альфа-тетрагидродезоксикортикостерон, которые являются положительными модуляторами функции рецепторов $ГАМК_А$, оказывая тем самым анксиолитическое действие [24]. Поскольку эндогенные нейростероиды, такие как аллопрегнанолон и другие, имеют очень короткое время жизни в биологической среде [25], их прямое применение в клинике затруднено. В то же время, использование физиологического потенциала нейростероидных гормонов может быть достигнуто путем модуляции рецептора TSPO с помощью его лигандов.

На сегодняшний день известно большое число синтетических лигандов TSPO, относящихся к различным химическим классам**:** бензодиазепины, оксазепины, тиоазепины, изохинолины, имидазопиридины, феноксифенилацетамиды, производные индола и пурина и других гетероциклических структур [26, 27]. Для этих лигандов показана нейропсихотропная активность на моделях *in vivo,* например, соединение СВ-34 из группы 2-фенилимидазо[1,2-а]пиридинов проявляло выраженный антиконфликтный эффект в тесте Вогеля на крысах [28]; производное индола FGIN-1-27 предотвращало развитие неофобии [29]; соединение YL-IPA08

из группы производных пиридина проявляло антидепрессивное и анксиолитическое действие на различных моделях животных [30]. Соединение ГМЛ-1 из группы пирроло [1,2-a] пиразиновых лигандов обладало сочетанием анксиолитической, антидепрессивной и ноотропной активностей и не имело побочных эффектов бензодиазепиновых транквилизаторов [31]. Кроме того, производное бензодиазепиа, соединение Ro 5-4864 [32] обладающее анксиолитической, ноотропной и нейропротекторной активностью, и производное изохинолина, частичный агонист PK-11195 [33], стали классическим представителями лигандов TSPO, и в настоящее время используются в основном в качестве нейровизуализационных агентов и диагностических инструментов. Однако, в настоящее время не получено ни одного пептидного лиганда TSPO.

В рамках данной работы проводилось конструирование, синтез и изучение анксиолитической активности первых в своем классе лигандов TSPO дипептидной природы. Пептиды, будучи способны метаболизироваться до природных аминокислот, обладают особо низкой токсичностью. Ди- и трипептиды обладают наилучшими фармакокинетическими свойствами, так как легко проникают через биологические барьеры, включая ГЭБ [34]. Дипептиды достаточно устойчивы к энзиматическому расщеплению и могут сохранять активность при пероральном введении.

Пептидные лиганды TSPO могут быть созданы с помощью оригинальной стратегии пептидного дизайна (drug-based peptide design, DBPD), основанной на получении топологических ди- трипептидных аналогов известного непептидного лекарства [35,36], которая уже в течение многих лет успешно развивается в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» и привела к созданию таких дипептидных препаратов, как ноотроп Ноопепт, внедренный в медицинскую практику в 2006 г., анксиолитик Ранквилон, внедренный в 2025 г. и антипсихотик Дилепт, успешно прошедший 2-ю фазу клинических испытаний.

Целью работы являлось создание фармакологически активных дипептидных лигандов TSPO.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Конструирование дипептидных лигандов TSPO с помощью подхода drug-based peptide design (DBPD), который основывается на гипотезе топологического подобия некоторых непептидных лекарственных препаратов физиологически активным эндогенным пептидам, и далее верификация результатов конструирования с помощью молекулярного докинга.

2. Химический синтез сконструированных соединений и выявление анксиолитической активности у синтезированных соединений в валидированных скрининговых тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» на грызунах.

3. Синтез вариантов сконструированных дипептидных лигандов TSPO, отличающихся природой замещения по С- и N- концам, конфигурацией аминокислотных остатков (а.о.), делетированным боковым радикалом а.о., порядком а.о. в последовательности для изучения связи структуры и анксиолитической активности.

4. Выявление фармакофорных элементов дипептидных лигандов TSPO, ответственных за проявление анксиолитической активности, по результатам анализа связи «структура-активность».

5. Подтверждение лигандных свойств к TSPO наиболее активных дипептидов методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием специфического антагониста TSPO, соединения PK-11195.

6. Доказательство нейростероидогенезного механизма анксиолитического действия полученных дипептидных лигандов с использованием ингибиторов энзимов биосинтеза нейростероидов.

7. Выявление дополнительных фармакологических свойств наиболее активных соединений, включая острую токсичность, антидепрессивную и ноотропную активности.

Научная новизна. Впервые в мире получены дипептидные лиганды транслокаторного протеина TSPO, обладающие нейростероидогенезным механизмом действия. Показано, что эти дипептиды обладают спектром фармакологических активностей (анксиолитической, антидепрессивной и ноотропной), совпадающим с таковым нейростероидных гормонов. Получены свидетельства в пользу существования эндогенного пептидного лиганда TSPO, содержащего трипептидный мотив -Phe-Trp-Leu-.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены знания о связи структуры и анксиолитической активности дипептидных лигандов TSPO (зависимость активности от конфигурации а.о., от природы С-замещения и важности наличия N-фенилалканоильного радикала). Эти данные позволят ускорить получение новых анксиолитиков – лигандов TSPO.

Получены фармакологически активные при системном введении, включая пероральное, дипептидные лиганды TSPO, которые могут стать основой для создания нетоксичных быстродействующих анксиолитиков, обладающих положительной мнемотропной активностью.

Связь темы диссертации с научными планами института. Диссертация выполнена в рамках НИР ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» «Изучение механизмов эндо- и экзогенной регуляции функций центральной нервной системы. Разработка новых оригинальных нейропсихотропных средств» рег. № 01201169192, а также ГЗ на 2019-2021 гг. по теме «Разработка новых средств и методов фармакотерапии тревожных расстройств и депрессивных состояний» рег. № 0521-2019-0002, ГЗ

на 2022-2024 гг. «Создание новых химических структур – потенциальных лигандов фармакологических мишеней для лечения нервнопсихических и сердечно-сосудистых заболеваний» рег. № FGFG-2022-0005, проекта Президиума РАН «Конструирование, синтез и выявление фармакологических свойств оригинальных лигандов митохондриального транслокаторного белка TSPO», проекта РФФИ № 17-04-00861 «Дизайн, синтез и изучение анксиолитической активности дипептидных лигандов TSPO рецептора как основа для создания нового класса быстродействующих анксиолитиков».

Положения, выносимые на защиту:

1. Стратегия создания фармакологически-активных дипептидных лигандов транслокаторного белка TSPO, кандидатов в лекарственные средства, с использованием оригинального подхода Drug-Based Peptide Design и молекулярного докинга.

2 Анксиолитическая активность сконструированных дипептидов Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23) и Ph-$(CH_2)_2$-CO-L-Trp-L-Leu-NH_2 (ГД-102) при системном введении в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей.

3. TSPO-опосредованный и нейростероидогенезный механизм действия полученных дипептидных лигандов, подтвержденный фармакологическим ингибиторным анализом.

4. Зависимость анксиолитической активности дипептидных лигандов TSPO от конфигурации, последовательности, природы а.о. и природы N- и C-заместителей.

5. Наличие антидепрессивной, ноотропной активностей и отсутствие токсичности у лидерных дипептидных лигандов TSPO.

6. -L-Phe-L-Trp-L-Leu- – последовательность возможного эндогенного лиганда TSPO.

Степень достоверности и апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 33-м и 34-м Европейских пептидных симпозиумах (София 2014 и Лейпциг 2016), на 6-й Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности и психотропным средствам (Московская область 2015), на 7-м и 8-м Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Новосибирск 2015, Москва 2017), на 23-м международном симпозиуме по медицинской химии Европейской федерации медицинской химии (Салерно 2015), на 3-й и 4-й, 6-й и 7-й Всероссийских конференциях по медицинской химии с международным участием (Новосибирск-2015, Екатеринбург-2019, Волгоград-2021, Нижний Новгород-2024 и Иркутск-2026), на 6-м международном конгрессе по медицинской химии (Нанкин 2016), на 5-м съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль 2018), на 2-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва 2021).

Личный вклад. Автор работы является основным исполнителем проведенного исследования на всех этапах: сборе и анализе данных литературы по теме диссертационной

работы, проведении экспериментальной части исследования и анализе полученных результатов, формулировании выводов. При активном участии автора подготовлены все публикации по результатам работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ, из которых 11 научных статей, в том числе 10 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, 4 патента РФ, 12 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список включает 351 источников. Работа изложена на 212 страницах, содержит 68 рисунков и 17 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение 18 кДа транслокаторного белка

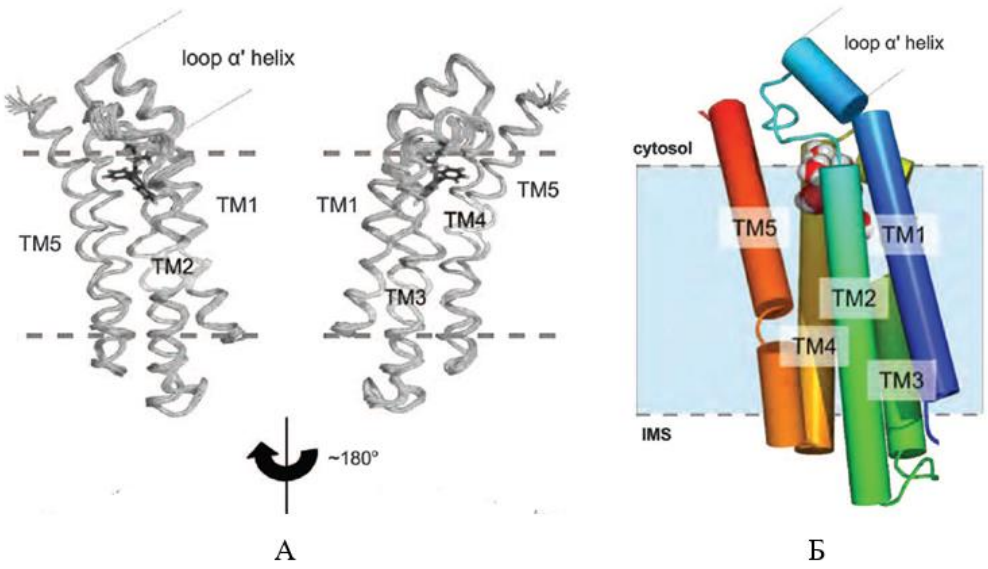
Транслокаторный белок (TSPO) − это белок массой 18 кДа, локализованный в основном на внешней мембране митохондрий. Впервые он был идентифицирован в 1977 г. в тканях почек крыс как дополнительный сайт связывания диазепама и получил название «периферический бензодиазепиновый рецептор» (ПБР или PBR) [19, 37]. В 2006 году в свете нового понимания его функций и информации о его строении ПБР был переименован в транслокаторный белок TSPO [18]. Авторы обосновывают необходимость переименования белка с учётом накопленных данных о его лигандах, локализации и функциях и сообщают о консенсусе экспертной группы: предложено использовать название translocator protein (18 kDa**)**, или сокращенно TSPO [18]. Мотивы смены термина «ПБР» на термин «TSPO» включают такие соображения как некорректность слова «бензодиазепиновый», так как этот рецептор связывает лиганды различных химических классов, а также холестерин и некоторые порфирины, экспрессия рецептора не ограничена только периферическими органами [18]. Авторы этого исследования утверждают [18], что новое название, аббревиатура «TSPO», должно относиться только к белку массой 18 кДа, который является минимальной функциональной единицей (сайтом связывания) всех известных на текущий момент лигандов ПБР, независимо от его функциональных связей с другими белками в комплексе. Учитывая все эти положения, экспертная группа пришла к консенсусу и рекомендовала переименовать ПБР в TSPO [18].

Название «Транслокаторный белок (18 кДа)» и аббревиатура «TSPO» также подходят для разных видов живых организмов, поскольку было показано, что экспрессия белка из гена крысы замещает гомолог TSPO у *Rhodobacter sphaeroides* [38]. Эта новая номенклатура была представлена и одобрена Комитетом по номенклатуре генов HUGO [39].

TSPO представлен во многих органах и тканях, преимущественно продуцирующих стероиды, таких как ткани надпочечников, гонад и головного мозга [20, 40]. В центральной нервной системе (ЦНС) TSPO экспрессируется в клетках микроглии, реактивных астроцитах, а также в нейрональных клетках, таких как нейроны обонятельной луковицы [41].

1.1.1 Структура TSPO

TSPO млекопитающих (определен для человека, мыши, крысы, быка и овцы) представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 169 [42, 43] аминокислотных остатков (а.о.), формирующих пять альфа-спиралей (ТМ-1 – ТМ-5) (рисунок 1.А) [23], которые образуют гидрофобный канал (рисунок 1.Б) [23].



А Б

Рисунок 1 А - Структура гидрофобного канала mTSPO определенная методом ЯМР-спектроскопии. Лиганд показан черным цветом. Б - Цилиндрическое представление структуры комплекса mTSPO-PK-11195c наименьшей энергией, лиганд показан в виде сфер [23]

В 2014 году [23] впервые была определена 3D-структура TSPO мыши (mTSPO) в высоком разрешении в комплексе с классическим лигандом PK11195 методом ЯМР-спектроскопии, идентификатор в базе Protein Data Bank 2MGY (рисунок 2) [23]:

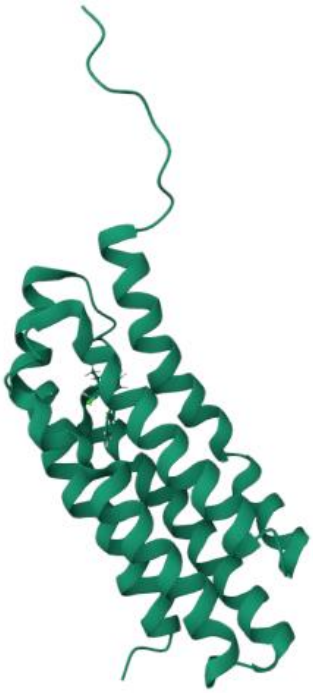


Рисунок 2 - 3D-структура TSPO мыши в высоком разрешении в комплексе с лигандом PK11195 (идентификатор в Protein Data Bank: 2MGY) [23]

В работе [23] установлено, что в структуре mTSPO имеется центральная гидрофобная полость, в которой находится сайт связывания лиганда PK11195. При этом в комплексе mTSPO-

PK11195 сайт связывания PK11195 располагается между спиралями TM-I и TM-II, и включает следующие аминокислотные остатки белка: Ala23, Val26, Leu49, Ala50, Ile52, Trp107, Ala110, Leu114, Ala147 и Leu150 (рисунок 3) [23]:

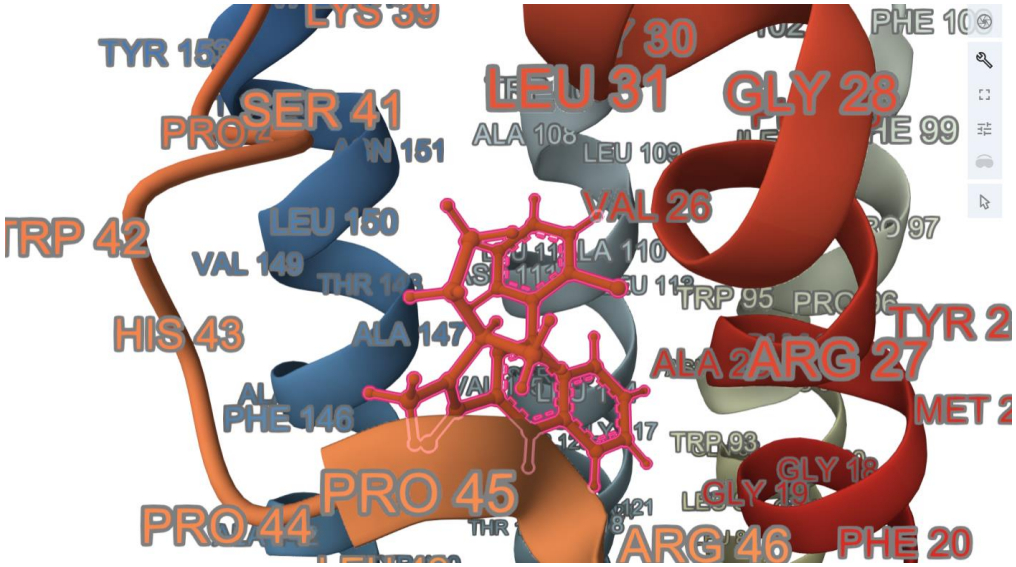


Рисунок 3 - Положение PK11195 в центральном сайте связывания комплекса mTSPO-PK11195, взято из Protein Data Bank, идентификатор 2MGY [23]

Структура mTSPO была также опубликована в отсутствии PK11195 [44], при этом было продемонстрировано, что без лиганда белок обладает существенной конформационной гибкостью, в то время как при наличии PK11195 mTSPO принимает одну устойчивую конформацию [44].

Рецептор TSPO известен как у эукариот, так и у прокариот. На рисунке 4 [43] представлены аминокислотные последовательности (а.о.) TSPO человека, мыши, крысы и бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Bacillus cereus*, где цветом отмечены совпадения в последовательностях а.о. в TSPO различных организмов с а.о. в TSPO человека:



Примечание: цифрами в конце строк указано количество аминокислотных остатков в последовательностях. Цветом выделены совпадения в последовательностях. Оранжевые линии соответствуют пяти белковым спиралям рецептора TM1-TM5.

Рисунок 4 - Аминокислотные последовательности TSPO человека, мыши, крысы и бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Bacillus cereus*, адаптировано из [43]

В 2015 году была опубликована кристаллическая структура высокого разрешения TSPO *Bacillus cereus* (BcTSPO) в комплексе с PK11195 (идентификатор в Protein Data Bank: 4RYI) (рисунок 5) [45].

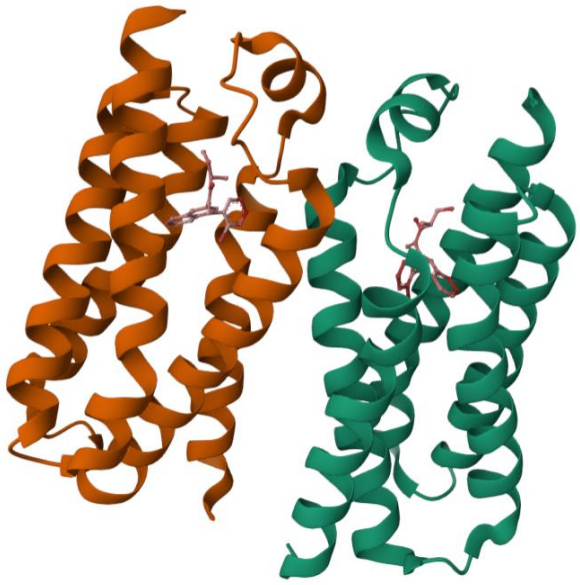


Рисунок 5 - 3D-структура TSPO бактерий *Bacillus cereus* (BcTSPO) в димерной форме, идентификатор в Protein Data Bank: 4RYI, [45]

Также была идентифицирована кристаллическая структура TSPO *Rhodobacter sphaeroides* (RsTSPO) (идентификатор в Protein Data Bank: 4UC1, 4UC2, и 4UC3) (рисунок 6) [46].

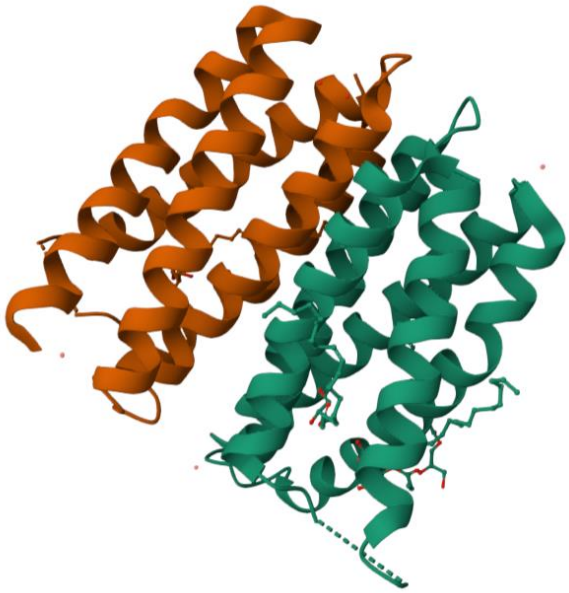


Рисунок 6 - 3D-структура TSPO бактерий *Rhodobacter sphaeroides* (RsTSPO) в димерной форме, идентификатор в Protein Data Bank: 4UC3, [46]

В 2023 году были получены первые рентгеновские структуры TSPO *Rhodobacter sphaeroides* (Rs TSPO) высокого разрешения со связанным физиологическим лигандом – гемом (рисунок 7) [47].

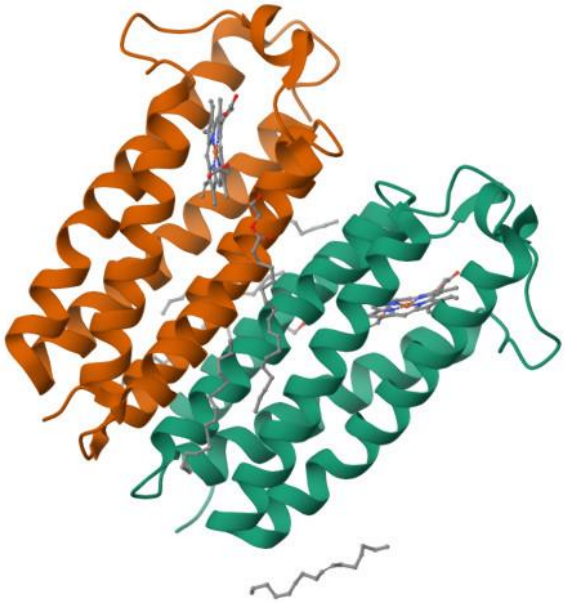


Рисунок 7 – 3D-структура TSPO бактерий *Rhodobacter sphaeroides* (RsTSPO) с мутацией A138F с двумя связанными молекулами гема, [47]

Два различных мутантных варианта TSPO (замена аланина треонином в положении 139 (A139T) и аланина фенилаланином в положении 138 (A138F)) дали хорошо дифрагирующие кристаллы, дающие структуры как апо-, так и гем-содержащих форм [47]. Авторы показали [47], что оба варианта сохраняют микромолярное сродство к гему и протопорфирину IX, однако A139T демонстрирует резко сниженную способность ускорять фотозависимый распад порфирина в присутствии кислорода. Связывание гема с одним протомером димера любого мутанта способствует образованию более жесткой структуры, как в связывающем гем протомере, так и в протомере без связанного гема, демонстрируя аллостерический ответ. Ансамблевое уточнение данных рентгеновской дифракции выявляет отдельные области измененной гибкости в ответ на связывание одного гема с димером. Вариант A139T демонстрирует в целом более жесткую структуру, что может быть связано с дополнительными водородными связями воды, захваченной в гемовом рецепторном кармане [47].

1.1.2 Димеризация TSPO

Способность TSPO образовывать гомополимеры (в основном димеры и тримеры, массой ≈40–56 кДа), по-видимому, увеличивается с повышением активности митохондрий, например, во время пролиферации клеток и активированного синтеза стероидов [48,49].

Димеризация происходит по таким причинам как, например, стабильность белка в мембране. Показано [50], что соотношение мономер/димер существенно зависит от липидной среды, детергентной солюбилизации. Так как TSPO гидрофобный трансмембранный белок, димеризация стабилизирует его в липидной среде мембраны [50]. Димеры TSPO легче ассоциируются с белками на поверхности митохондрий, таких как VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel, Вольт-зависимый аннионный канал) и ACBD3 (acyl-CoA binding domain 3, другое название – PAP7), образуя транспортный узел (так называемую «трансдуктосому») для переноса холестерина в митохондрию, что является основной физиологической функцией TSPO [51].

Димеризация вызывает изменение аффинности лигандов и субстрата (холестерина) [48]. Для некоторых лигандов (например, соединений Ro5-4864, PK-11195) показано, что они изменяют соотношение мономер/димер [48]. Авторы работы [48], предполагают, что димер TSPO может быть функциональной единицей, ответственной за активируемое лигандом связывание холестерина.

При стрессе (оксидативный, воспалительный) наблюдается рост димерной и тримерной форм TSPO, что связывают с изменением функций митохондрий (Ca^{2+}-гомеостаз, образование ROS (reactive oxygen species, реактивные формы кислорода)) [48, 52]. В работе [48] установлено, что стимуляция клеток Лейдига хорионическим гонадотропином сопровождалась

быстрым ростом ROS и, как следствие, увеличением доли полимерных форм TSPO и индукцией стероидогенеза. В рекомбинантном TSPO в протеолипосомах УФ-фотооблучение, генерирующее ROS, вызывало ковалентную полимеризацию, подтверждённую электронной микроскопией (метод «замораживания-скалывания»), при этом спектроскопически регистрировалось образование дитирозинов как кросс-линкера между мономерами.

При высоком уровне экспрессии TSPO, например, в активированной микроглии или опухолевых клетках, димеризация более выражена [53].

Образование гомополимеров особенно наиболее хорошо изучено у бактерий (*Rhodobacter sphaeroides, Rhodobacter capsulatus*): первые зарегистрированные кристаллические структуры бактериального TSPO показали устойчивые димеры [47]. У прокариот это связано с переносом порфиринов [54]. Показано, что бактериальный RsTSPO в кристаллах стабильно димерен [46], тогда как TSPO млекопитающих (mTSPO, мышиный) в мицеллах с лигандом PK-11195 описан как мономер [23], а в липосомах и мембранах наблюдаются признаки олигомеризации, выявленные методом твердотельной ЯМР-спектроскопии. [51, 55]. Эти различия подчеркивают решающую роль окружающей липидной среды мембраны и наличия связанного лиганда в активном центре TSPO [23, 46, 47].

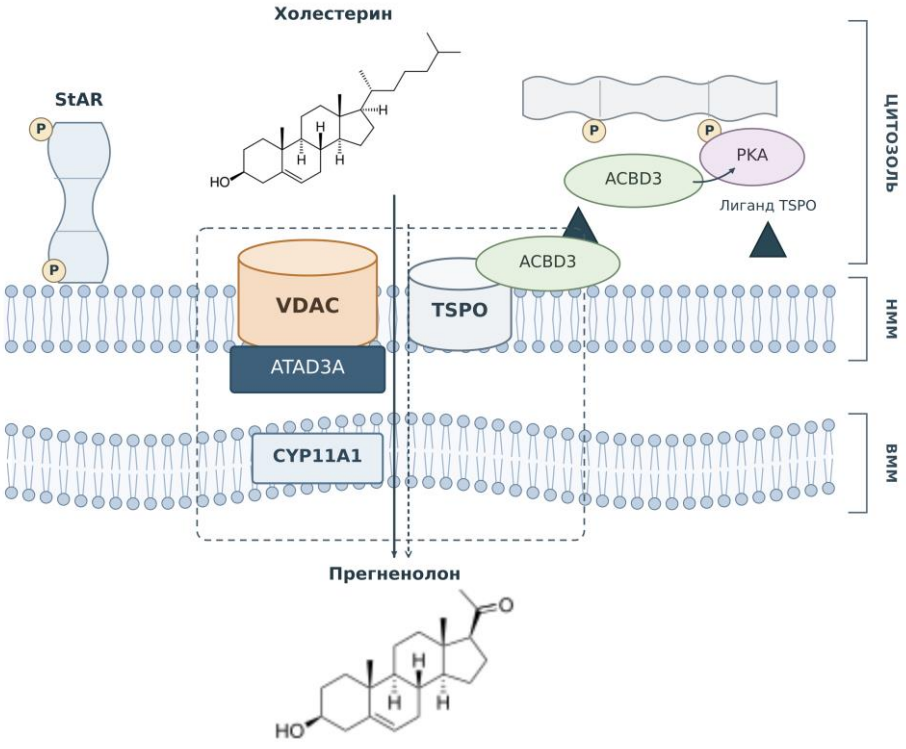
1.2 Участие TSPO в транспорте холестерина и TSPO-опосредованный нейростероидогенез

Основной функцией TSPO является транспорт холестерина из цитозоля от наружной к внутренней мембране митохондрий к энзиму CYP11A1 (также известный как cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme, P450scc), CYP11A1 катализирует превращение холестерина в прегненолон [56]. Именно эта стадия стероидного пути имеет ключевое значение как в классических стероидогенных тканях, так и в головном мозге (нейростероидогенез) [56]. Этот процесс требует участия редокс-пары (окислительно-восстановительной пары), ферредоксин-никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ-Н, NADP-H), для переноса электронов [56, 57]. Данная система окисления/восстановления широко представлена в тканях, синтезирующих стероиды. Ферредоксин — это небольшой белок, который принимает электроны от НАДФ-Н с помощью фермента ферредоксинредуктазы и переносит их к CYP11A1 [58].

Изучение вовлеченности TSPO в транспорт холестерина методом направленного мутагенеза помогло определить область аминокислотного домена, погруженного в цитозоль и отвечающего за распознавание холестерина [59]. Установлено [59, 60], что этот цитозольный домен TSPO, получивший название CRAC-домен (cholesterol-recognition amino acid consensus), играет важнейшую роль в транспорте холестерина от внешней к внутренней митохондриальной мембране [59, 60]. Предположительно за связывание с холестерином в CRAC-домене ответственны аминокислотные остатки Tyr152 и Arg156 [40].

In vitro эксперименты, подтвержденные методом ядерного магнитного резонанса, показали, что TSPO связывает холестерин в области CRAC в наномолярной концентрации (по данным анализа Скатчарда получена K_d = 10.0 ± 0.5 нМ и B_{max} 450±20 пмоль/мг) [60]. Для подтверждения этой теории о критичной роли CRAC-домена в связывании холестерина авторы исследования [60] выполнили делецию С-конца и точечные мутации: удаление С-концевого домена и мутация Y152 приводят к потере способности связывать холестерин.

Механизм переноса холестерина внутрь митохондрии до сих пор окончательно не ясен, однако продолжительные исследования показали, что в этот процесс помимо TSPO вовлечено множество других белковых структур [61, 62]. На сегодняшний день транспорт холестерина в митохондрию описан следующим образом (рисунок 8) [56]:



Примечание: НММ –наружняя митохондриальная мембрана,
ВММ –внутренняя митохондриальная мембрана

Рисунок 8 - Перенос холестерина от внешней мембраны митохондрии к внутренней посредством образования белковых комплексов с TSPO – трансдуктосомы (пунктирная линия), адаптировано из [56]

Авторы исследования [56] предполагают, что на поверхности митохондрии TSPO образует белковый комплекс, названный ими «трансдуктосома», который отвечает за перенос

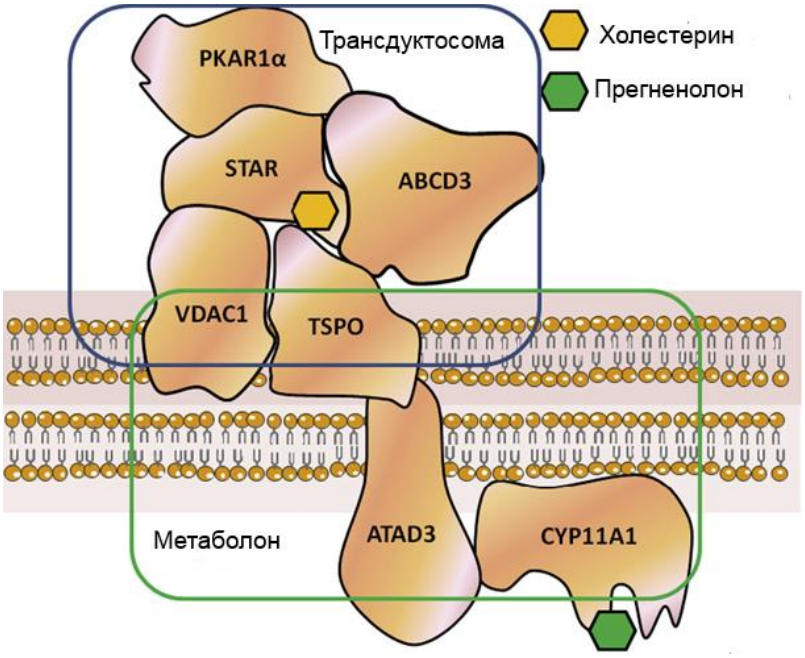
холестерина из клеточного цитозоля на CRAC-домен TSPO. Помимо самого TSPO в этот комплекс входят следующие компоненты: VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel, Вольт-зависимый аннионный канал), StAR (Steroidogenic acute regulatory protein, Стероидогенный острый регуляторный белок), ACBD1 (acyl-CoA binding domain 1, другое название – DBI, ингибитор связывания диазепама), ACBD3 (acyl-CoA binding domain 3, другое название – PAP7, PBR-associated protein) и регуляторная субъединица Iα cAMP-зависимой протеинкиназы A (PKA-RIα) [56]. Образование такого комплекса белков предполагает, что TSPO является составной частью межмембранных митохондриальных контактов, и облегчает прохождение липофильных молекул, таких как холестерин, через водное межмембранное пространство [63].

Внутренняя мембрана митохондрий относительно бедна холестерином [64], однако, в ходе исследований установлено [65, 66], что гидрофобный холестерин пересекает обе мембраны митохондрии и водное межмембранное пространство за время, достаточно быстрое для образования стероидов. Исследователи пришли к выводу [67], что природа этого переноса, по всей вероятности, требовала быстрого синтеза *de novo* некоторого белка, задачей которого было содействие переносу холестерина в водный митохондриальный матрикс. Этот белок был впервые обнаружен и охарактеризован в культуре клеток надпочечников, клеток Лейдига и желтого тела, авторы [67] предложили назвать его белком острой регуляции стероидогенеза StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein, StAR).

Белок StAR в настоящее время рассматривается как основной инициатор транспорта холестерина внутрь митохондрии [68, 69]. Транспорт холестерина в митохондриях, опосредованный StAR, первоначально предполагался как челночное событие, при котором StAR переносит молекулы холестерина по одной в межмембранное пространство митохондрий. Многочисленные исследования [70-72] в конечном итоге привели к выводу о наличии функционального взаимодействия между StAR и TSPO для опосредования транспорта холестерина. В этом комплексе белок StAR является цитозольным донором холестерина и участвует совместно с CRAC-доменом в его импорте внутрь канала TSPO [71]. Роль StAR в стероидогенезе критична, так как у генетически модифицированных мышей, у которых из генома был удален StAR, почти не образовывались стероидные гормоны [73], а повышение экспрессии StAR у нормальных мышей приводило к увеличению выработки стероидных гормонов даже при отсутствии гормональной стимуляции [67]. Таким образом, StAR обеспечивает лимитирующий перенос холестерина к внутренней мембране митохондрий и тем самым определяет скорость острого стероидогенеза.

Белковый комплекс «трансдуктосома» непосредственно связан с другой структурой, получившей название «метаболон» [63, 74]. Термин «метаболон» описывает мультибелковый комплекс, который является промежуточным звеном между «трансдуктосомой» и цитохромом

CYP11A1 (P450scc), обеспечивая второй этап переноса холестерина внутрь митохондрии к месту его превращения в прегненолон [63, 74]. «Метаболон» представляет собой 800 кДа комплекс, содержащий несколько белков TSPO, VDAC, ATAD3 (AAA+ АТФаза, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальной мембран) и сам цитохром CYP11A1 (рисунок 9) [74].



Примечание: VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel, Вольт-зависимый анионный канал), StAR (Steroidogenic acute regulatory protein, Стероидогенный острый регуляторный белок), ACBD3 (acyl-CoA binding domain 3), PKAR1α – цАМФ-зависимая протеинкиназа А, ATAD3 – AAA+АТФаза, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальной мембран, CYP11A1 – цитохром P450scc

Рисунок 9 - Митохондриальные белки, участвующие в регуляции стероидогенеза: трансдуктосомный комплекс (показан синей рамкой) и стероидогенный метаболон (показан зеленой рамкой), адаптировано из [74]

Интересно отметить, что TSPO и VDAC являются компонентами как «трансдуктосомы», так и «метаболона», что подчеркивает их ключевую роль в переносе холестерина внутрь митохондрии [74]. В состав «метаболона» также могут входить и некоторые другие белковые структуры, такие как TOM-комплекс (Translocase of the Outer Membrane), цитозольные шапероны (Hsp70, Hsp90) - компоненты, обеспечивающие контакт внешней и внутренней мембран [75, 76].

Исторически доминировавшая модель трансдуктосомы как мультибелкового комплекса, состоящего из TSPO–VDAC–ANT–StAR-ACBD1,3-PKA, который непосредственно переносит холестерин через межмембранное пространство, в последнее время подверглась переоценке.

Новые генетические модели показали [77], что TSPO может играть роль организатора мембранных микродоменов, влияющий на доступность холестерина в качестве субстрата, но не является универсальным обязательным транспортным каналом холестерина.

На сегодняшний день несколькими независимыми группами получены жизнеспособные мыши с полным удалением TSPO [78-82]. Глобальные нокауты TSPO у мышей не влияли на жизнеспособность и фертильность животных [79], при этом сохранялся базовый стероидогенез, что подвергло критике идею необходимости TSPO для транспорта холестерина. В то же время, клеточно-специфическое удаление TSPO в стероидогенных клетках (Лейдига/кора надпочечников) выявило дефицит гормон-зависимого ответа, накопление липидных капель как маркера неиспользуемого холестерина [83], что свидетельствует в пользу того, что TSPO важен именно при острых состояниях и стрессе.

При полном эмбриональном отсутствии белка TSPO у мышей организация контактов «эндоплазматический ретикулум-митохондрия», то есть образование MAM (митохондриально-ассоциированные мембраны) в клетках перестраивается, обеспечивая достаточно холестерина для базового транспорта к CYP11A1 [84], этим можно объяснить нормальные стероидные уровни в покое у животных с нокаутом TSPO [78].

На основании ряда работ [83, 85] можно сделать вывод, что роль TSPO в состояниях стресса регуляторная, а не канальная, TSPO перенастраивает белковые мембранные домены на митохондриях, регулирует поток Ca^{2+}/АДФ и образование межмембранных контактов.

1.3 Вовлеченность TSPO в патогенез различных заболеваний

1.3.1 Нейродегенеративные заболевания

У пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и болезнь Паркинсона, было показано повышение связывания меченых лигандов с TSPO [86-89]. При всех этих заболеваниях увеличивается плотность TSPO в областях, подверженных дегенеративным изменениям.

Исследования с использованием животных моделей заболеваний [90], связанных с демиелинизацией, например, таких как рассеянный склероз, экспериментальный аллергический энцефаломиелит и купризон-индуцированная демиелинизация нервных волокон с последующей ремиелинизацией, показали, что уровни экспрессии TSPO остаются повышенными как в период выздоровления после болезни, так и в период восстановления миелиновой оболочки, что свидетельствует о возможной роли TSPO в процессах регенерации нейронов [90]. Также TSPO может являться чувствительным и специфическим маркером для визуализации и количественной оценки демиелинизации и активации микроглии и астроцитов в головном

мозге. С помощью меченых лигандов показана [52, 90, 91] возможность регистрировать клеточные источники TSPO-экспрессии - от преимущественно микроглиального в период повреждения, к более выраженному астроцитарному компоненту в период восстановления.

1.3.2 Психические расстройства

Депрессивные расстройства и суицидальное поведение у взрослых пациентов были связаны со снижением экспрессии TSPO [92, 93]. Кроме того, генетические исследования показали [94], что пациенты с депрессией и тревожными расстройствами имеют высокую частоту полиморфизма в TSPO аллелях Ala147Thr, которая может повлиять на синтез нейростероида прегненолона [94].

В работе [95] было показано, что при шизофрении снижен уровень экспрессии TSPO, что может быть связано с тревогой и стрессовым состоянием и влиять на агрессивное поведение у людей. Обнаружено [95], что у пациентов с шизофренией, проявляющих агрессию, была значительно ниже плотность TSPO тромбоцитов (B_{max}), и эти пациенты демонстрировали значительно более высокие баллы по шкале враждебности, тревожности, ситуативного гнева и эмоционального дистресса по сравнению с пациентами, не проявляющими агрессию, а также здоровыми контрольными группами.

Экспрессия TSPO в периферических мононуклеарных клетках и тромбоцитах была снижена у субъектов, подверженных тревожным расстройствам, снижение экспрессии TSPO также наблюдалось при генерализованных тревожных расстройствах [96], социальных тревожных расстройствах [97], посттравматических стрессовых расстройствах [98], тревоги сепарации и панических расстройствах у пожилых людей [99].

В исследовании методом PET показано [100] положительную корреляцию между способностью связывать меченный лиганд TSPO, соединение DAA1106, и улучшением состояния, а также с продолжительностью болезни у пациентов с шизофренией. Возможно, активация микроглии мозга может быть вовлечена в физиологию выздоровления.

Несмотря на важную роль нейростероидов в модуляции состояний депрессии и тревоги у человека, существует не очень много исследований экспрессии TSPO в клинической практике [101]. Экспрессия TSPO изучалась либо посредством подсчета соответствующей мРНК в периферических мононуклеарных клетках, либо характеристик связывания меченого лиганда TSPO, соединения PK-11195 на мембранах тромбоцитов [102, 103].

Клинический анксиолитический потенциал лигандов TSPO впервые продемонстрировал препарат этифоксин, который показал сопоставимую эффективность с бензодиазепином лоразепамом у пациентов, страдающих от расстройств адаптации с тревогой [104]. Однако

этифоксин также является прямым модулятором рецепторов $ГАМК_А$, поэтому степень, в которой наблюдаемые эффекты связаны с взаимодействием с TSPO, пока не ясна.

Лиганд XBD173 (Emapunil) продемонстрировал антипаническую и анксиолитическую эффективность у людей, используя экспериментальную модель тревоги, с использованием тетрапептида холецистокинина (CCK4) [105].

Таким образом, рецептор TSPO может представлять собой перспективную мишень для разработки быстродействующих анксиолитиков с отсутствием побочных эффектов бензодиазепинов, а лиганды TSPO могут иметь большой терапевтический потенциал для лечения психических расстройств.

1.3.3 Повреждения головного мозга

TSPO представляет интерес в качестве чувствительного биомаркера повреждения головного мозга и нейродегенеративных заболеваний, в частности нейровоспаления и реактивного глиоза [106]. Уровни экспрессии TSPO низки в нормальном мозге, но локально повышены в его поврежденных областях, что позволяет с высокой точностью обнаружить активные нейродегенеративные процессы. Одной из основных реакций на травму мозга является активация микроглии [107, 108]. Микроглия — это уникальные макрофаги мозга, которые отличаются по роли и функциям от периферических макрофагов [109]. Активированная микроглия выполняет фагоцитарные функции, очищая место повреждения мозга от остатков мертвых клеток [110-112] Показано [113], что TSPO участвует в фагоцитарной способности микроглии. Также в работе [114] установлено, что микроглия, взятая у мышей с нокаутом TSPO, имела нарушенный фагоцитоз, что приводило к накоплению β-амилоида. Авторы исследования [115] дают механистическое объяснение этому факту: TSPO необходим для поддержания энергообеспечения фагоцитоза, удаление TSPO снижало фагоцитоз в первичных микроглиальных культурах.

Экспериментальные исследования ПЭТ показали [116], что меченые лиганды TSPO, соединения PK-11195 и DAA1106, могут служить маркерами состояния и изменений в коре мозга крыс при черепно-мозговой травме, при которой наблюдается повышенная экспрессия TSPO в митохондриях клеток микроглии.

В связи с вышесказанным, TSPO в настоящее время широко используется в качестве биомаркера повреждений ЦНС.

1.3.4 Повреждения периферической нервной системы

В исследованиях [117, 118] на моделях повреждения периферической нервной системы (ПНС) показано, что экспрессия TSPO возрастает в малых сенсорных нейронах

спинномозгового ганглия после травмы аксона. В ответ на повреждение, экспрессия TSPO также сильно активируется в Шванновских клетках, макрофагах и нейронах [117-119].

В работе [120] было показано, что после повреждения периферического нерва, экспрессия TSPO возвращается к исходному уровню только тогда, когда регенерация нерва завершена, что свидетельствует о том, что TSPO играет важную роль в процессе регенерации нервных клеток.

Исследования китайских научных групп [121, 122] экспрессии генов на крысах выявили выраженное повышение плотности TSPO в спинальных ганглиях после разрыва нервной связки, который является моделью исследования нейропатической боли.

TSPO также вовлечен и в восстановление нейронов при диабетической нейропатии: в работе [123] лиганд TSPO Ro5-4864 снижал выраженность экспериментальной диабетической нейропатии, включая улучшение нервной проводимости, порога тепловой чувствительности, восстановление плотности кожной иннервации. Кроме того, Ro5-4864 стимулировал экспрессию белков, участвующих в регенерации миелина, что также может быть важным фактором в предотвращении развития нейропатической боли.

В обзоре Giatti с соавторами [119] по нейроактивным стероидам в ПНС рассматривают возможность фармакологической активации TSPO как способ увеличивать эндогенные нейростероиды локально и, тем самым, поддерживать регенерацию и ремиелинизацию нейронов, снижать выраженность нейропатических симптомов.

Таким образом, TSPO можно рассматривать как перспективный тканевой маркер повреждения, дегенерации и воспалительной фазы регенерации ПНС, а также как молекулярную мишень для визуализации повреждений ПНС и разработки диагностических методов мониторинга повреждений нейронов при нейропатической боли.

1.3.5 Опухоли

Митохондрии являются ключевыми клеточными органеллами, которые опосредуют внутриклеточные пути гибели клеток путем апоптоза [124, 125]. Экспрессия TSPO увеличивается при различных видах рака [126, 127].

Лиганды TSPO могут оказывать терапевтическое воздействие на некоторые опухоли посредством модуляции клеточной пролиферации и апоптоза. В ряде экспериментальных моделей опухолей показано [126, 128, 129], что лиганды TSPO способны оказывать противоопухолевое действие за счёт снижения пролиферации и индукции апоптоза, причём наиболее последовательно это продемонстрировано для соединения PK-11195 [128]. Так, в линии клеток нейробластомы (до лечения и после рецидива) PK-11195 в микромолярных концентрациях дозозависимо подавлял пролиферацию и вызывал остановку клеточного цикла в

фазе G1/S (переход из пресинтетической фазы G1 в синтетическую фазу S репликации ДНК). [128]. В работе [129] методом вестерн-блотта и цитометрическим анализом было показано, что в первичных клетках хронического лимфоцитарного лейкоза лиганд PK-11195 индуцировал апоптоз. При этом отмечено, что апоптотические эффекты реализуются при высоких концентрациях (порядка десятков микромолей) лиганда. Авторами также установлено [129], что PK-11195 вызывает деполяризацию митохондрий и высвобождение цитохрома С (Cyt C) перед активацией каспазы, а дитиоцианатостильбен-2,2-дисульфоновая кислота (DIDS), ингибитор VDAC, снижала апоптоз, индуцированный PK-11195, что демонстрирует прямое участие митохондрий и TSPO в регуляции апоптоза.

На клетках глиомы крысы линии С6 методом проточного цитометрического анализа показано [130], что два классических лиганда TSPO, PK-11195 и Ro5-4864, могут инициировать митохондриально-опосредованный апоптоз также путём активации каспаз, в то время как неселективный лиганд TSPO диазепам и низкоаффинный бензодиазепин клоназепам не оказывали существенного эффекта [130].

Предложена модель регуляции митохондриально-опосредованной гибели клеток (апоптоза) посредством TSPO [129, 131]. TSPO высвобождает Cyt C из митохондрий посредством образования пор переходной проницаемости мембраны (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) и окисления кардиолипина. Кардиолипин, в свою очередь, представляет собой важнейший фосфолипид, составляющий ~15-20% фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий, необходим для клеточного энергообмена [132]. Цитохром С образует апоптосому при связывании с цитозольным белком Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) и прокаспазой-9. Митохондрии являются основными источниками активных форм кислорода (АФК), поскольку они потребляют большую часть доступного кислорода для производства аденозинтрифосфата (АТФ). Эти АФК реагируют с другими клеточными компонентами, такими как мембраны, ферменты, белки и ДНК, что приводит к нарушению клеточного гомеостаза и гибели клеток [133].

Таким образом, TSPO можно использовать [134, 135] в качестве мишени для визуализации опухолей головного мозга, а также и в клинике [136] в качестве биомаркера для клинической диагностики и наблюдения. Некоторые лиганды, в частности антагонисты TSPO, могут иметь противораковый терапевтический потенциал.

1.3.6 Офтальмологические заболевания

В последние 5 лет заметно возросло количество публикаций, посвященных вовлечению TSPO в патогенез ретинопатии и глаукомы. Так, в работе [137] показано, что TSPO вовлечён в нейродегенеративное повреждение сетчатки при глаукоме, регулируя одновременно апоптоз и

пироптоз ретинальных нейронов. Методами иммунофлуоресцентного анализа и полимеразной цепной реакции (ПЦР) авторы показали, что уровень экспрессии TSPO был значительно повышен как в мозге модельных животных с повышенным внутриглазным давлением (ВГД), так и в мозге пациентов с глаукомой. В этом исследовании использовали *in vivo* модель - повышение ВГД у крыс и клинические образцы пациентов с глаукомой и повышенным ВГД. Также авторы сравнили 15 пациентов с глаукомой и высоким ВГД и 15 пациентов с возрастной катарактой и нормальным ВГД. Авторы делают вывод о том, что TSPO может служить потенциальной мишенью для диагностики глаукомы [137].

В работе [138] показано, что рецептор TSPO и его лиганды могут быть перспективны в разработке методик визуализации ретинопатии. В этом исследовании меланизированных мышей линии C57BL/6J подвергли воздействию синего LED-света 10 000/15 000/20 000 люкс в течение 5 сут по 8 ч/сут, после чего степень повреждения сетчатки определили морфологически. При внутривенном введении мышам [^{18}F]-DPA-714, радиолиганда TSPO для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), была показана хорошая визуализация области нейровоспаления в этой мышиной модели. Иммуногистохимия, иммунофлуоресценция и вестерн-блот подтвердили повышение TSPO в сетчатке и его колокализацию с IBA-1-позитивной микроглией (маркер микроглии и макрофагов в нервной ткани и сетчатке), что позволяет трактовать усиление ПЭТ-сигнала как маркер микроглиальной активации и раннего нейровоспаления в *in vivo* моделях фотоповреждения сетчатки [138].

В работе [139] было показано, что классические лиганды TSPO, соединения XBD173, PK-11195 и Ro5-4864, обеспечивают защиту от воспалительных реакций сетчатки и нейродегенерации, действуя преимущественно через микроглию сетчатки. В данном исследовании [139] использовали клеточную линию ARPE-19 сетчатки человека и индуцировали окислительный стресс и воспаление двумя способами: воздействием супернатантов от активированных человеческих микроглиальных клеток и применением LLOMe - лизосомного дестабилизатора, активирующего воспалительные каскады. Изучаемые лиганды TSPO, соединения XBD173, PK-11195 и Ro5-4864, подавляли провоспалительную экспрессию генов, снижали активацию каспазы-1, уменьшали накопление липидов и уровень внутриклеточных реактивных форм кислорода. Подчеркивается, что лиганды TSPO индуцировали активацию сигнального пути транскрипторного фактора Nrf2, который индуцирует экспрессию генов антиоксидантной и детоксикационной защиты. Авторы [139] делают вывод о том, что лиганды TSPO могут усиливать антиоксидантный путь Nrf2 в клетках пигментного эпителия сетчатки и защищать их от повреждения, вызванного воспалением и окислительным стрессом.

Таким образом, TSPO может представлять интерес для разработки новых методов для ранней диагностики ретинопатии и глаукомы.

1.4 Лиганды TSPO

1.4.1 Эндогенные лиганды TSPO

1.4.1.1 Холестерин

Холестерин (рисунок 10) является ключевым лигандом TSPO, так как именно он является исходным веществом для дальнейшего биосинтеза нейростероидов после проникновения через мембрану митохондрии [59].

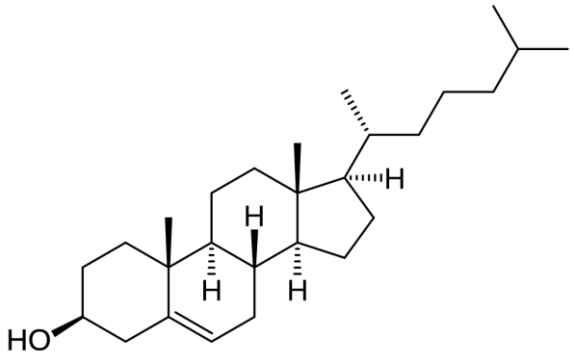
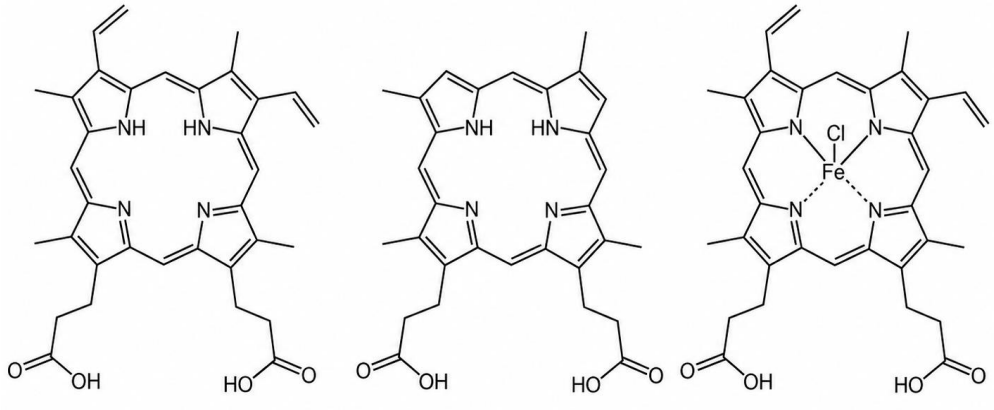


Рисунок 10 - Структура холестерина

Холестерин обладает наномолярным сродством к TSPO (K_d < 10 нМ) [140]. Как было показано, местом связывания холестерина на TSPO является CRAC-домен, расположенный на С-конце пептидной цепи рецептора [59, 141].

1.4.1.2 Порфирины

Ряд тетрапиррольных соединений, порфиринов и металлопорфиринов, рассматриваются как эндогенные лиганды TSPO (рисунок 11) [142].



Протопорфирин IX Дейтеропорфирин IX Гемин

Рисунок 11 - Структуры представителей порфиринов, обладающих высоким сродством к TSPO

Verma с соавторами показали [142], что наибольшей аффиностью в митохондриях почек крыс обладают производные порфиринов такие как протопорфирин IX (K_i 14.5 ± 10.7 нМ), дейтеропорфирин IX (K_i = 31.3 ± 2 нМ) и гемин (K_i = 40.6 ± 13.7 нМ). Эти порфирины при этом были неактивны по отношению к центральным бензодиазепиновым рецепторам [142], что может свидетельствовать в пользу того, что эти соединения являются эндогенными лигандами TSPO.

В исследовании [143] установлено, что сайт связывания протопорфирина IX (PpIX) у BsTSPO имеет общую область с сайтом связывания классического лиганда PK11195. Guo с соавторами установлено [143], что TSPO участвует в деградации PpIX до гема, что предполагает физиологическую важность TSPO в защите клеток от окислительного стресса.

Несмотря на то, что многие порфирины обладают высокой аффинностью по отношению к TSPO, эти соединения практически не изучались на наличие биологических эффектов. Предполагатся [142], что сродство порфиринов к TSPO обусловлено полифункциональностью этого рецептора, задействованного не только в транспорте холестерина, но и в транспорте порфиринов внутрь митохондрии, где они принимают участие в биосинтезе митохондриальных цитохромов и других порфирин-содержащих молекул.

1.4.1.3 DBI и его производные

К числу эндогенных лигандов TSPO относятся пептиды семейства эндозепинов. Эндозепины представляют собой белки, способные взаимодействовать с бензодиазепиновыми сайтами связывания, первоначально открытыми в составе комплекса рецептора $ГАМК_А$. Среди этого семейства белок ингибитор связывания диазепама (diazepam binding ingibitor, DBI) [144] причисляется к эндогенным лигандам TSPO, (идентификатор в Protein Data Bank: 1HB8) (рисунок 12) [145].



Рисунок 12 - Третичная структура бычьего DBI (идентификатор в Protein Data Bank: 1HB8), закристаллизованная с SO_4, красными точками обозначены молекулы воды [145]

DBI был впервые описан в литературе в 1983 году как эндогенный полипептид массой ≈9–11 кДа [144], выделенный из ткани мозга крысы и идентифицированный по способности вытеснять диазепам из бензодиазепинового сайта связывания [144, 146]. В дальнейшем было показано [147], что DBI способен вытеснять бензодиазепиновые лиганды из TSPO в стероидогенных тканях, в частности, в клетках коры надпочечников крыс. DBI также присутствует в высоких концентрациях в клетках Лейдига, характеризующихся повышенной экспрессией TSPO [147].

Одновременно в нескольких работах [147, 148] установлено, что DBI стимулирует синтез прегненолона в митохондриях клеток Лейдига и коры надпочечников, при этом авторы показали, что максимальная стимуляция образования прегненолона под действием DBI достигается при концентрации белка 0.33 мкМ. При этом эффективность стимуляции стероидогенеза белком DBI превышает этот показатель, полученный под действием производных бензодиазепинов.

DBI является предшественником посттрансляционно образующихся пептидов [120, 149], среди которых в качестве эндогенных лигандов TSPO выделяют октадеканейропептид (octadecaneuropeptide, ODN, DBI_{33-50}) и триаконтатетронейропептид (triakontatetraneuropeptide, TTN, DBI_{17-50}). (рисунок 13) [149]:

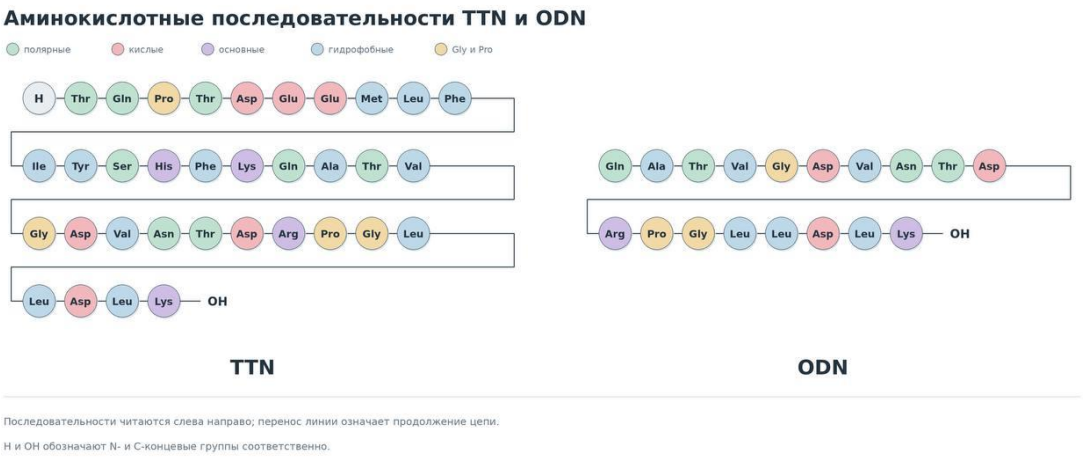


Рисунок 13 - Аминокислотные последовательности посттрансляционных продуктов DBI: triakontatetraneuropeptide (TTN) и octadecaneuropeptide (ODN), адаптированно из [149]

Лигандные свойства ODN и TTN получили подтверждение в работе Papadopoulos с соавторами [147], эти пептиды, как и DBI, способны стимулировать митохондриальный биосинтез стероидов, в том числе образование прегненолона. При этом фармакологический ингибиторный анализ с использованием специфического антагониста TSPO, соединения PK-11195, блокировал эффекты, что указывает на ключевую роль TSPO в реализации эффекта этих полипептидов. В работе Lacor с соавторами [120] показано, что в периферической нервной системе TTN и ODN в Шванновских клетках стимулировали локальный нейростероидогенез и процессы нейрорегенерации после повреждения нерва крио-травмой [120].

Интересно отметить, что синтез эндозепинов в клетках астроцитов стимулируется β-амилоидным пептидом, который, как полагают, играет ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера [150].

В совокупности эти данные позволяют рассматривать DBI и его посттрансляционные продукты - ODN и TTN, как физиологические лиганды TSPO. Можно предположить, что синтетические лиганды TSPO могут полностью или частично играть роль DBI при взаимодействии с рецептором.

1.4.1.4 Белок PAP7

В 2001 году в ходе исследований эндогенных лигандов TSPO был выявлен [151, 152] предполагаемый белковый лиганд TSPO, получивший название «ассоциированный с ПБР протеин» (PBR-associated protein) или PAP7 массой 52 кДа. В работе [151] показано иммуногистохимическим анализом, что PAP7 высоко экспрессируется в стероидогенных тканях

- гонадах, надпочечниках, гиппокампе, а также в различных нейрональных и глиальных клетках головного мозга.

PAP7 взаимодействует как с TSPO, так и с регуляторной субъединицей протеинкиназы А типа I (PKA RIα), что может указывать на его потенциальную роль в сопряжении его с TSPO при образовании холестеринового транспортного белкового комплекса «трансдуктосомы» и регуляцией стероидогенеза [152, 153]. В работе Li с соавторами [151] продемонстрировано, что сверхэкспрессия полноразмерного PAP7 усиливает стероидогенез на модели клеток Лейдига линии MA-10, в то время как экспрессия укороченной формы PAP7 ингибировала гормон-стимулированный стероидогенез.

Также есть данные о вовлеченности PAP7 в транспорт порфириногена из цитозоля в митохондрии, где тот превращается в протопорфирин IX непосредственный предшественник гема [154].

В процессе подробного изучения и переоценки функций DBI и PAP7, эти белки были отнесены к общему классу, содержащих домен связывания ацил-кофермента А (acyl-coenzyme A binding domain containing protein, ACBD) [155], в связи с чем были переименованы в ACBD1 и ACBD3, соответственно. В современной литературе эти белки чаще всего рассматриваюся не как лиганды, а в качестве компонентов «трансдуктосомы», белкового комплекса с TSPO, необходимого для транспорта холестерина в митохондрии [156, 157].

1.4.2 Синтетические лиганды TSPO

1.4.2.1 Бензодиазепины

Ro5-4864

Одними из первых синтетических лигандов-агонистов TSPO разрабатывались производные бензодиазепинов, например, диазепама, а соединение Ro5-4864, представляющее собой хлородиазепам, стало классическим представителем этой группы (рисунок 14) [19].

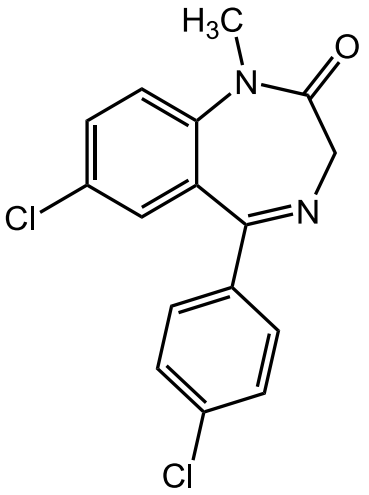


Рисунок 14 - Структура лиганда Ro5-4864

Это соединение было охарактеризовано в экспериментах, проведенных в 1977 году исследователями Braestrup с соавторами, открывших сам рецептор TSPO как альтернативное место связывание диазепама в митохондриальной фракции клеток ткани почки крысы [19]. В этих экспериментах Ro5-4864 практически не вытеснял меченый [^{3}H]-диазепам из мембран головного мозга крыс, однако крайне эффективно вытеснял его из митохондриальной фракции почек. Напротив, клоназепам, показавший наибольшую степень ингибирования связывания меченного диазепама с мембранами мозга, практически не ингибировал почечное связывание [19].

В начальных исследованиях соединение Ro5-4864 активно использовалось для выявления строения и функций активных периферических сайтов связывания TSPO, а также фармакологических свойств при дальнейших разработках новых лигандов [61]. Именно благодаря характеристикам рецептора TSPO, изученным с помощью Ro 5-4864, в дальнейшем был сделан вывод, что этот рецептор принципиально отличается от ЦБР, и имеет собственную структуру и функции [61, 158].

Этот лиганд обладал спектром нейропсихотропной активности в различных моделях на животных. В исследовании Barron с соавторами [159] оценивалось влияние Ro5-4864 на развитие нейропатологии у мышей линии 3xTgAD. Ro5-4864 заметно улучшал показатели рабочей памяти в тесте Y-лабиринта и снижал тревожное поведение в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у животных. В этой же работе показано, что введение Ro5-4864 положительно влияло на нейростероидогенез у мышей с предварительной гонадэктомией, а также влияло и на нейропатологию, связанную с болезнью Альцгеймера, включая накопление β-амилоида, глиоз и нарушения поведения, как у 7-месячных молодых самцов мышей с низкой патологией, так и у 24-месячных пожилых самцов с развитой нейропатологией [159]. Таким образом, улучшение показателей рабочей памяти в этом исследовании, вероятно, связано со снижением нейропатологии.

Лиганд Ro5-4864 повышал выживаемость культивированных неонатальных нейронов дорсального ганглия крыс в ответ на отмену терапии с использованием фактора роста нервов NGF и защищал мотонейроны спинного мозга новорожденных крыс от гибели вызванной аксотомией седалищного нерва [160]. Однако нейропротекторные эффекты Ro5-4864 ограничены во взрослых мотонейронах после повреждения у мутантных мышей SOD и отсутствуют во взрослых сенсорных нейронах. [160]. Увеличение функциональной регенерации позволяет предположить, что эффекты TSPO, способствующие росту и выживанию нейрональных клеток, могут происходить через независимые механизмы. Первое может

включать предотвращение высвобождения цитохрома С из митохондрий, а второе — выработку нейростероидов или цитокинов [160].

При сравнении нейропротекторного действия двух лигандов TSPO - Ro5-4864 и PK-11195, проявляющего антагонистические свойства к TSPO, выяснилось [161], что у пожилых крыс-самцов линии Sprague-Dawley значительно снижался процент волокон с разложением миелина, и увеличивалось общее количество миелинизированных волокон, напротив, PK-11195, не оказывал существенного влияния ни на один из анализируемых параметров.

Таким образом, лиганд Ro5-4864 сыграл ключевую роль в доказательстве существования рецептора TSPO как периферического бензодиазепинового сайта, отличного от ЦБР, и стал важным модельным лигандом в работах, где TSPO рассматривается как маркер, связанный с нейровоспалением, нейродегенерацией и механизмами нейропротекции, однако не был развит как лекарственный препарат.

1.4.2.2 Бензоксиазепины и бензотиоазепины

Структура бензодиазепинового лиганда Ro5-4864 явилась отправной точкой для развития схожих структур синтетических лигандов TSPO, таких как бензоксиазепины и бензотиоазепины (рисунок 15) [162, 163]:

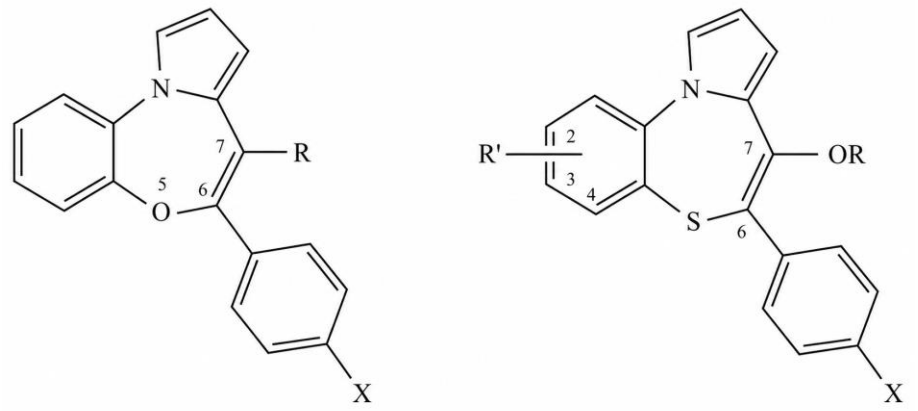


Рисунок 15 - Общая формула лигандов TSPO, бензоксиазепинов и бензотиоазепинов [162, 163]

Бензоксазепины синтезированы на основе пирролобензоксазепиновой структуры [162]. Афинность лигандов была оценена в исследованиях, в которых измерялась их способность вытеснять меченный лиганд [^{3}H]-PK-11195 из рецепторного сайта. Ряд этих соединений демонстрировал значения K_i в субнаномолярном диапазоне. OXA-17f и OXA-17j оказались самыми афинными из этой серии со значениями K_i 0.26 и 0.36 нМ соответственно по сравнению со значением K_i 0.78 нМ для PK 11195 в одинакоывых концентрациях [162]. В эксперименте с

лигандом ЦБР, клоназепамом, показано, что эти бензоксазепины неактивны в отношении ЦБР [162].

Бензотиазепины были идентифицированы в качестве лигандов TSPO в начале 1990-х годов научной группой Naccі с соавторами [163], и изначально разрабатывались в качестве аналогов бензодиазепинов и лигандов $ГАМК_A$-рецепторов. Однако, дальнейшее исследование характеристик связывания показало, что некоторые из представителей данной группы, соединения, обладают высокой аффинностью и селективностью непосредственно к TSPO, а не к $ГАМК_A$-рецепторам [164]. Несмотря на высокую аффинность бензотиоазепиновых производных к TSPO, их фармакологическая оценка *in vivo* не выявила выраженного анксиолитического или иного терапевтически значимого фармакологического профиля, что ограничило перспективы дальнейшего развития данного класса соединений как лекарственных средств [164].

1.4.2.3 Изохинолиновые карбоксамиды

PK-11195

Первый лиганд небензодиазепиного класса, соединение PK-11195, предсталяющее собой производное изохинолина, был разработан компанией Pharmuka Laboratories, Франция в начале 80-х годов XX века (рисунок 16) [33].

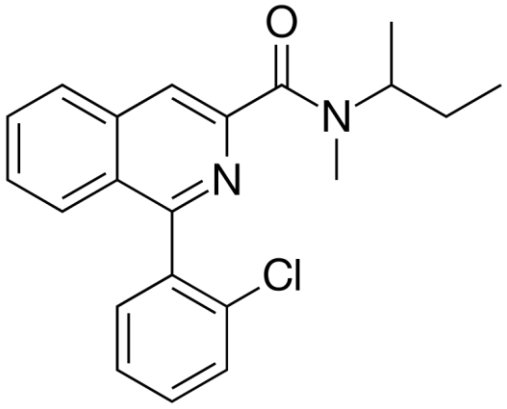


Рисунок 16 - Структура лиганда TSPO PK-11195 [33]

Соединение PK11195 способно связываться с TSPO с наномолярной аффинностью при отсутствии связывания с центральными бензодиазепиновыми рецепторами в головном мозге [33,165]. При сопоставлении характеристик связывания соединений PK11195 и Ro5-4864 с TSPO в мембранах тканей почек крыс с использованием [^{3}H]-PK11195 было показано превосходство первого соединения (K_i = 9.3 нМ) перед вторым (K_i = 23.0 нМ) [165].

В ряду исследований *in vivo* и *in vitro* показано [165-169], что PK11195 является антагонистом TSPO, так как он блокирует фармакологические эффекты других лигандов TSPO, демонстрирующих агонистические свойства. Так, еще в середине 80-х годов в работах сотрудников Pharmuka Laboratories, разрабатывавших PK-11195, был выявлен его дозозависимый антагонизм с бензодиазепиновым лигандом Ro5-4864 в тесте конфликтной ситуации по Вогелю у крыс [169]. Этими же авторами показано, что механизм действия PK-11195 зависит именно от активации TSPO рецептора, а не центральных бензодиазепиновых рецепторов в мозгу [169]. Термодинамический анализ связывания меченых лигандов, проведенный также сотрудниками Pharmuka Laboratories, показал, что связывание [^{3}H]-PK-11195 в мембранах клеток сердца крыс было обусловлено энтропией, тогда как связывание [^{3}H]-Ro5-4864 было обусловлено энтальпией. Авторы делают вывод, что PK-11195 может быть антагонистом этих сайтов связывания, а Ro5-4864 агонистом или частичным агонистом [165]. Результаты стероидогенного анализа с использованием клеток глиомы крысы C6 показали, что PK-11195 в дозе 40 мкМ значительно стимулировал образование прегненолона [170], однако в той же концентрации PK-11195 подавлял накопление прегненолона, вызванное другими специфическими лигандами TSPO, например, таким как производное индола FGIN 1-27 [166].

Оба соединения, антагонист PK-11195 и агонист Ro5-4864, могут изменять чувствительность мышей линии DBA/2J к аудиогенным судорогам [168]. Показано, что Ro5-4864 (1-15 мг/кг) дозозависимо облегчает аудиогенные судороги, а PK-11195 (2-5 мг/кг) противодействует эффектам Ro5-4864. В этих дозах PK-11195 сам по себе не изменяет чувствительность к аудиогенным судорогам, но в дозах 20-80 мг/кг он защищает мышей DBA/2J от аудиогенных судорог. PK-11195 был неактивен в отношении облегчения аудиогенных судорог, вызванных этил-бета-карболин-3-карбоксилатом (обратным агонистом ЦБР). Эти результаты позволяют предположить, что облегчение аудиогенных судорог с помощью Ro5-4864 и его антагонизм с PK-11195 опосредованы сайтами связывания бензодиазепинов периферического типа, то есть TSPO [168].

Являясь антагонистом TSPO, PK-11195 также обладает и положительными фармакологическими эффектами [171]. Так, это соединение снижает ухудшение памяти и способности к обучению, вызванное липополисахаридом (ЛПС) в водном лабиринте Морриса [171]. Результаты вестерн-блоттинга и количественного ПЦР-теста показывают, что экспрессия белка TSPO и мРНК в группе ЛПС была значительно выше, чем в контрольной группе ($p < 0.05$). Экспрессия белка TSPO и мРНК в группе PK-11195+ЛПС была значительно ниже, чем в группе ЛПС ($p < 0.05$) [171]. Аналогичным образом, результаты лазерной конфокальной микроскопии показали, что интенсивность флуоресценции TSPO была увеличена в группе ЛПС. Интенсивность флуоресценции TSPO в группе PK-11195 + ЛПС была значительно ниже,

чем в группе ЛПС. Эти результаты позволяют предположить, что PK-11195 снижает активацию микроглии в гиппокампе [171].

Несколькими научными группами [172-174] предпринимались попытки разработать лиганды на основе структуры PK-11195 с бóльшим сродством и улучшенным фармакокинетическими фармакологическим свойствами. В работе Belloli и соавторами [174] оценивали три новые [^{11}C]-меченые хинолин-карбоксамидные производные ([^{11}C]-VC193M, [^{11}C]-VC195 и [^{11}C]-VC198M). Эти радиолиганды тестировали на доклинической модели, имитирующей нейродегенеративный процесс при болезни Хантингтона: односторонней стриарной инъекции хинолиновой кислоты (QA), при которой гистологически подтверждались активация микроглии и астроцитарный глиоз в поражённом стриатуме. Однако после оценки экспериментов in vivo, эти производные не продемонстрировали улучшенного сродства или кинетики по сравнению с эталоном - PK-11195 [174].

В работе Anzini с соавторами [172] в результате SAR-анализа аналогов PK-11195 были сформулированы основные требования фармакофора TSPO-лигандов данного класса: высокое сродство достигается при строго заданной ориентации карбонильной группы относительно гетероциклического остова: диэдральный угол ~80–110°, что согласуется с участием карбонила в формировании водородных связей в кармане связывания; наличие объёмного липофильного третичного амидного фрагмента, переход к вторичным амидам приводит к заметному снижению сродства; вариация положения атома азота в гетероциклическом скелете существенно не влияет на аффинность.

На сегодняшнийдень соединение PK-11195 стало классическим представителем лигандов TSPO и используется в качестве «золотого стандарта» в исследованиях этого рецептора: PK-11195 однин из первых лигандов стал использоваться в ПЭТ-исследованиях. Согласно нескольким обзорным работам [175-177] по молекулярной визуализации микроглии, ПЭТ-исследования с рацемическим R,S-[^{11}C]-PK-11195 впервые продемонстрировали свой потенциал в 1986 г., а затем радиолиганд быстро начали применять для оценки TSPO-экспрессии в различных патологических моделях. В результате за десятилетия сформировался массив ПЭТ-исследований, где (R)-[^{11}C]-PK-11195 выступает референсным лигандом для протоколов и моделей кинетики при изучении TSPO-трассеров [178, 179].

1.4.2.4 Алпидем и родственные структуры

Алпидем (рисунок 17) - имидазопиридиновый лиганд TSPO, клинически активный анксиолитический препарат, изначально разрабатывался в конце 1980-х годов во Франции фирмой Synthélabo Recherche как небензодиазепиновый лиганд ГАМК$_A$-рецептора [180, 181].

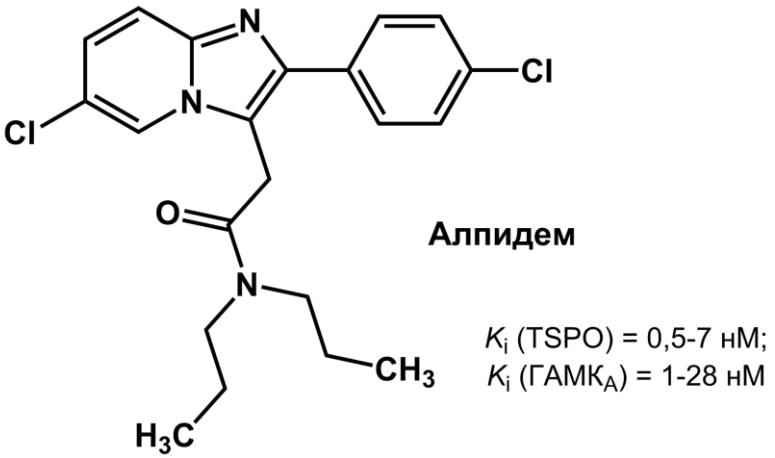


Рисунок 17 - Структура лиганда TSPO анксиолитика Алпидема

Уже через два года после вывода на рынок во Франции были зарегистрированы тяжёлые случаи лекарственного поражения печени, в т. ч. острый гепатит, печёночная недостаточность, летальный исход, что привело к изъятию Алпидема в 1993 г., и впоследствии - к полному прекращению оборота [182].

Дальнейшее исследование механизма действия Алпидема показало [183], что препарат вызывает в гепатоцитах метаболическую активацию CYP1A, истощение глутатиона и тем самым вызывает смертельную гепатотоксичность. Интересно, что Золпидем такими побочными эффектами не обладал [183]. Сравнительный обзор фармакокинетических свойств Алпидема и Золпидема показал, что Алпидем по ряду параметров более липофилен, чем Золпидем, и демонстрирует иной профиль метаболизма [184].

Однако, несмотря на выявленные токсические свойства и не самую высокую селективность к TSPO, структура Алпидема (2-фенил-имидазо[1,2-а]пиридин-3-ацетамид**)** послужила отправной точкой для конструирования лигандов TSPO с анксиолитическими свойствами. В 1997 году Трапани с соавторами опубликовали исследование ряда производных Алпидема на базе его имидазопиридинового ядра, направленное на создание в этом ряду селективных лигандов TSPO (рисунок 18) [185]:

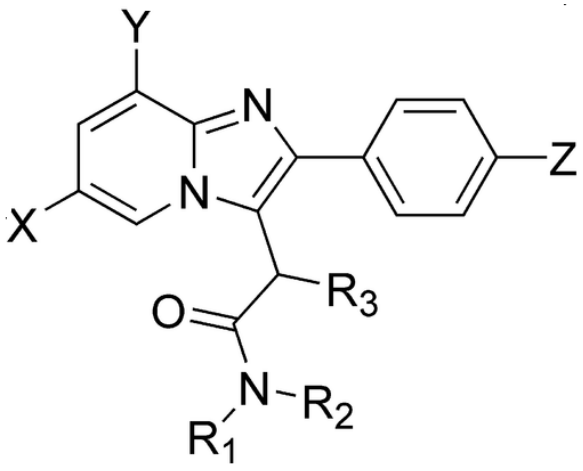


Рисунок 18 - Общая формула ряда аналогов Алпидема, синтезированных Трапани с соавт. [185]

В SAR-исследовании серии из 36 соединений научной группой Трапани [185] было установлено, что размер и разветвленность заместителей в ароматических ядрах и на амидном азоте резко изменяют соотношение аффинности TSPO/ЦБР, а также влияют на фармакологические эффекты молекулы, что возможно происходит из-за конформационных затруднений при взаимодействии лиганд-рецептор. Для некоторых соединений этой серии продемонстрировано увеличение синтеза нейроактивных стероидов в мозгу [185], однако, ни одно из этих соединений не стало кандидатом в лекарственные препараты.

При помощи представленного Трапани с соавторами подхода был создан ряд новых лигандов TSPO, обладающих высокой аффинностью и селективностью. Одним из таковых явилось соединение CB-34, отличающееся от Алпидема наличием второго атома хлора в имидазопиридиновом цикле (рисунок 19) [28]:

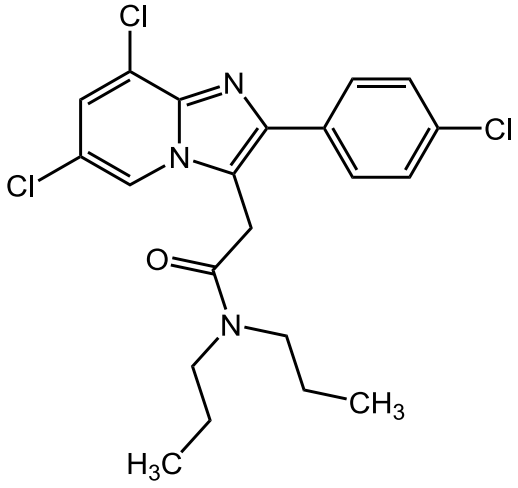


Рисунок 19 - Структура лиганда CB-34

В работе Serra с соавторами [28] было установлено, что CB-34 эффективно стимулирует нейростероидогенез, увеличивая концентрации прегненолона, прогестерона, аллопрегнанолона и аллотетрагидродеоксикортикостерона в плазме крови и мозге крыс. Также, в тесте Вогеля CB-34 проявляет выраженное антиконфликтное действие в дозах 25 и 50 мг/кг (в/б), сопоставимое по выраженности с эффектом диазепама в дозе 0.5 мг/кг [28].

1.4.2.5 Производные феноксифенилацетамида

Два производных феноксифенилацетамида, *N*-(4-хлор-2-феноксифенил)-*N*-(2-изопропоксибензил)ацетамид (DAA1097) и *N*-(2,5-диметоксибензил)-*N*-(5-фтор-2-феноксифенил)ацетамид (DAA1106), были получены путём раскрытия диазепинового цикла в

структуре лиганда Ro5-4864 и введением в молекулу дополнительного арильного заместителя, что позволило создать конформационно-свободные лиганды (рисунок 20) [186, 187].

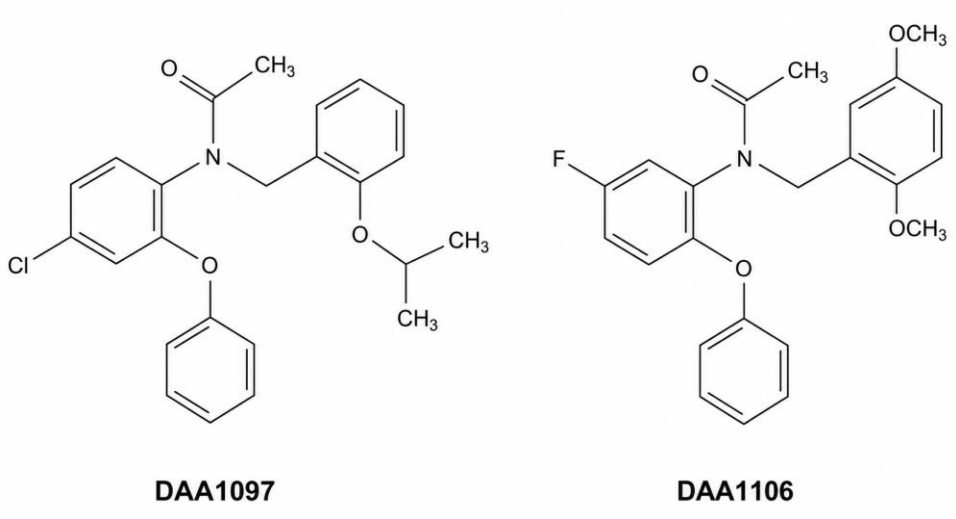


Рисунок 20 - Структуры лигандов феноксифенилацетамидного ряда, DAA1097 и DAA1106

Эксперимент по оценке связывания меченого соединения DAA1106 с митохондриальной фракцией кортекса обезьян резус показал [188], что высокое сродство этого соединения к TSPO сохраняется (K_d 0.426 нМ), что свидетельствует об отсутствии видоспецифичности его взаимодействия. Соединение DAA1106 показало наличие анксиолитической активности в эксперименте на грызунах в поведенческих тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Светло-темная камера» в дозах 0.1-3.0 мг/кг (перорально), не оказывая при этом, в отличие от препаратов сравнения, диазепама и буспирона, влияния на спонтанную двигательную активность [187]. Интересно отметить, что хотя эти два соединения, DAA1106 и DAA1097, имеют сходную структуру, сродство к TSPO, и также оба имеют анксиолитическую активность, их влияние на стероидогенез оказалось противоположным: только DAA1106 активировал стероидогенез в клетках Лейдига линии МА-10, клетках глиомы линии С6е2В и в митохондриях головного мозга крыс [187]. Соединение DAA1097 не индуцировало стероидогенез, несмотря на его высокое сродство к TSPO, авторы предположили, что различное влияние на стимуляцию стероидогенеза обусловлено разными конформационными изменениями рецептора, вызванными этими двумя лигандами [187].

1.4.2.6 Индолы

Производные 2-арилиндол-3-ацетамида FGIN-1-27 и FGIN-1-44 были предложены как селективные лиганды TSPO и охарактеризованы с использованием радиолигандных и поведенческих тестов (рисунок 21) [189-190]:

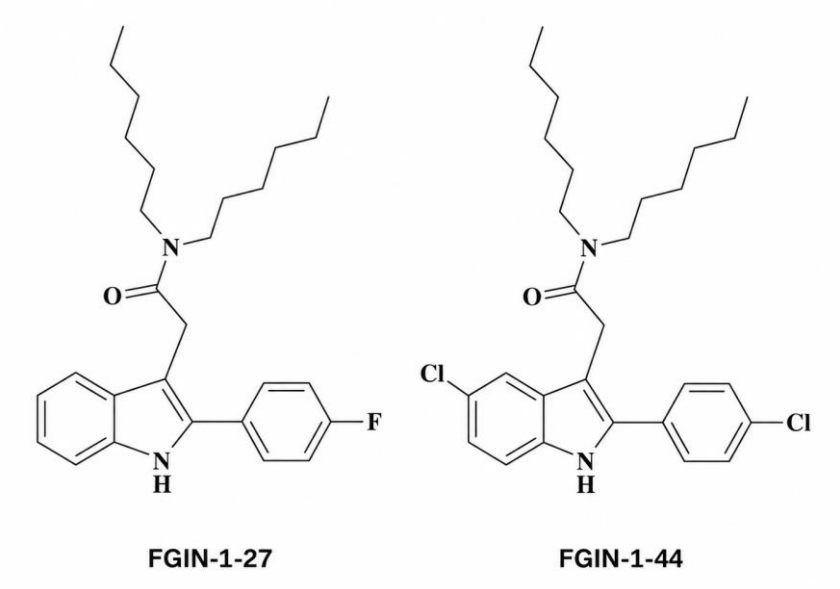


Рисунок 21 - Стуктура лиганда FGIN-1-27 и FGIN-1-44

Оба этих производных 2-арилиндол-3-ацетамида действовали как агонисты TSPO и тем самым стимулировали синтез прегненолона в изолированных митохондриях мозга крыс; этот эффект ингибировался антагонистом PK-11195 [190]. FGIN-1-27 и FGIN-1-44 обладали анксиолитической активностью тесте приподнятого крестообразного лабиринта при пероральном введении крысам, это действие снималось антагонистом TSPO PK-11195, но не снималось антагонистом ЦБР флумазенилом [190]. FGIN-1-44 в свою очередь, оказался в 3-4 раза более активным в тесте ПКЛ, чем FGIN-1-27, авторы обьясняют это тем, что FGIN-1-44 быстро метаболизируется во FGIN-1-27 в мозге крысы (продраг-подобное поведение), вследствие чего является более эффективным из-за его большей биодоступности [190].Также показано, что FGIN-1-27 стимулировал стероидогенез в клетоках Лейдига, выделенных из семенников возрастных (21 месяц) крыс [191].

Таким образом, на сегодняшний день 2-арилиндол-3-ацетамиды FGIN-серии используются в качестве инструментальных лигандов для изучения TSPO-зависимых механизмов тревоги и не были развиты в качестве лекарственных препаратов.

Соединение под шифром MPIGA появилось как представитель индол-содержащего семейства лигандов TSPO (часто обозначаемое как PIGA-хемотип), которое целенаправленно разрабатывали в начале 2000-х в качестве конформационно-жёстких аналогов индол-ацетамидных лигандов серии FGIN, с целью получить более высокую селективность лигандных свойств (рисунок 22) [192]:

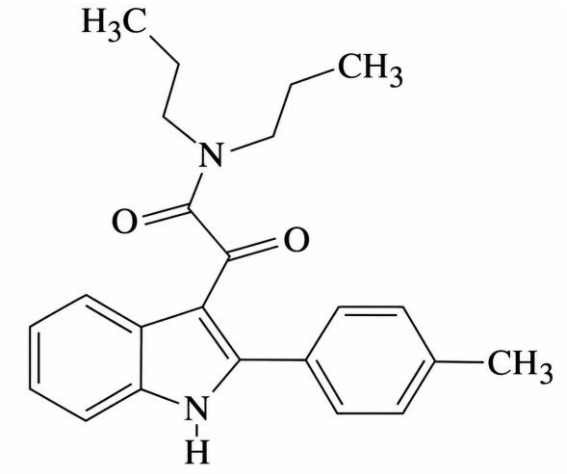


Рисунок 22 - Структура лиганда MPIGA

Соединение MPIGA проявляло нейростероидогенные свойства, характерные для лигандов TSPO [193]: в клетках астроцитомы линии ADF он стимулировал продукцию нейростероидов, в т.ч. метаболитов прегненолона. Авторами исследования [193] показано, что MPIGA проявляет анксиолитическое действие через стимуляцию нейростероидогенеза в глиальных клетках с последующей позитивной модуляцией $ГАМК_A$-рецепторов. В тесте ПКЛ на крысах MPIGA в дозе 30 мг/кг увеличивал число заходов и время в открытых рукавах, не влияя на спонтанную исследовательскую активность, что интерпретировано как анксиолитический эффект без седации [193].

1.4.2.7 Производные пурина

Лиганд TSPO ZBD-2 был синтезирован и изучен китайскими авторами (рисунок 23) [194].

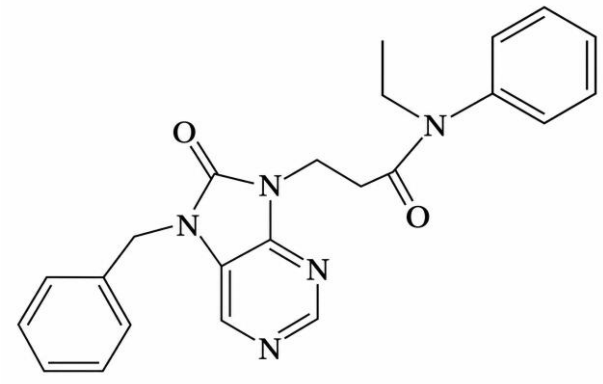


Рисунок 23 - Структура лиганда ZBD-2

ZBD-2 продемонстрировал [194] высокое сродство к TSPO, полученному из митохондрий мозга крысы в наномолярном диапазоне (K_i = 0.463 нМ). Было показано, что ZBD-2 (0.15 – 1.5 мг/кг) значительно ослабляет тревожное поведение у мышей с хронической воспалительной болью, вызванной инъекцией в заднюю лапу полного адъюванта Фрейнда (Freund’s Complete Adjuvant, FCA). Однако лечение не изменило порог ноцицепции или

воспаление в задней лапе. Электрофизиологическая запись показала, что ZBD-2 может предотвращать дисбаланс между возбуждающими и тормозными передачами в синапсах базолатеральной миндалины мышей, которым вводили CFA [194].

Китайскими исследователями Li с соавторами [195] был изучен анксиолитический и антидепрессантоподобный эффекты ZBD-2 в модели послеродовой депрессии (ПРД) на мышах. ПРД у мышей модулировали путём двусторонней овариэктомии. После недельного восстановления мышам вводили гормоны - эстрадиол и прогестерон в течение 23 дней для установления гормонально-симулированной беременности. ПРД у мышей развивалась, когда уровни эстрогена и прогестерона резко снижались. После чего проводили поведенческие тесты. Тест «Открытое поле» показал, что общее пройденное расстояние и время в центральной области были значительно снижены у мышей с ПРД по сравнению с контрольной группой. Показано [195], что ZBD-2 облегчал тревожно-подобное поведение, на что указывало увеличение общего пройденного расстояния и времени нахождения в центральной области установки. Антагонист TSPO PK-11195 блокировал эффект ZBD-2 на общее пройденное расстояние и время в центральной области. Тест ПКЛ показал, что количество входов в открытые рукава и время, проведенное в открытых рукавах, были заметно сокращены в ПРД-моделях. Введение ZBD-2 достоверно увеличивало количество входов в открытые рукава и время, проведенное в открытых рукавах лабиринта у мышей с ПРД. Эффекты в этом случае ZBD-2 также были заблокированы антагонистом PK-11195. В тестах вынужденного плавания и подвешивания за хвост ZBD-2 уменьшил время неподвижности мышей. Эффекты ZBD-2 были отменены PK-11195. Авторы отмечают [195], что эффекты ZBD-2 в дозе 1.5 мг/кг были сопоставимы с эффектами флуоксетина во всех поведенческих тестах.

1.4.2.8 Стероиды

Атриол (3,17,19-андростен-триол) представляет собой естественный стероидный гормон из группы эстрогенов, ранее считался лигандом-антагонистом TSPO, препятствующий связыванию холестерина путем воздействия на CRAC-домен, распознающего холестерин (рисунок 24) [196]:

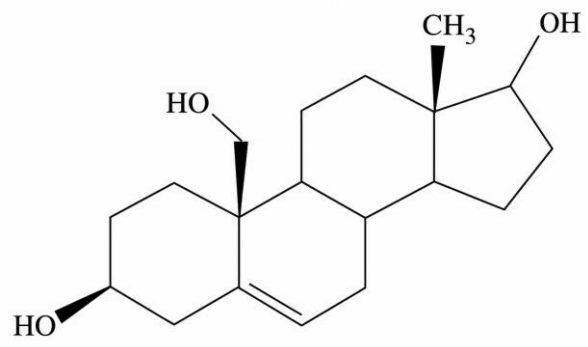


Рисунок 24 - Структура атриола

Исследования *in vivo* на крысах показали [197], что атриол может облегчить течение таких болезней как метаболически-ассоциированный стеатогепатит. В этом исследовании самцов крыс линии SD кормили высококалорийной диетой (40% жира, в основном пальмовое масло) в течение 10 месяцев, чтобы вызвать метаболически-ассоциированный стеатогепатит. В течение последних двух недель кормления крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили атриол. Обработка атриолом значительно улучшала состояние клеток печени животных за счет уменьшения накопления липидов, уменьшения печеночного воспаления и фиброза, уменьшения гибели клеток и ингибирования чрезмерного синтеза желчных кислот. Более того, атриол восстанавливал функцию митохондрий в первичных гепатоцитах [197].

Однако, на сегодняшний день нет убедительных данных, что атриол является селективным высокоаффинным лигандом TSPO и способен напрямую регулировать синтез нейростероидов. Скорее всего, его эффекты реализуются через ядерные эстрогеновые рецепторы, а любые влияния на митохондрии/стероидогенез носят косвенный характер.

1.5 Лиганды TSPO в клинических исследованиях

Этифоксин (etifoxine hydrochloride, торговое наименование Stresam) относится к производным бензоксазина, был разработан компанией Biocodex (Франция) в 1960-х годах как психотропное средство в рамках поиска небензодиазепиновых анксиолитиков (рисунок 25) [198, 199].

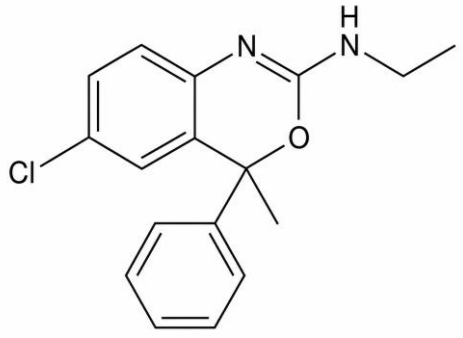


Рисунок 25 - Структура лекарственного препарата этифоксина, лиганда TSPO

Изучение механизма действия этифоксина показало [3, 200], что он является неселективным лигандом TSPO и осуществляет свои эффекты посредством двойного взаимодействия: как путем непосредственного связывания с $ГАМК_A$-рецепторами, так и с TSPO. На рекомбинантных $ГАМК_A$-рецепторах (экспрессия в ооцитах *Xenopus*) показано [200], что этифоксин является их положительным аллостерическим модулятором, причём

выраженность эффектов определяется составом рецептора и в значительной степени опосредуется β-субъединицами. Одновременный вклад TSPO рецептора в механизм действия этифоксина обосновали по данным связывания [201]: этифоксин в мембранах мозга крыс ингибировал связывание меченого [³H]-PK-11195, а также стимулировал образование нейростероидов в мозге и плазме крыс [201].

Изучение механизма действия этифоксина в клинике также показало [202], что его действие приводит к стимуляции биосинтеза эндогенных нейростероидов, в частности аллопрегнанолона, высокоэффективного аллостерического модулятора $ГАМК_A$-рецептора.

Этифоксин (Stresam) в настоящее время применяется как небензодиазепиновый анксиолитик, показанный для краткосрочного лечения расстройств адаптации, ситуационной депрессии, сопровождающейся тревогой и стрессом, авторизован, в частности, во Франции, Мальте, Болгарии и Румынии [203]. В США препарат не относится к числу зарегистрированных. Побочные эффекты, связанные с применением этифоксина, включают в себя сонливость, головную боль, кожные высыпания, аллергические реакции, в некоторых случаях этифоксин обладал тяжелой токсичностью для кожи и печени, а также провоцировал внутренние кровотечения [204]. Препарат не разрешен детям и подросткам в возрасте до 18 лет.

В 2002 году был разработан Алпидем-родственный лиганд TSPO, соединение SSR180575, представитель группы пиридазиноиндолов (рисунок 26) [205].

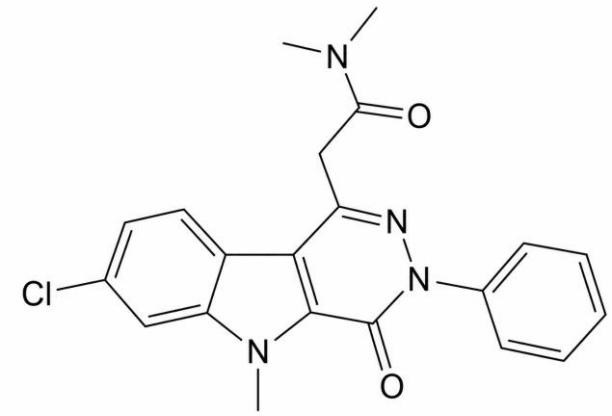


Рисунок 26 - Структура лиганда SSR180575 [205]

Авторы исследования [205] описывают SSR180575 как высокоаффинный и селективный лиганд TSPO (IC_{50} ~2.5–3.5 нМ в мембранах почек крысы и в линии клеток кератиноцитов человека), а также показывают *in vivo* ингибирование связывания меченого [³H]-Алпидема в мозге и селезёнке крыс. Также был показан [205] нейропротективный эффект лиганда SSR180575: после аксотомии лицевого нерва у детенышей крыс выживаемость мотонейронов

увеличивалась до 72% при пероральном введении, также SSR180575 увеличивал уровни прегненолона в мозге и седалищном нерве крыс.

Клиническая оценка SSR180575 ограничилась одной зарегистрированной программой КИ [206] в 2007 году - рандомизированным двойным слепым плацебо-контролируемым исследованием фазы II у пациентов с сахарным диабетом и лёгкой диабетической периферической нейропатией, инициированным Sanofi-Aventis. В дизайне сравнивали две дозы препарата с плацебо при лечении в течение 24 недель, а конечной точкой была скорость регенерации эпидермальных нервных волокон после капсаицин-индуцированной денервации. Результаты завершенного в 2009 году КИ не представлены, соединение не получило подтверждённого клинического применения.

Эмапунил (лабораторный шифр AC-5216, позднее XBD173) был получен в ходе направленного поиска небензодиазепиновых анксиолитиков, действующих через TSPO. Соединение разработано как производное пуринового гетероцикла японской группой ученых из Dainippon Pharmaceutical Co Ltd, (рисунок 27) [207]:

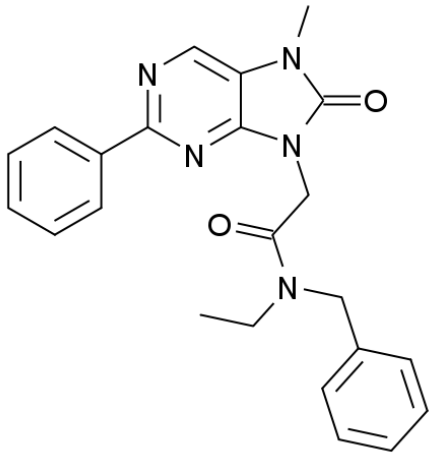


Рисунок 27 - Структура лиганда AC-5216 (XBD173, Эмапунил)

Авторы показали [207], что данное вещество обладает субнаномолярной аффинностью к TSPO и высокой селективностью, аффинность к TSPO AC-5216 была продемонстрирована в мозге крыс (K_i 0.297 нМ), клетках глиомы крыс (IC_{50} 3.04нМ) и в клетках глиомы человека (IC_{50} 2.73 нМ). В экспериментах по связыванию AC-5216 демонстрировал выраженное предпочтение к TSPO-богатым клеткам и практически не взаимодействовал с центральным бензодиазепиновым сайтом [207]. Анксиоитический эффект AC-5216 в поведенческих тестах подавлялся PK-11195 (классическим антагонистом TSPO), что интерпретируется как TSPO-зависимый механизм [207]. При повторном введении через 14 дней AC-5216 сохранял

анксиолитическое действие, а при отмене не вызывал поведенческих и соматических признаков синдрома отмены, в отличие от диазепама в соответствующих условиях [208].

Соединение AC-5216 доведено компанией Novartis до II фазы КИ в качестве средства для лечения генерализованных тревожных расстройств [209]. В этом неопубликованном исследовании AC-5216 не показал различий с плацебо в лечении тревожных расстройств. Отсутствие активности во II стадии КИ, возможно, связано с выбором неподходящей модели заболевания: CCK4-индуцированная тревога в большей степени моделирует панические расстройства, чем генерализованные тревожные расстройства [210].

Можно предположить, что неудачный исход КИ может быть связан с полиморфизмом, меняющим аффинность ряда лигандов TSPO (мутация Ala147Thr у человека). Для XBD173 в модельных системах показано [211] ≈5-кратное снижение аффинности к варианту Ala147Thr по сравнению с диким типом.

1.6 Нейростероиды и их биологические эффекты

1.6.1 Взаимодействие нейростероидов с ГАМК-ергической системой

Нейростероиды представляют собой класс эндогенных стероидов, синтезируемых в мозге, надпочечниках и половых железах. Термин «нейростероиды», первоначально предложенный физиологом E.Baulie [212], в настоящее время используется для обозначения стероидов, которые синтезируются в головном мозге.

Нейростероиды образуются из холестерина в результате нескольких последовательных ферментативных реакций. Было установлено, что расщепление боковой цепи холестерина с образованием прегненолона является первым этапом биосинтеза стероидов [63]. Эта реакция проходит на внутренней митохондриальной мембране и представляет собой ферментативное окислительное расщепление боковой цепи холестерина под действием фермента P450scc [213]. Затем прегненолон покидает митохондрию и транспортируется в эндоплазматический ретикулум, где подвергается дальнейшим ферментативным превращениям. Ферменты 3β-HSD (3β-гидроксистероиддегидрогеназа) и Δ^4-Δ^5-изомераза превращают прегненолон в прогестерон, который под действием 21-гидроксилазы превращается в деоксикортикостерон. Фермент 5α-редуктаза восстанавливает прогестерон и деоксикортикостерон в 5α-дигидропрогестерон и 5α-дигидродеоксикортикостерон, соответственно [214]. Эти пути подтверждены для мозга de novo из холестерина [215, 216].

Основными нейростероидами млекопитающих являются следующие: прегненанолон (PREG), аллопрегненалон (ALLO), дегидроэпиандростерон (DHEA), тетрагидродезоксикортикостерон (THDOC), андростерон, андростандиол, каскад их превращений схематично представлен на рисунке 28, адаптировано из работы [217].



Рисунок 28 - Каскад нейростероидогенеза млекопитающих, адаптировано из [217]

Нейростероиды обладают многочисленными физиологическими функциями, недостаток их синтеза связан с анксиогенезом, нейродегенерацией, нарушением процессов клеточной пролиферации, апоптозом [218-220] Нейростероиды высоко липофильны, вследствие чего они легко проникают через гематоэнцефалический барьер [221].

Нейростероиды имеют собственные участки связывания на $ГАМК_A$-рецепторах [22, 222], вызывая спектр эффектов, характерных для их положительной модуляции, представленного на рисунке 29, адаптированного из [22]:

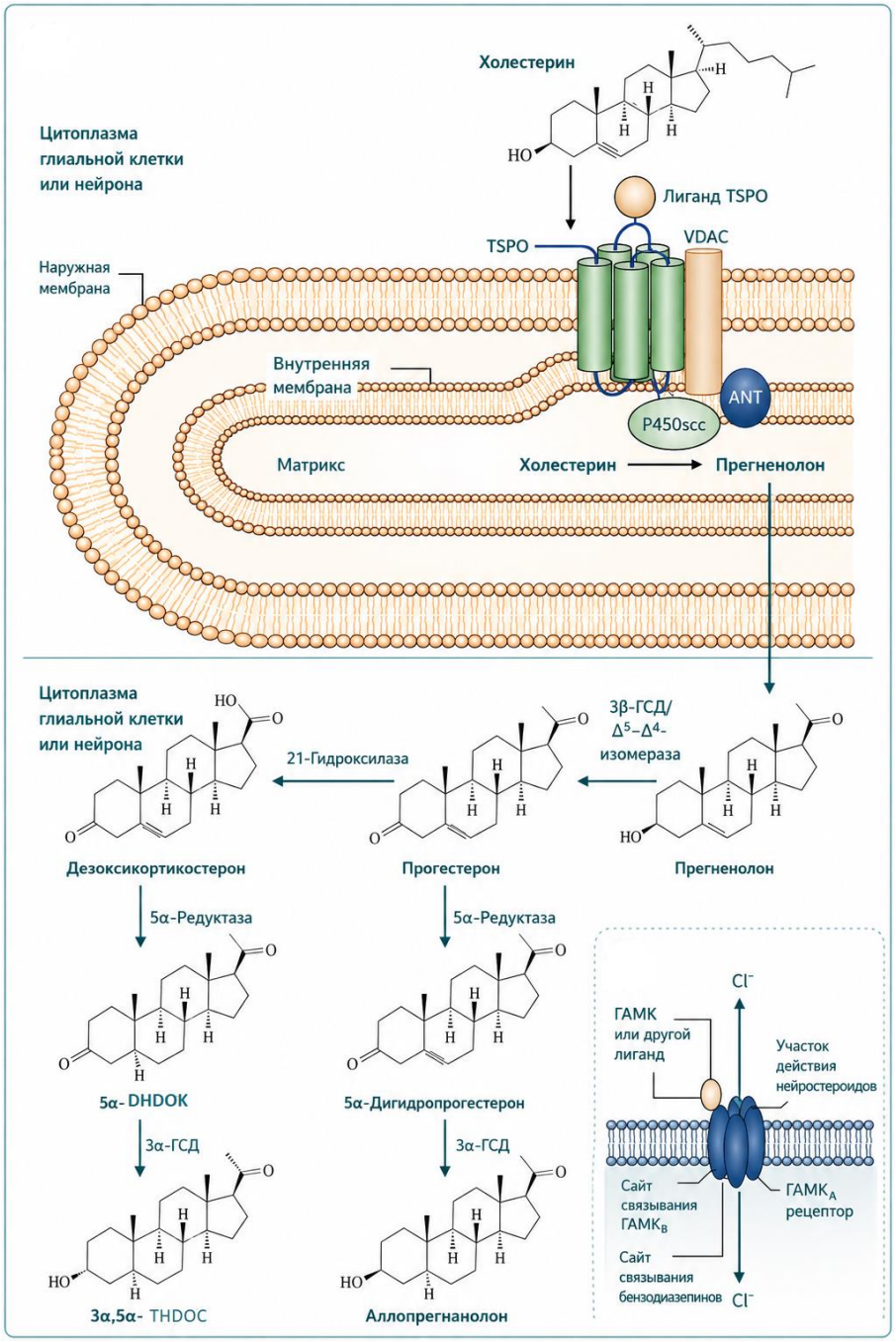


Рисунок 29 - Каскад нейростероидогенеза и механизм тормозного действия нейростероидов путем связывания аллопрегнанолона с ГАМК$_A$-рецептором, адаптировано из [22]

Также, помимо ГАМК$_A$, нейростероиды взаимодействуют с NMDA и AMPA рецепторами глутаматергической системы [223, 224], но основной интерес к нейростероидам обусловлен их способностью взаимодействовать именно с ГАМК-ергической системой и участвовать, тем самым, в регуляции эмоций, вовлекаясь в формирование тревожных и депрессивных состояний.

Аллопрегнанолон, также известный как тетрагидропрогестерон, представляет собой метаболит прогестерона, вырабатываемый под действием двух ферментов головного мозга: 5-альфа-редуктазы и 3-гидрокси-стероиддегидрогеназы. Аллопрегнанолон относится к наиболее

мощным положительным аллостерическим модуляторам $ГАМК_А$-рецепторов [225]. Через модуляцию $ГАМК_А$-сигналинга аллопрегнанолон реализует широкий спектр физиологических эффектов, включая анксиолитические, седативные, противосудорожные и нейропротективные [225, 226]. Этот нейростероид имеет низкую водную растворимость и биодоступность, что препятствует его развитию в качестве потенциального лекарственного препарата [227].

На животных моделях показано, что аллопрегнанолон и тетрагидродезоксикортикостерон имеют анксиолитическое [228, 229], антиконфликтное [230], противосудорожное [231] и антиноцицептивное действие [232].

В то время как повышение уровня нейростероидов в ответ на стресс является адаптивным в краткосрочной перспективе, животные модели хронического стресса и депрессии обнаруживают более низкие концентрации нейростероидов в мозге и плазме и изменения в реакциях нейростероидов на острые факторы стресса [233]. У людей истощение нейростероидов постоянно документируется у пациентов с текущей депрессией и может отражать более сильный хронический стресс [233]

Рецептор $ГАМК_А$ существует в виде множества изоформ, которые различаются по составу субъединиц и по-разному распределены в мозгу [234, 235]. Хотя эффекты нейростероидов, по-видимому, зависят от состава субъединиц $ГАМК_А$-рецептора, реальной специфичности по субъединицам не было обнаружено [236]. Предполагается, что сайт связывания для нейростероидов отличается от сайта связывания γ-аминомасляной кислоты, бензодиазепина и барбитурата [237].

Таким образом, ограничение использования нативных нейростероидов как потенциальных препаратов обусловлено не дефицитом фармакологической активности, а неудовлетворительными ADME-характеристиками, прежде всего пероральной доставкой. Это стимулировало разработку синтетических аналогов нейростероидов в качестве лекарственных средств с улучшенной пероральной биодоступностью и более предсказуемым фармакокинетическим профилем.

1.6.2 Применение производных нейростероидов в клинической практике

Брексанолон (торговое название Zulresso) биофармацевтической компании Sage Therapeutics одобрен в США для лечения ПРД [238]. Брексанолон представляет собой синтетический аллопрегнанолон (рисунок 30) [238]:

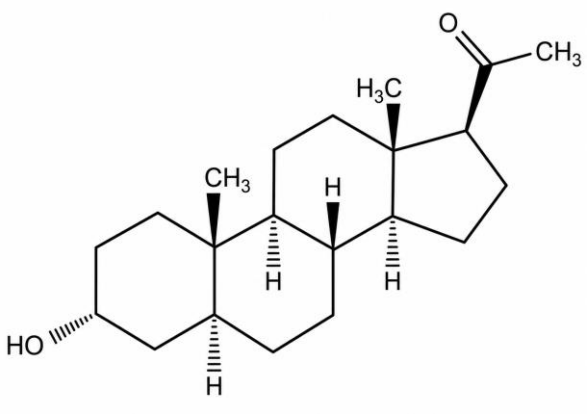


Рисунок 30 - Структура Брексанолона

ПРД - серьезное состояние, которое в тяжелой форме может быть опасным для жизни. У женщин могут возникать мысли о причинении вреда себе или своему ребенку, может проявляться такими симптомами, как когнитивные нарушения, чувства никчемности и вины или суицидальные мысли. Клиническая эффективность Брексанолона при ПРД была продемонстрирована [238] в рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях в т.ч. у пациенток с умеренно-тяжёлой и тяжёлой ПРД, где оценка депрессивной симптоматики проводилась стандартизованными шкалами.

Брексанолон демонстрировал [238] быстрый клинический эффект при ПРД: значимое снижение выраженности симптомов фиксировали уже в первые 24 ч инфузии, а первичная конечная точка оценивалась на 60 ч, эффект сохранялся в последующем наблюдении. В отличие от традиционной фармакотерапии ПРД, где первой линией обычно выступают СИОЗС и клинический ответ часто достигается в течение нескольких недель, Брексанолон оказывает раннее уменьшение симптоматики [238].

Из-за опасений по поводу серьезных рисков, включая чрезмерную седацию или внезапную потерю сознания во время введения, Брексанолон одобрен совместно со Стратегией оценки и смягчения рисков (Risk Evaluation and Mitigation Strategy, REMS) [239]. Также по данным FDA [239] требуется постоянный мониторинг, пульсоксиметрия и сопровождение пациентки при контакте с ребёнком. Частые побочные эффекты (≥5%): сонливость/седация, потеря сознания, сухость во рту, приливы.

В настоящее время Брексанолон коммерчески выведен с рынка, а FDA официально отозвало регистрацию (дата отзыва 14.04.2025), в связи с тем, что продукт не маркетировался.

Зуранолон (шифр SAGE-217), также разработанный в компании Sage Therapeutics - еще один синтетический нейростероид, потенциальный пероральный лекарственный препарат,

эффективность которого изучалась в клинике на пациентах с большим депрессивным расстройством (БДР), (рисунок 31) [240]:

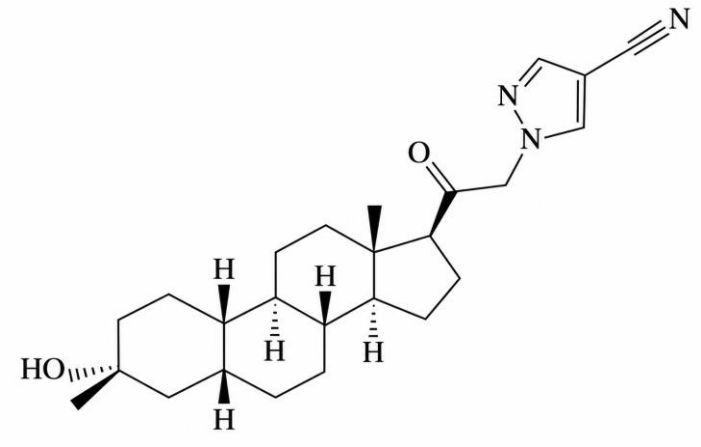


Рисунок 31 - Структура Зуранолона

БДР отличается наличием чувств печали и отчаяния, снижением способности получать удовольствие (ангедония), снижением мотивации, когнитивными проблемами и физиологическими проявлениями, влияющими на основные функции организма [241, 242].

В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы II у пациентов с БДР Gunduz-Bruce и соавторами [243] показали более высокую долю клинического ответа в группе Зуранолона по сравнению с плацебо (79% против 41%). Кроме того, частота ремиссии по шкале депрессии Гамильтона была существенно выше в группе зуранолона (64%) относительно плацебо (26%). Серьёзных побочных эффектов в ходе исследования не зарегистрировано [243]; наиболее частыми нежелательными реакциями на фоне зуранолона были головная боль, головокружение, тошнота и сонливость [243].

Зуранолон был разработан как усовершенствованная версия внутривенно вводимого Брексанолона, но с высокой пероральной биодоступностью и периодом полувыведения, подходящим для приема один раз в день [244, 245].

В 2023 году Зуранолон (торговое название Zurzuvae) был одобрен FDA для лечения ПРД [245]. Также FDA предупреждает о некоторых нежелательных эффектах приема Зуранолона, таких как нарушение способности к вождению и выполнению опасных действий. Зуранолон также был одобрен к применению и Европейской комиссией (разрешение на обращение от 17.09.2025) [246].

Ганаксолон (торговое название Ztalmy) - лекарственное средство, одобренное [247] для лечения эпилептических приступов, связанных с дефицитом циклинзависимой киназы-5 (CDKL5) у пациентов от 2 лет и старше (рисунок 32) [247, 248]:

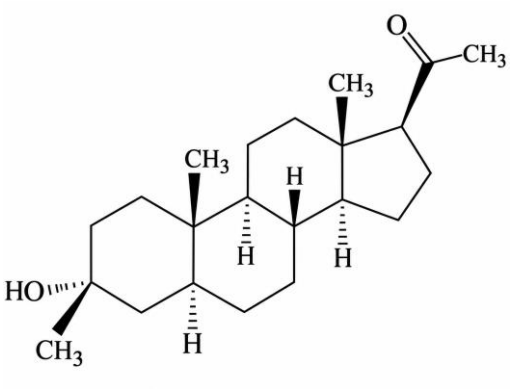


Рисунок 32 - Структура Ганаксолона

Ганаксолон - метилированный аналог аллопрегнанолона, который усиливает фазовое (синаптическое) и тоническое (экстрасинаптическое) торможение через участок связывания, отличный от бензодиазепинового [249]. Двойная слепая рандомизированная плацебо-контролируемая фаза III клинических исследований у пациентов 2–21 года с дефицитом CDKL5 и рефрактерными приступами показала, что препарат действует как положительный аллостерический модулятор $ГАМК_A$-рецептора, что приводит к ингибирующему действию на нейротрансмиссию [248, 250, 251].

По данным FDA препарат является федерально контролируемым в США (Список V) [252]. Формат приёма: пероральная суспензия 50 мг/мл, приём 3 раза в день с пищей; титрация по массе тела. Частые нежелательные реакции по сведениям FDA: сонливость, седация, лихорадка, гиперсаливация**,** ОРВИ/ринит, сезонная аллергия, возможны нарушения походки, печеночная недостаточность, риск суицидальных мыслей.

Альфаксалон (торговая марка Альфаксан) представляет собой синтетическое производное прогестерона, анестетик общего назначения, который в настоящее время одобрен в некоторых странах Европы и Азии в ветеринарной практике в качестве инъекционного анестетика (рисунок 33) [253, 254]:

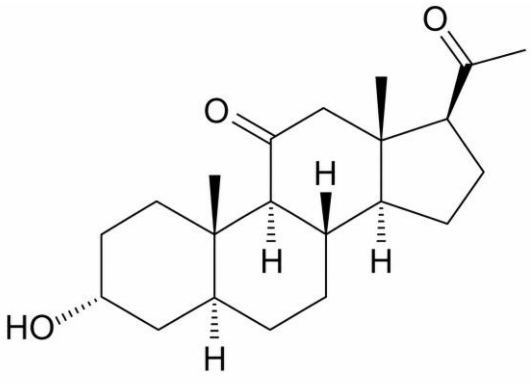


Рисунок 33 - Структура Альфаксалона

Альфаксалон действует как положительный аллостерический модулятор на $ГАМК_А$ рецепторы и в высоких концентрациях как прямой агонист рецептора $ГАМК_А$ [255].

Наиболее частым побочным эффектом альфаксалона является угнетение дыхания, включая апноэ, также дозозависимая гипотензия, рефлекторная тахикардия, дисфория/возбуждение [256, 257]. Не даёт клинически значимой анальгезии, для болезненных манипуляций всегда добавляют дополнительный анальгетик [258].

Можно также отметить, что для всех препаратов класса нейростероидов показано [259], что их длительное применение в качестве снотворных средств приводит к компенсаторным механизмам, которые, в конечном счете, ведут к зависимости.

1.7 Влияние TSPO и его лигандов на митохондриальные процессы

Митохондрии - двумембранные клеточные органеллы, в которых энергия окисления субстратов преобразуется в АТФ за счёт работы дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования [260]. В матриксе митохондрий за счет реакций цикла трикарбоновых кислот формируются восстановленные переносчики электронов (НАДФ-Н), которые затем окисляются, создавая протонный градиент и мембранный потенциал, используемые АТФ-синтазой [260, 261]. Митохондрии участвуют в метаболизме ацил-CoA и кетоновых тел, в биогенезе гема и железосерных кластеров, в регуляции кальциевого гомеостаза, генерации ROS, а также в запуске апоптоза, митофагии, иммунного ответа. Дисфункция митохондрий вовлечена в широкий спектр заболеваний [262-264].

Как компонент наружной мембраны митохондрий, TSPO опосредует в том числе и митохондриальное дыхание, проницаемость мембран, открытие пор, механизмы апоптоза и пролиферации клеток [265]. Следует отметить, что роль TSPO в большинстве этих функций была открыта с помощью меченных лигандов [102, 103, 116], и только некоторые функции были непосредственно продемонстрированы методом нокаута [79].

TSPO влияет на энергетический метаболизм в митохондриях, в частности на мембранный потенциал и скорость потребления кислорода, играя роль в клеточном дыхании [266]. Было показано, что TSPO также взаимодействует с белковым комплексом митохондриальной поры (mPTP), состоящим из VDAC и переносчика адениннуклеотида (ANT), и способствует образованию реактивных форм кислорода (ROS), замедлению гомеостаза Ca^{2+} и выработке АТФ. Фосфорилирование VDAC меняет проницаемость наружной митохондриальной мембраны для Ca^{2+}, АДФ/АТФ и дикарбоксилатов, сдвигает митохондриально-цитозольные Ca^{2+}-градиенты и тем самым управляет как дыхательной нагрузкой, так и ROS-сигналингом [266].

Кратковременное (обратимое) открытие mPTP защищает клетки от окислительного повреждения и обеспечивает отток ионов Ca^{2+} из митохондриального матрикса. Однако долговременное (необратимое) открытие вызывает процессы, ведущие к гибели клеток [131, 266] Хотя существуют разногласия относительно взаимодействия TSPO, VDAC1 и ANT, поскольку mPTP открывается и в отсутствие этих белков, многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что они все еще потенциально вовлечены в формирование пор mPTP и в каскад апоптоза [267].

В работе [268] показано, что при ишемии накапливается сукцинат, в реперфузию его быстрое окисление генерирует обратный транспорт электронов, при котором электроны в дыхательной цепи перемещаются от доноров к акцепторам, против градиента окислительно-восстановительных потенциалов, что провоцирует всплеск ROS. Также было установлено [269], что лиганд-антагонист, соединение PK-11195, защищает кардиомиоциты только при введении в реперфузию, уменьшая использование сукцината и генерацию супероксид-аниона, а также улучшает перераспределение субстратов, что вызывает снижение доставки сукцината через VDAC при сохранении мембранного потенциала. Этот эффект иллюстрирует, что часть анти- и прооксидантных эффектов лигандов TSPO проявляется в узких временных окнах и связывает TSPO напрямую с контролем потоков, задающих работу дыхательной цепи при тревожных состояниях и состояниях острого стресса.

В работах [270-272] сообщалось, что Ro5-4864 индуцирует апоптоз в некоторых линиях человеческих и мышиных раковых клетках и тимоцитах, в частности, путем воздействия на мембранный потенциал митохондрий. Также лиганд Ro5-4864 подавлял активацию потока Ca^{2+}, продукцию ROS и активацию сигнального пути PI3K оцениваемую по фосфорилированию Akt в положении Ser473 [273].

Для лигандов TSPO XBD173 и этифоксина показана [274] способность сдвигать холестериновый гомеостаз, что меняет состав внешней и внутренней митохондриальных мембран. Переизбыток митохондриального холестерина (mChol) ухудшает текучесть мембраны, нарушает митохондриальное дыхание и повышает уровень ROS, нормализация уровня mChol и фосфолипид-зависимых контактов митохондриальных мембран уменьшает окислительный стресс [274].

Профилактика или уменьшение выраженности энергетического кризиса, вызванного черепно-мозговой травмой (ЧМТ), путём регуляции активности mPTP привлекает всё большее внимание [275, 276]. Воздействие возрастающих концентраций кальция на изолированные митохондрии мозга крысы воссоздает патофизиологические состояния, вызванные ЧМТ и характеризующиеся накоплением кальция в митохондриальном матриксе с последующим

рассеиванием митохондриального трансмембранного потенциала, и поэтому считается принятой моделью открытия mPTP [276, 277].

В работе [276] показано, что пагубное влияние кальция на способность митохондрий к окислительному фосфорилированию может быть уменьшено инкубацией митохондриальных гранул с этифоксином за 30 мин до добавления кальция. Этифоксин приводил к значительному улучшению когнитивных функций у крыс, выражавшемуся в более быстром восстановлении в водном лабиринте Морриса [276]. Эти данные демонстрируют выраженный нейропротекторный потенциал лигандов TSPO при лечении ЧМТ посредством восстановления способности к окислительному фосфорилированию [276, 277].

Лиганды FGIN-1-27 и YL-IPA08 чаще нормализуют дисбалансы (гиперфункция/воспаление), чем увеличивают скорость дыхания. Например, исследование [278] было направлено на выяснение изменений в функциональности астроцитов и митохондрий после радиационного воздействия, с особым акцентом на оценку потенциальных улучшающих эффектов лигандов TSPO. Радиация запускает митохондриальную гиперфункцию, повышает мембранный потенциал митохондрий и увеличивает продукцию окислительных метаболитов. Однако после обработки FGIN-1-27, лигандом TSPO, наблюдалось восстановление функции митохондрий и снижение продукции окислительных метаболитов. Более того, это вмешательство смягчило гиперактивность астроцитов, уменьшило количество нейротоксичных астроцитов типа A1 и восстановило пролиферативную способность клеток [278].

Новые структурно-биохимические данные описали TSPO-опосредованную окислительную деградацию Протопорфирина IX [279], тогда как генетические исследования у позвоночных показали, что TSPO не обязателен для порфирин-индуцированной фототоксичности — то есть его вклад очень тканеспецифичен [280].

1.8 Заключение

Анализ литературы показывает, что митохондриальный белок TSPO является многофункциональным регулятором, вовлечённым как в транспорт холестерина, так и в сопряжённый с ним нейростероидогенез, обмен порфириновых предшественников и биосинтез гема, нейровоспаление и клеточные ответы на стресс, в том числе и окислительный.

В настоящее время получен широкий спектр фармакологических данных об эффектах эндогенных и синтетических лигандов TSPO, способных модулировать его функции. Исторически развитие синтетических лигандов TSPO началось с бензодиазепиновых структур (Ro5-4864), затем были созданы небензодиазепиновые «эталонные» молекулы (PK-11195), а также серии на основе имидазопиридинов (Алпидем и производные), феноксифенилацетамидов

(DAA1097/DAA1106), индольных производных (FGIN-1-27/FGIN-1-44) и других гетероциклических структур. Для ряда соединений показаны анксиолитические, нейропротекторные и антидепрессант-подобные эффекты, а также показан TSPO-зависимый механизм действия (фармакологический ингибиторный анализ) и связь с нейростероидогенезом.

Однако сопоставление данных по различным классам выявляет принципиальные ограничения использования синтетических лигандов и производных нейростероидов в клинике. Классическая бинарная классификация «агонист-антагонист» для TSPO часто недостаточна. PK-11195 в литературе описывается как антагонист по отношению к эффектам ряда лигандов, при определённых условиях он сам по себе блокирует стероидогенез. Одновременно PK11195 в ряде моделей способен проявлять агонистические свойства в больших дозах. Это подчёркивает сложность интерпретации его фармакологических эффектов исключительно через призму конкуренции за активный сайт TSPO.

Клиническое применение синтетических лигандов различных гетероциклических классов остается ограниченным. Даже высокоселективные лиганды (например, Эмапунил/XBD173) не всегда демонстрируют эффективность во II фазе в выбранных моделях; для ряда кандидатов в препараты клинические программы завершались без опубликованных результатов. Дополнительно, опыт Алпидема показал, что оптимизация аффинности без учёта метаболической безопасности может приводить к неприемлемой токсичности.

Эти обстоятельства формируют актуальный запрос на новые химические классы лигандов TSPO, для которых можно одновременно оптимизировать фармакологический профиль, селективность, безопасность и предсказуемость метаболизма, воспроизводимость эффектов.

Таким образом, митохондриальный белок TSPO может представлять собой перспективную цель для разработки быстродействующих анксиолитиков класса дипептидов, с более благоприятным фармакологическим профилем и отсутствием побочных эффектов, присущих ныне существующим синтетическим лигандам TSPO и лекарствам на основе нейростероидных гормонов.

ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Молекулярный дизайн и синтез N-ацил- триптофансодержащих дипептидов, потенциальных лигандов дипептидных лигандов TSPO

2.1.1 Дизайн

В лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» в течение уже долгого времени развивается оригинальная методология [35, 36] создания высокоактивных, нетоксичных, физиологичных лекарственных соединений на основе дипептидов, топологически близких непептидным лекарственным средствам, получившая название drug-based peptide design (DBPD). За счет низкого молекулярного веса и наличия системы активного транспорта дипептиды способны проникать через биологические барьеры, а из-за малого числа связей, которые могли бы служить мишенями для протеаз, энзиматически стабильны вплоть до возможности перорального применения. Наконец, они просты в синтезе и дешевы в производстве.

В данной работе для дизайна дипептидных лигандов TSPO методом DBPD в качестве непептидного прототипа мы использовали анксиолитический препарат Алпидем (2-фенил-имидазо[1,2-а]пиридин-3-ацетамид) [180, 181], обладающий наномолярной аффинностью к TSPO [281], стимулирующий стероидогенез [180] и проявляющий анксиолитическую активность в доклинических экспериментах [180] и в клинике [282, 283]. Алпидем изначально был разработан в конце 1980-х годов во Франции фирмой Synthélabo Recherche [181], но уже через два года после вывода его на рынок были зарегистрированы тяжёлые случаи поражения печени [182, 183], такие как острый гепатит, печёночная недостаточность, летальный исход, что привело к изъятию Алпидема из оборота. Мы предположили, что дипептидные топологические аналоги Алпидема не будут обладать гепатотоксичностью.

Структура Алпидема 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. Таким образом, Алпидем может быть проимитирован трипептидными последовательностями: -Phe-Trp-Ile- или -Phe-Trp-Leu-. На основании этих трипептидных последовательностей были сконструированы следующие замещенные дипептиды, потенциальные лиганды TSPO: амид *N*-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина

(лабораторный шифр ГД-23) и амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (лабораторный шифр ГД-102) (рисунок 34).

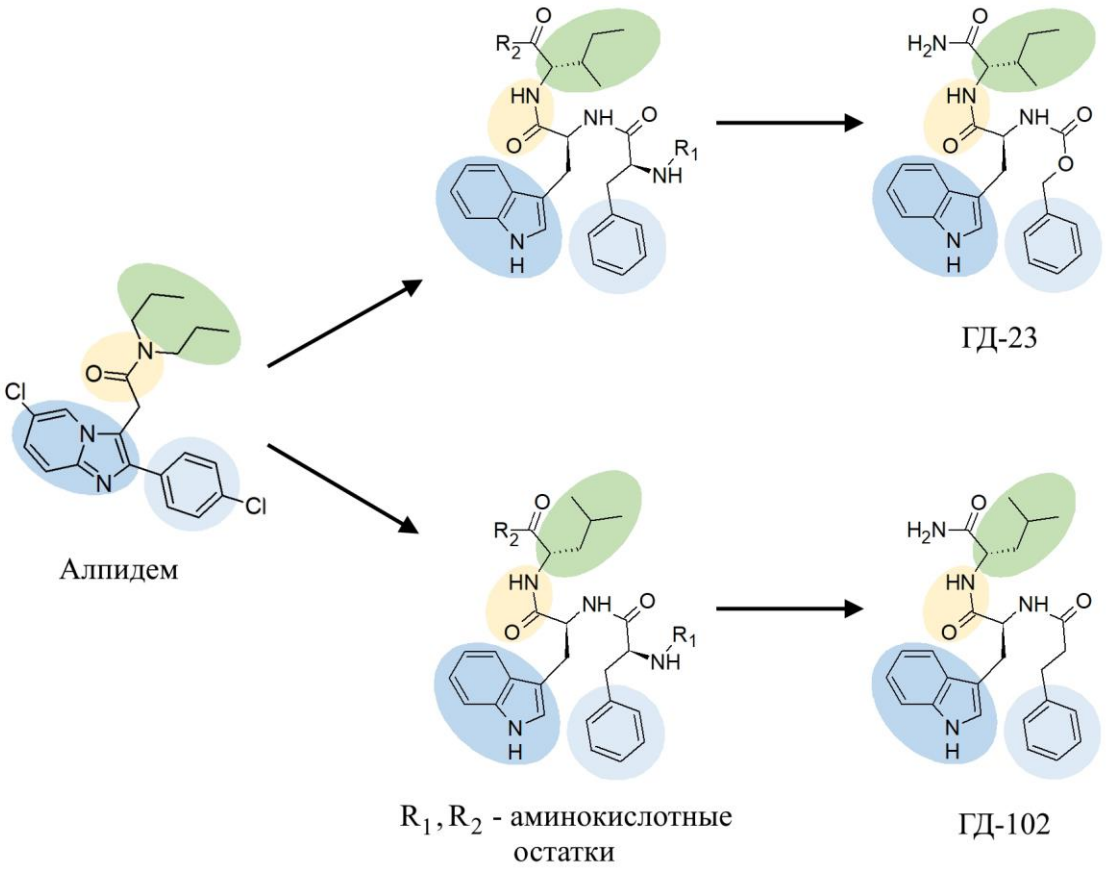


Рисунок 34 - Дизайн потенциальных дипептидных лигандов TSPO, соединений ГД-23 и ГД-102, на основе структуры Алпидема

При конструировании потенциальных дипептидных лигандов TSPO на основе трипептидных последовательностей мы сохранили неизменными остатки триптофана и изолейцина (лейцина), которые расположили в последовательности -Trp-Ile- (для ГД-23) и -Trp-Leu- (для ГД-102). Остаток фенилаланина мы заменили биоизостером, изоморфными ему бензилоксикарбонильной (для ГД-23) и фенилпропионильной (для ГД-102) группами (см. рисунок 34). У этих остатков, как и в Алпидеме и в предполагаемой трипептидной последовательности, отсутствовала заряженная аминогруппа. Следующий за Ile (Leu) возможный остаток представлен амидной группой, благодаря чему, как и в Алпидеме, отсутствует отрицательно заряженная карбоксильная группа. Поскольку Алпидем содержит симметричный алифатический фрагмент, мы ожидали, что *N*-фенилпропионил-L-Trp-L-Leu-NH_2 (ГД-102), содержащий в своей структуре лейцин, окажется активнее, чем *N*-бензилоксикарбонил-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23), содержащий изолейцин.

Для верификации лигандных свойств сконструированных дипептидов ГД-23 и ГД-102 проводили их молекулярное докирование в активный сайт связывания TSPO. Для этого использовали пространственную структуру мышиного TSPO в комплексе с лигандом PK-11195 (PDB ID: 2MGY) [23]. Центр докирования задавали по положению PK-11195 в кармане TSPO. Докинг проводили в режиме полужёсткого расчёта (rigid receptor/flexible ligand) с помощью модуля Glide пакета Schrödinger [284, 285]. Для последующего анализа параметра E-model отбирали комплексы с оценками G-score-функции, соответствующими минимумам вблизи глобального, то есть наиболее энергетически предпочтительным позам. Эти величины отражают расчётную энергию связывания (таблица 1).

Таблица 1. Показатели оценочной функции G-score и расчетные энергии взаимодействия для лигандов TSPO, дипептидов ГД-23, ГД-102, непептидного прототипа Алпидема и модельного лиганда PK-11195

Лиганд	Glide G-score	Glide Emodel, ккал/моль
ГД-102	−9.6	−71.97
ГД-23	−8.76	−52.85
Алпидем	−8.89	−66.73
PK-11195	−8.56	−58.25

Как видно из таблицы 1, сконструированные потенциальные дипептидные лиганды ГД-23 и ГД-102 в сравнении с Алпидемом демонстрируют близкие значения оценочной функции Glide G-score при докировании в сайт связывания TSPO. Это указывает на то, что обе сконструированные молекулы дипептидов, как и Алпидем способны встраиваться в лиганд-связывающий карман TSPO в энергетически предпочтительных конформациях.

При этом наиболее предпочтительные показатели получены для дипептида ГД-102: его значение Glide G-score составило -9.6, тогда как для Алпидема и ГД-23 оно было -8.89 и -8.76 соответственно. Поскольку более отрицательные значения функции G-score соответствуют энергетически выгодному связыванию в кармане рецептора, полученные результаты позволяют предположить, что дипептид ГД-102 может обладать большей комплементарностью к TSPO, чем ГД-23 и Алпидем. Дополнительным аргументом в пользу этого вывода служит величина параметра Glide E-model, который учитывает не только вклад энергии межмолекулярного взаимодействия, но и энергию геометрической укладки лиганда в кармане рецептора. Для ГД-102 значение E-model оказалось наиболее отрицательным (−71.97 ккал/моль) по сравнению с

Алпидемом (−66.73 ккал/моль) и ГД-23 (−52.85 ккал/моль). Можно предположить, что комплекс TSPO с дипептидом ГД-102 характеризуется наиболее выгодной совокупностью ван-дер-ваальсовых, электростатических и конформационных межмолекулярных взаимодействий.

Характеристики интерфейса рецептор-лиганд (площадь контактной поверхности, полярные и аполярные вклады, водородные связи и возможные ионные взаимодействия) оценивали с использованием сервиса PISA [286]. Распределение площадей контакта по аминокислотным остаткам интерфейса TSPO практически одинаково для всех трёх соединений (Алпидема, ГД-23 и ГД-102). Наибольшие площади контакта наблюдаются у Ala23, Val26, Trp143 и Leu150 (рисунок 35).

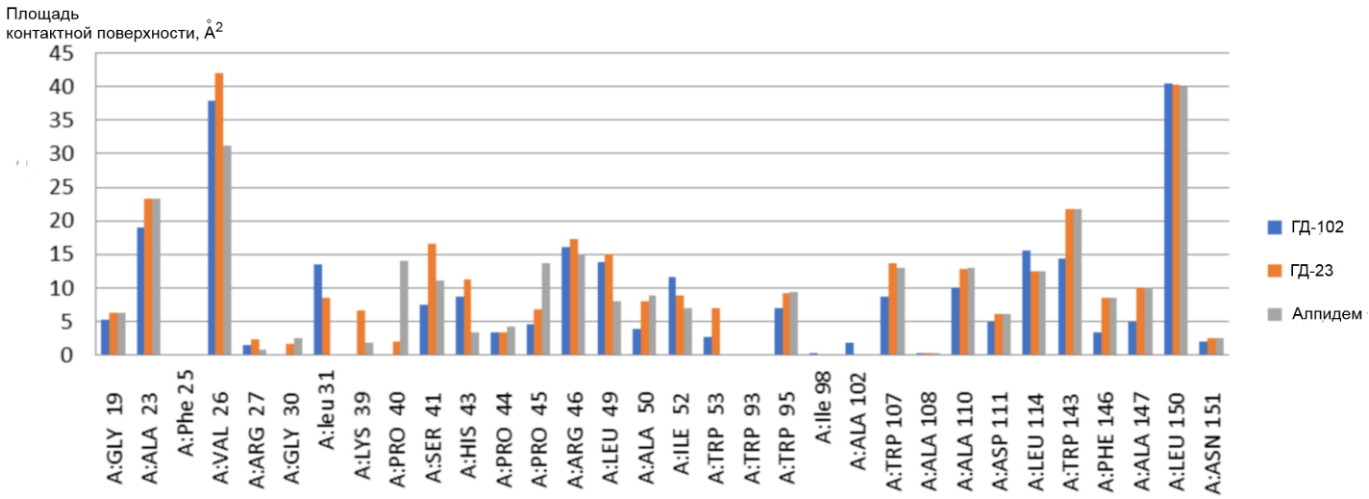


Рисунок 35 - Аминокислотные остатки, контактирующие с отдельными фрагментами дипептидных лигандов TSPO, ГД-23 и ГД-102, Алпидема

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 (рисунок 36):

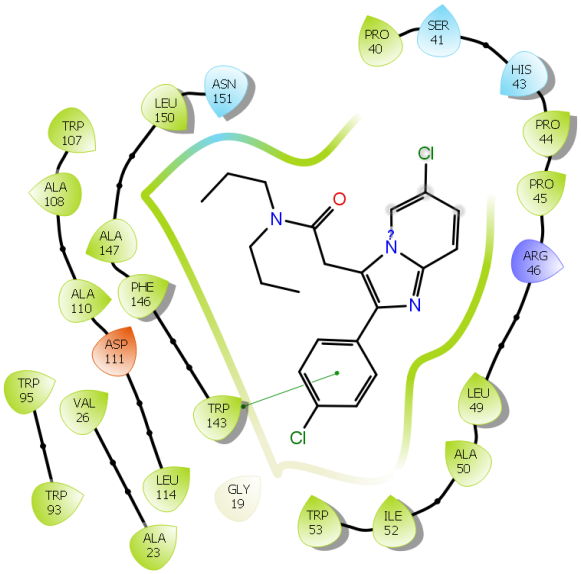


Рисунок 36 - 2D-проекция положения Алпидема в активном центре TSPO

Молекула ГД-23 докируется в зону связывания TSPO так, что боковая группа триптофана (индольный фрагмент) окружена остатками Ala23, Leu49, Trp95, Leu114, His43, Ala147. Фенил бензилоксикарбонильной группы связан с Val26, Ser41, Trp143, Arg46 и Trp107. Боковая цепь изолейцина (алифатический фрагмент) окружена Val26, Trp95, Trp107, Ala110, Leu114, Ala147 и Leu150. Карбонил основной цепи Ala147 образует гидрофильный контакт с С-концевой амидной группой ГД-23 (рисунок 37):

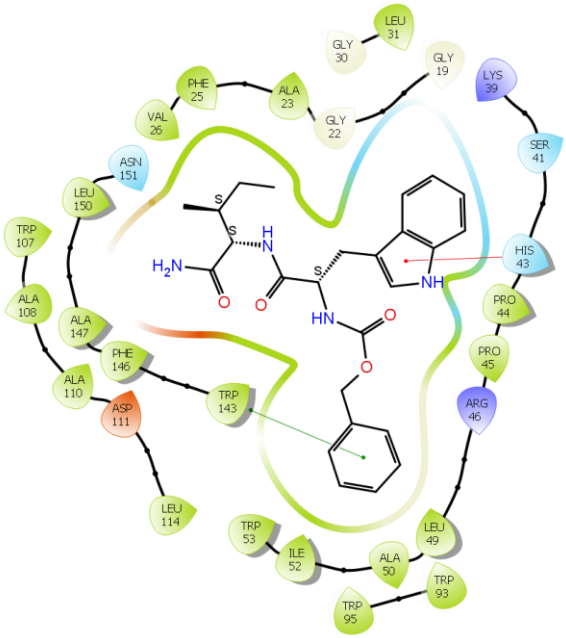


Рисунок 37 - 2D-проекция положения дипептида ГД-23 в активном центре TSPO

У ГД-102 боковая группа остатка триптофана контактирует с Ala23, Val26, Leu31, Arg46, Leu49. Фенильное ядро N-ацильной группы имеет контакты с Ala23, Ile52, Leu114.

Алифатическая часть – с Ala23, Val26, Ala110 и Leu150. Карбонил Ala147 образует гидрофильный контакт с С-концевой амидной группой. CO-группа основной цепи His43 образует водородную связь с NH-группой пирролидинового кольца триптофана (рисунок 38):

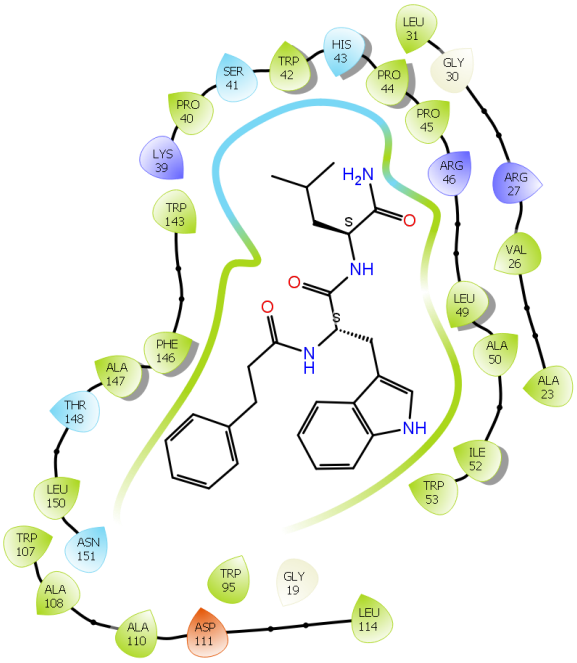


Рисунок 38 - 2D-проекция положения дипептида ГД-102 в активном центре TSPO

Таким образом, рассчеты в Glide подтверждают, что наибольшие контактные площади для всех трёх соединений приходятся на Ala23, Val26, Trp143 и Leu150.

При наложении Алпидема на молекулу ГД-23 (рисунок 39) совмещаются их алифатические фрагменты.

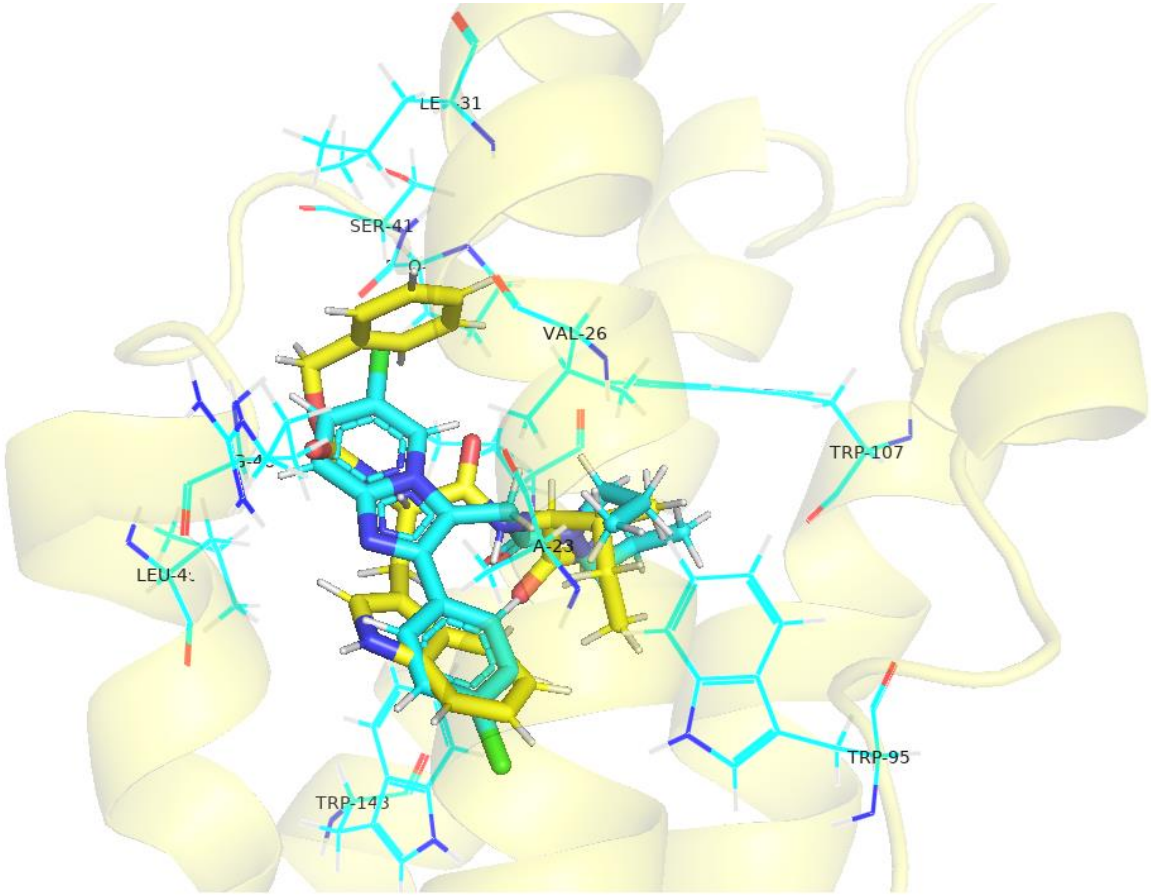


Рисунок 39 - Наложение докированных в TSPO конформаций Алпидема и ГД-23. Желтый цвет- ГД-23, голубой – Алпидем. Контактирующие остатки TSPO показаны проволочными фигурами

Фенильное ядро *N*-бензилоксикарбонильной группы ГД-23 совмещается с бициклическим ядром Алпидема. При этом плоскости ароматических ядер располагаются под углом 90 градусов друг к другу. Боковая группа триптофанового остатка ГД-23 налагается на фенильное ядро Алпидема. Окружение фенильного ядра ГД-23 воспроизводит окружение бициклического ядра Алпидема (за исключением остатков Ala23 и Leu49, не входящих в окружение фенила ГД-23, и остатка Leu31, отсутствующего в окружении бицикла Алпидема), а окружение боковой группы остатка триптофана ГД-23 почти не отличается по набору от окружения фенильной группы Алпидема, за исключением остатков Leu49, Phe46 и Ala147, не входящих в окружение последней.

В то же время наложение молекулы ГД-102 на Алпидем (рисунок 40) в задокированной конформации приводит к попарному совмещению бициклических, фенильных ядер и алифатических частей молекулы.

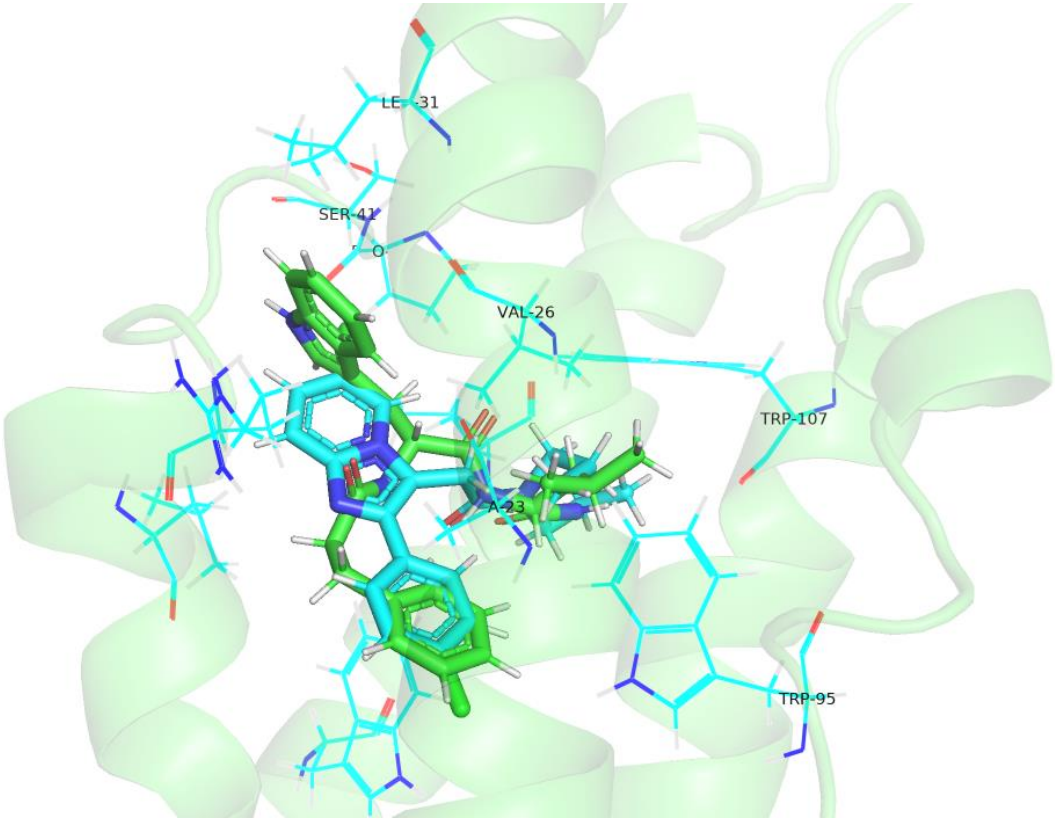


Рисунок 40 - Наложение докированных в TSPO конформаций алпидема и ГД-102. Зеленый цвет – ГД-102, голубой – Алпидем. Контактирующие остатки TSPO показаны проволочными фигурами

Соединение ГД-102 располагается в зоне связывания TSPO близко к тому, как располагается Алпидем. Наибольшее различие касается их бициклических ядер, располагающихся под углом 90 градусов друг к другу. Интерфейсы Алпидема и ГД-102 очень похожи как по составу, так и по распределению контактной поверхности по остаткам рецептора. Наибольшая площадь контактов приходится на Ala23, Val26, Leu150 и Trp143. Из остатков триптофана TSPO наибольшую площадь контактов с ГД-102 имеет Trp143, далее идут Trp107 и Trp95.

Дипептиды ГД-23 и ГД-102 налагаются друг на друга так, что фенильные ядра этих молекул совмещаются с индолильными (рисунок 41).

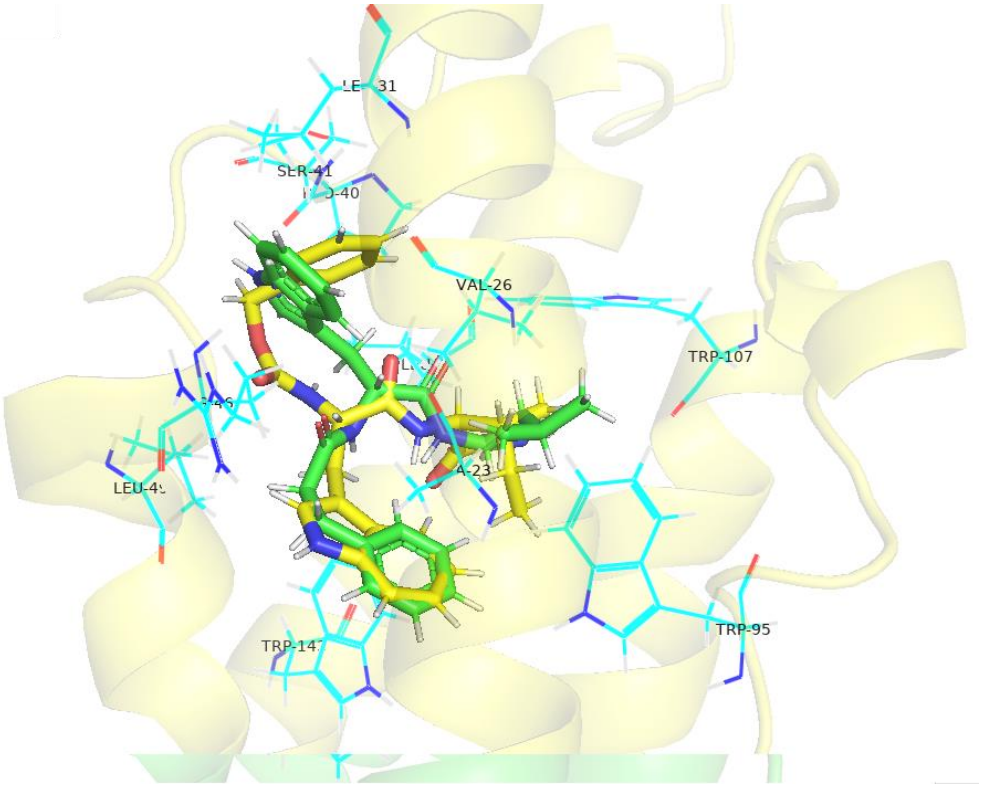


Рисунок 41 - Наложение докированных в TSPO конформаций ГД-102 и ГД-23. Желтый цвет – ГД-23, зеленый – ГД-102. Контактирующие остатки TSPO показаны проволочными фигурами

Сходным образом у ГД-23 и ГД-102 расположены только боковые группы лейцина и изолейцина. Фенильное ядро ГД-23 расположено перпендикулярно индольному ядру ГД-102. Такие серьезные изменения, скорее всего, связаны с различной природой *N*-ацильного заместителя (бензилоксикарбонильной группы и фенилпропионильной у ГД-23 и ГД-102 соответственно).

Таким образом, данные докинга свидетельствуют в пользу того, что оба сконструированных дипептидных соединения ГД-23 и ГД-102 могут являться лигандами рецептора TSPO.

2.1.2 Синтез

Для изучения влияния конфигурации аминокислотных остатков на фармакологическую активность сконструированных дипептидов нами также были проведены конструирование и синтез их стереоизомеров.

Сконструированные замещенные дипептиды ГД-23 и ГД-102 и их стереоизомеры были синтезированы классическими методами пептидного синтеза в растворе. Наращивание пептидной цепи осуществляли преимущественно методом активированных эфиров, с использованием *N*-гидроксисукцинимида [287]. Широко используемые в синтезе

активированные *N*-оксисукцинимидные эфиры из-за невысокой степени активации избирательнее реагируют с аминокомпонентом, по сравнению с методом смешанных ангидридов и карбодиимидным методом, которые могут приводить к побочному *N*-ацильному производному по аминогруппе или образованию О-ацил-изомочевины. Степень рацемизации при использовании активированных эфиров минимальна или рацемизация вовсе отсутствует. Следует также отметить, что сукцинимидные активированные эфиры чаще всего легко выделить в кристаллическом виде, с выходами 80–95%, они удобны для хранения и дозирования в практике пептидного синтеза. Метод хорошо согласуется с задачей получения серии близких аналогов, например, при варьировании одного а.о. при неизменном другом.

Лейцин (изолейцин и глицин) защищали с использованием Boc-защиты (*tert*-butoxycarbonyl) по аминогруппе. Boc-защитная группа - классическая временная защита α-аминогруппы, легко удаляемая кислотой (обычно трифторуксусной), что удобно на стадии получения С-концевого амида аминокислоты (через аммонолиз активированного эфира) с последующим быстрым деблокированием.

Z-защитная группа (бензилоксикарбонильная) при триптофане предпочтительнее Boc-защитной группы, так как для Trp-содержащих интермедиатов важна минимизация жёстких кислотных и окислительных воздействий на индольное ядро. Применение Z-защиты и её удаление каталитическим гидрогенолизом позволяет избегать длительных сильных кислотных воздействий на поздних стадиях, что является стандартной тактикой в классическом пептидном синтезе в растворе.

Все полученные вещества очищались либо кристаллизацией, либо с помощью хроматографических методов. Строение и диастереомерная чистота синтезированных пептидов были подтверждены методами одномерной $^{1}H,^{13}C$ и двумерной (COSY – гомоядерная корреляция, HSQC - гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC - гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии.

2.1.2.1 Синтез дипептидного лиганда TSPO амида N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23) и его стереоизомеров

Синтез Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23) осуществляли с использованием *N*-защищенных аминокислот, получая их *N*-гидроксисукцинимидные эфиры по методике Андерсона [287].

В начале синтетического пути получали Boc-защищенный изолейцин по стандартной методике Позднева [288], ацилируя Boc-ангидридом изолейцин в щелочной среде. Полученный Boc-L-Ile-OH переводили в активированный сукцинимидный эфир (Boc-L-Ile-OSu), реакцией с *N*-гидроксисукцинимидом (Su-OH) в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC), затем активированный сукцинимидный эфир изолейцина подвергали аммонолизу раствором

разбавленного водного аммиака в ДМФА с образованием Boc-L-Ile-NH_2. Затем защитную Boc-группу удаляли трифторуксусной кислотой в дихлорметане, получая трифторацетат амида изолейцина (TFA*[L-Ile-NH_2]) в кристаллическом виде. Далее получали сукцинимидный эфир *N*-карбобензокси-триптофана (Z-L-Trp-OSu). Трифторацетат амида изолейцина нейтрализовывали разветвленным (для предотвращения рацемизации) амином в растворе ДМФА, затем свободный по аминогруппе амид изолейцина ацилировали активированным эфиром триптофана (Z-L-Trp-OSu) с получением защищенного амида Z-L-Trp-L-Ile-NH_2.

С целью выявления влияния конфигурации аминокислотных остатков ГД-23 на анксиолитическую активность были получены его D,L- и L,D-стереоизомеры:

Z-D-Trp-L-Ile-NH_2 и Z-L-Trp-D-Ile-NH_2 (ГД-25 и ГД-69 соответственно).

Синтетический путь получения стереоизомеров осуществляли аналогично синтезу ГД-23, меняя одну из исходных L-аминокислот на ее D-изомер:

- для получения Z-**D**-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-25) синтезировали Z-D-Trp-OSu и конденсировали его с H-L-Ile-NH_2.
- для получения Z-L-Trp-**D**-Ile-NH_2 (ГД-69) осуществляли цепочку превращений:
  Boc-D-Ile-OH → Boc-D-Ile-OSu → Boc-D-Ile-NH_2 → соль TFA*[H-D-Ile-NH_2] и её конденсацию с Z-L-Trp-OSu.

Синтез дипептида ГД-23 и его стереоизомеров представлен на рисунке 42:

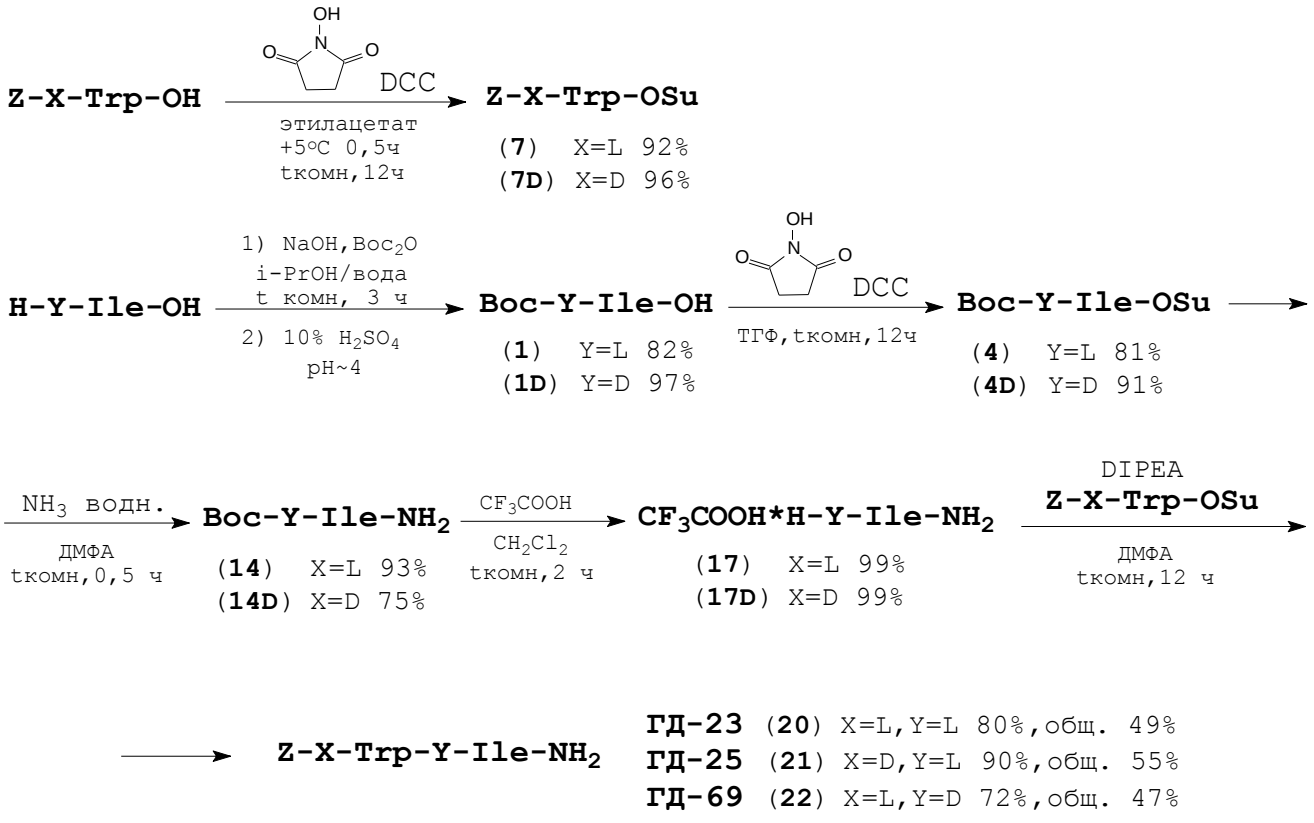


Рисунок 42 - Синтез потенциального дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-23 и его стереоизомеров ГД-25 и ГД-69

2.1.2.2 Синтез потенциального дипептидного лиганда TSPO N-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина (ГД-102) и его стереоизомеров

ГД-102 был сконструирован на основе ранее полученного дипептидного лиганда TSPO, амида *N*-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23), и представляет собой *N*-ацилированный триптофансодержащий дипептид – амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина. Для синтеза ГД-102 и его аналогов также был применен классический метод пептидного синтеза в растворе через предварительно получаемые активированные *N*-гидроксисукцинимидные эфиры (-OSu).

В начале синтетического пути получали Boc-защищенный лейцин по стандартной методике Позднева [288], ацилируя лейцин Boc-ангидридом в щелочной среде. Полученный Boc-L-Leu-OH переводили в активированный сукцинимидный эфир (Boc-L-Leu-OSu) реакцией с *N*-гидроксисукцинимидом (Su-OH) в присутсвии дициклогексилкарбодиимида (DCC), который затем подвергали аммонолизу раствором разбавленного водного аммиака в ДМФА с образованием амида Boc-L-Leu-NH_2. Затем защитную Boc-группу удаляли ацидолизом трифторуксусной кислотой в дихлорметане, получая трифторацетат амида лейцина, TFA*[L-Leu-NH_2].

Далее карбоксильную группу Z-L-Trp-OH активировали, получая активированный эфир *N*-карбобензокси-триптофана (Z-L-Trp-OSu). Трифторацетильную соль амида лейцина (TFA*[L-Leu-NH_2) обрабатывали разветвленным (для предотвращения рацемизации) амином в растворе ДМФА, затем незащищённый по аминогруппе амид лейцина ацилировали активированным эфиром Z-L-Trp-OSu, получая защищенный амид дипептида, Z-L-Trp-L-Leu-NH_2. Использование предварительно выделенного Z-L-Trp-OSu, а не длительной in situ-активации кислоты в присутствии основания и аминокомпонента, снижает возможную степень рацемизации на данной стадии. Z-группу удаляли каталитическим гидрогенолизом в метаноле с Pd-катализатором, получая свободный дипептид H-L-Trp-L-Leu-NH_2. Фенилпропионовую кислоту переводили в активированный сукцинимидный эфир ($Ph(CH_2)_2C(O)$-OSu). После чего незащищенный дипептид H-L-Trp-L-Leu-NH_2 ацилировали активированным эфиром фенилпропионовой кислоты, получая целевой замещенный дипептид ГД-102. На этой стадии использование предварительно выделенного активированного эфира $Ph(CH_2)_2C(O)$-OSu снижает возможную степень рацемизации.

Для оценки влияния конфигурации а.о. получали следующие стереоизомеры:

- ГД-128: *N*-фенилпропионил-**D**-Trp-L-Leu-NH_2.
- ГД-123: *N*-фенилпропионил-L-Trp-**D**-Leu-NH_2.

Синтез обоих стереоизомеров проводили аналогично синтезу дипептида ГД-102, заменяя соответствующий L-изомер аминокислоты на его D-изомер (рисунок 43).

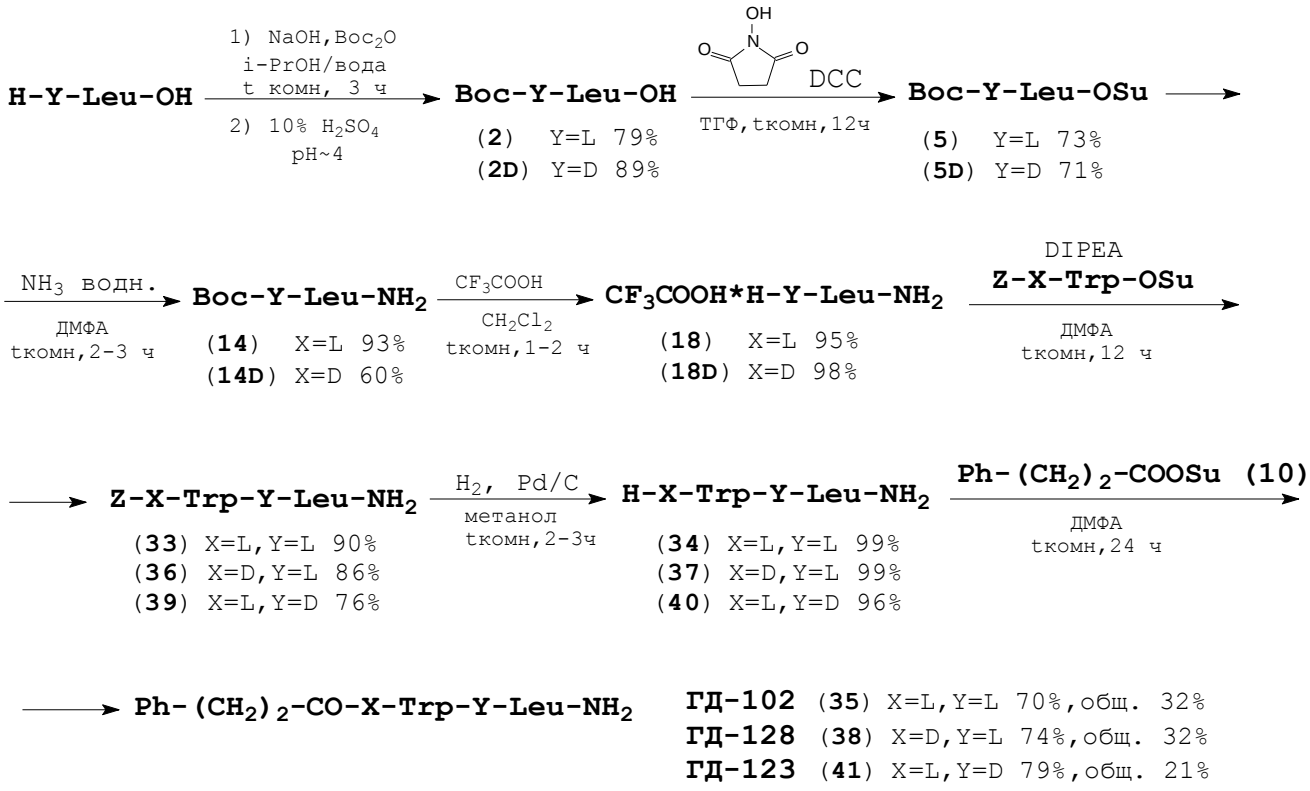


Рисунок 43 – Синтез потенциального дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-102 и его стереоизомеров ГД-128 и ГД-123

2.2 Выявление анксиолитической активности дипептидов ГД-23 и ГД-102[1]

К фармакологическому анализу синтезированных соединений приступили, исходя из того, что Алпидем [181] и многие другие лиганды TSPO обладают выраженной анксиолитической активностью.

Анксиолитическая активность для ГД-23 и ГД-102 была изучена в классических валидированных фармакологических тестах: в тесте ярко освещенного открытого поля на мышах BALB/c, отличающихся высоким базовым уровнем тревожности [289], а также в приподнятом крестообразном лабиринте на беспородных мышах CD-1 (ICR), также широко использующихся в этом тесте [290].

[1] Здесь и далее исследование анксиолитической активности в тестах ОП и ПКЛ выполнено совместно с лабораторией фармакогенетики, зав. лаб. академик РАН Середенин С.Б., научная группа д.м.н. профессора РАН Ярковой М.А., ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

2.2.1 Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой на мышах BALB/c на мышах

Тест «Открытое поле» (ОП, Open Field, OF) широко используется для оценки влияния эмоционального стресса на поведение грызунов [291-293]. В работе применена методика открытого поля со световой вспышкой, при которой стресс формируется как реакция животного на перенос из темноты на ярко освещенную арену и основан на естественном стремлении грызунов избегать ярко освещенных мест [293]. Количество пересеченных линий на поверхности установки и частота вертикальных стоек, которые обычно используются для оценки локомоторной активности, также позволяют оценить исследовательскую активность и тревожность. Высокая частота этих проявлений указывает на повышенную локомоцию и исследовательскую активность, и при этом более низкий уровень тревожности.

Во время тестирования фиксировали число пересеченных животным 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 обозначали как общую двигательную активность (ОДА). О наличии анксиолитического эффекта у соединения судили по увеличению ОДА.

Анксиолитическую активность дипептида ГД-23 изучали в тесте ОП в интервале доз 0.05-5.00 мг/кг при внутрибрюшинном (в/б) введении у мышей BALB/c. Показано, что этот дипептид обладает активностью в дозах 0.05; 0.1; 0.5 и 1.0 мг/кг с наиболее выраженным эффектом в дозе 0.1 мг/кг (таблица 2).

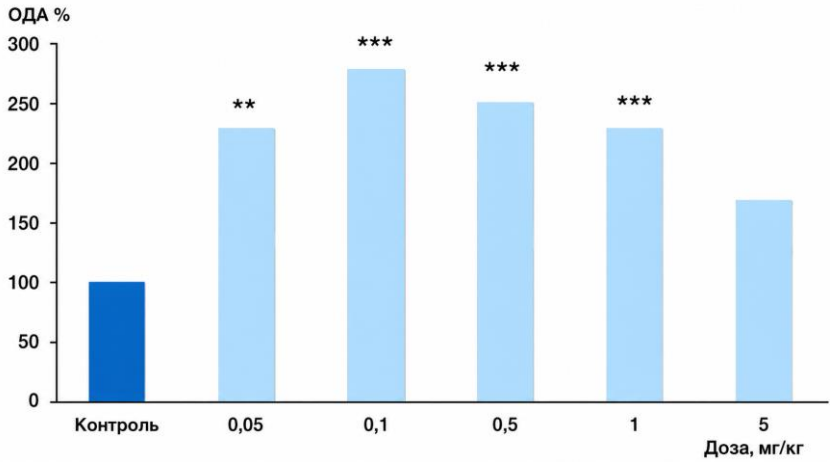
Таблица 2 - Анксиолитическая активность дипептида ГД-23 в тесте ОП у мышей BALB/c при внутрибрюшинном введении

Дозы ГД-23, мг/кг, в/б	ПА	ЦА	Ц	В	ОДА	% ОДА
Контроль	16.00 (9.30)	0.25 (0.45)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	16.25 (9.22)	100
0.05	29.67 (9.24)**	7.67 (5.05)***	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	**37.33** (14.04)**	**230**
0.1	38.13 (20.48)**	6.75 (4.94)***	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	**44.88** (19.66)***	**276**
0.5	35.50 (8.33)***	5.63 (5.97)**	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	**41.13** (13.05)***	**253**
1.0	35.00 (19.76)*	2.38 (2.20)*	0.00 (0.00)	0.13 (0.35)	**37.38** (19.96)***	**230**
5.0	27.00 (13.79)	0.38 (0.52)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	27.38 (13.88)	169
p(ANOVA)	0.0042	0.000	1	1	0.0004	

Примечание: ПА – количество секторов, пересеченных на периферии, ЦА – количество секторов, пересеченных в центре, Ц – количество выходов в центр, В – количество вертикальных стоек, ОДА – общая двигательная активность,

** p<0.01, *** p<0.001 статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно согласно непараметрическому критерию ANOVA и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Красным цветом выделены достоверные значения

Как видно из таблицы 2 и рисунка 44, эффект имеет куполообразную форму дозовой зависимости, что характерно для пептидов [294, 295]. В обзоре Calabrese [294] показано наличие горметической (куполообразной, или U-инвертированной) дозовой зависимости у более чем 30 пептидов, относящихся к основным классам эндогенных регуляторов. Для регуляторных пептидов максимально действующая доза нередко лежит в узком диапазоне, а повышение дозировки может приводить к потере эффекта или даже к противоположному действию. Алпидем, в свою очередь, не обладал классическим гормезисом в исследованиях доза-эффект на мышах [296], узкий интервал его действующих доз можно обьяснить потерей специфичности действия в высоких дозах из-за моторных, седативных и токсических эффектов.



Примечание: ** p<0.01, *** p<0.001 статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно согласно непараметрическому критерию ANOVA и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони

Рисунок 44 - Анксиолитическая активность соединения ГД-23 в тесте «Открытое поле со световой вспышкой» на мышах BALB/c при внутрибрюшинном введении имеет куполообразную зависимость

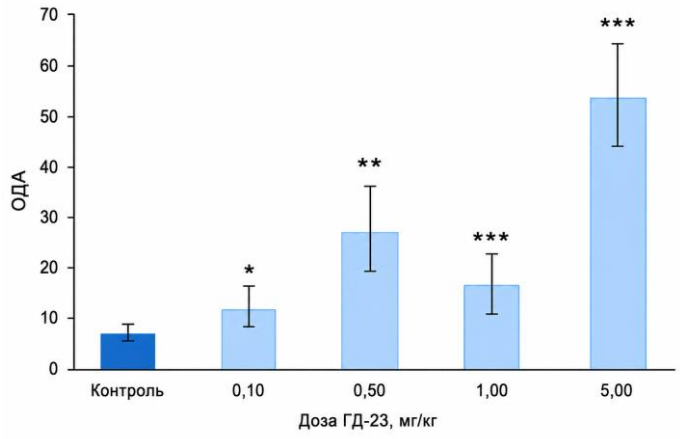
Соединение ГД-23 было дополнительно изучено в тесте открытого поля со световой вспышкой при пероральном введении мышам линии BALB/c. ГД-23 сохранял анксиолитическую активность при пероральном введении в дозах 0.1–5.0 мг/кг (таблица 3).

Таблица 3 - Анксиолитическая активность соединения ГД-23 в тесте «Открытое поле со световой вспышкой» на мышах BALB/c при пероральном введении.

Дозы ГД-23, мг/кг, перорально	ПА	ЦА	Ц	В	ОДА	% ОДА
Контроль	7.25 (2.31)	0.50 (1.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.75 (2.92)	100
0.1	11.00 (3.55)(0.038)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	**11.63*** (3.70)(0.038)	**150**
0.5	26.13 (18.21)(0.0006)	0.50 (0.76)	0.13 (0.35)	0.13 (0.35)	**26.75**** (18.57)(0.0019)	**345**
1.0	16.50 (7.76)(0.0001)	0.75 (1.49)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	**17.25***** (8.97)(0.0001)	**223**
5.0	51.88 (24.12)(0.0001)	4.50 (5.95)(0.038)	0.13 (0.35)	0.25 (0.46)	**53.75***** (27.46)(0.0001)	**694**
pANOVA	0.0000	0.0657	0.5447	0.3477	0.0001	

Примечание: ПА – количество секторов, пересеченных на периферии, ЦА – количество секторов, пересеченных в центре, Ц – количество выходов в центр, В – количество вертикальных стоек, ОДА – общая двигательная активность,* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно непараметрическому критерию ANOVA и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Красным цветом выделены достоверные значения

Полученные результаты показали, что ГД-23 проявляет наиболее выраженную активность в дозе 5.0 мг/кг при пероральном введении, увеличивая значения ОДА в семь раз по сравнению с контрольной группой (таблица 3, рисунок 45).



Примечание: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно непараметрическому критерию ANOVA и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони

Рисунок 45 - Анксиолитическая активность соединения ГД-23 в тесте «Открытое поле со световой вспышкой» на мышах BALB/c при пероральном введении

Интересно отметить, что при в/б введении наиболее активные дозы для дипептида ГД-23 были 0.1 и 0.5 мг/кг, в то время как при пероральном введении активная доза возросла до 5.0 мг/кг.

2.2.2 Анксиолитическая активность дипептида ГД-102 в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой на мышах

Дипептид ГД-102 был изучен на наличие анксиолитической активности в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой при внутрибрюшинном введении в интервале доз 0.01 – 5.0 мг/кг.

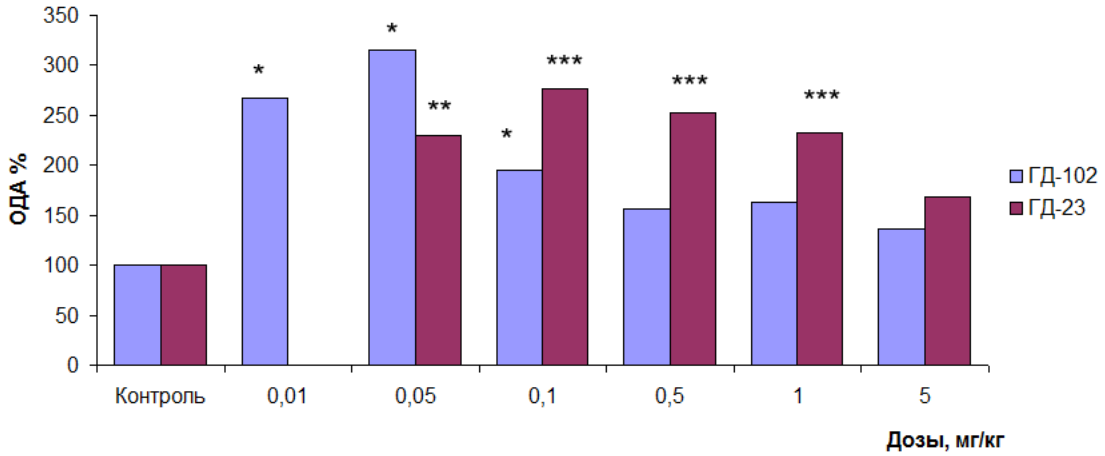
ГД-102 проявил эффект в интервале доз 0.01-1.0 мг/кг в/б у мышей BALB/c (таблица 4), что на пол порядка меньше таковых для ГД-23 (рисунок 46).

Таблица 4 - Анксиолитическая активность дипептида ГД-102 в тесте ОП у мышей BALB/c при внутрибрюшинном введении.

Дозы ГД-102. мг/кг	ПА	ЦА	Ц	В	ОДА	%ОДА
Контроль 1	15.88 (7.75)	0.50 (0.53)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	16.38 (8.07)	100
0.01	36.75 (14.35)*	6.25 (6.88)*	0.25 (0.46)	0.50 (0.53)	**43.75** (19.11)*	**267**
0.05	47.50 (20.45)*	3.75 (4.06)	0.00 (0.00)	0.50 (0.53)	**51.75** (22.99)*	**316**
Контроль 2	5.50 (3.51)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	5.50 (3.51)	100
0.1	10.75 (4.46)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	**10.75** (4.46)*	**195**
0.5	8.50 (3.07)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.63 (3.16)	157
1.0	8.00 (3.63)	1.00 (1.41)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.00 (3.78)	163
5.0	7.13 (3.56)	0.38 (1.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.50 (3.21)	136
p (ANOVA)	0.0868	0.0363	1.000	1.000	0.0911	

Примечание: Данные представлены в виде M(SD), где M-среднее арифметическое; SD-стандартное отклонение; * $p<0.05$(статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно непараметрическому тесту ANOVA и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Красным цветом выделены достоверные значения

Дополнительно, куполообразную дозовую зависимость анксиолитического эффекта обоих дипептидов ГД-23 и ГД-102 иллюстрирует рисунок 46:



Примечания: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони)

Рисунок 46 - Зависимость анксиолитического эффекта дипептидов ГД-23 и ГД-102 от дозы, выраженная в виде процентного увеличения общей двигательной активности мышей BALB/c в отличие от контрольной группы животных

Как видно из рисунка 46, максимальный анксиолитический эффект соединения ГД-102 достигается в дозе в 10 раз меньшей по сравнению с таковой для ГД-23, что находится в согласии с полученными методом молекулярного докинга более высокими расчетными энергиями связи с TSPO: −71.97 кКал/моль для ГД-102 и −52.85 кКал/моль для ГД-23 (см. таблицу 2).

2.2.3 Анксиолитическая активность дипептидов ГД-23 и ГД-102 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах

Анксиолитический эффект обоих дипептидов, ГД-23 и ГД-102, был подтвержден в тесте ПКЛ у мышей CD-1.

Тест приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) считается 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 поисковой активности в новой обстановке с другой. В соответствии с характерными для лабораторных мышей формами поведения, анксиолитическая активность определялась по увеличению процента времени пребывания животных в открытых рукавах и увеличению процента числа заходов в открытые рукава [297].

Здесь и далее в тесте ПКЛ результаты представляли в виде отношения времени пребывания мышей в открытых рукавах (T_o) к суммарному времени пребывания животных в открытых и закрытых рукавах ($T_o+T_з$) лабиринта в процентах:

$$Время_в_открытых_рукавах,\% = \frac{To}{To + Tз}100\%$$

а также в виде отношения числа заходов в открытые рукава (N_o) к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава ($N_o+N_з$) в процентах:

$$Число_заходов_в_открытые_рукава,\% = \frac{No}{No + Nз}100\%,$$

Дипептид ГД-23 проявлял эффект в дозах 0.5 и 1.0 мг/кг в/б (таблица 5). Дипептид ГД-102 проявлял эффект в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг (таблица 5).

Таблица 5 - Анксиолитическая активность дипептидов ГД-23 и ГД-102 в тесте ПКЛ у мышей CD-1 при внутрибрюшинном введении

Вещество	Доза мг/кг, в/б	Время, сек		% Времени, проведенного в открытых рукавах
		Открытые рукава	Закрытые рукава	
ГД-23	Контроль	14.25 (7.21)	232.88 (38.16)	6.06 (3.56)
	0.1	81.88***(32.40)	146.75***(43.57)	**36.58***** (15.71)
	0.5	77.25***(42.53)	198.13(50.87)	**28.48***** (16.51)
	1.0	20.50(6.05)	235.25(19.51)	8.00 (2.36)
	5.0	14.25(7.21)	232.88(38.16)	6.06 (3.56)
	p (ANOVA)	0.00001	0.0014	0.00001
ГД-102	Контроль	8.50 (14.08)	259.25(16.45)	3.12 (5.04)
	0.1	58.75 (62.21)*	206.38 (56.76)*	**21.69** (22.37)*
	0.5	64.63 (47.73)*	198.88 (39.97)*	**24.04** (16.85)*
	1.0	44.00 (26.53)*	214.38 (26.53)*	**16.95** (10.27)*
	p (ANOVA)	0.0106	0.0080	0.0102
Диазепам	Контроль	35.25 (23.84)	168.50 (33.99)	16.55 (7.97)
	1.0	74.88(43.89)*	142.38 (25.52)	**33.23** (12.72)*
	p (ANOVA)	0.0087	0.0742	0.0063

Примечания: Данные представлены в виде M(SD), где M-среднее арифметическое; SD-стандартное отклонение; число животных = 8 в каждой группе; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Красным цветом выделены достоверные значения

Как видно из таблицы дипептид ГД-23 в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг достоверно увеличивал процент времени пребывания в открытых рукавах лабиринта по сравнению с контролем ($p< 0.05$), что свидетельствует о выраженной анксиолитической активности, сопоставимой с эффектом диазепама. В более высоких дозах (1.0 и 5.0 мг/кг) ГД-23 не демонстрировал анксиолитического эффекта, что указывает на наличие узкого терапевтического окна.

ГД-102 в диапазоне 0.1–0.5 мг/кг при в/б введении вызывал статистически значимое ($p< 0.05$) улучшение показателей по сравнению с контролем: возрастали как относительное время в открытых рукавах, так и процент числа входов в открытые рукава (наиболее выраженный эффект в дозе 0.5 мг/кг).

Таким образом, ГД-23 и ГД-102 в низких дозах демонстрируют выраженный анксиолитический эффект и в тесте ПКЛ, причем по выраженности эффекта оба дипептида, ГД-23 и ГД-102, не уступали диазепаму (1.0 мг/кг), увеличивая процент времени пребывания мышей в открытых рукавах в 6 и 7 раз соответственно.

2.2.4 Изучение механизма анксиолитического действия дипептидов ГД-23 и ГД-102 с использованием метода фармакологического ингибиторного анализа

2.2.4.1 Доказательство TSPO-опосредованного анксиолитического эффекта дипептида ГД-23 с использованием антагониста TSPO, соединения PK-11195

Для подтверждения того, что анксиолитический эффект полученных дипептидов реализуется через взаимодействие с рецептором TSPO, был проведён ингибиторный фармакологический анализ с использованием классического антагониста TSPO - соединения PK-11195 (1-(2-хлорфенил)-N-метил-(1-метилпропил)-3-изохинолинкарбоксамид). PK-11195 вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг за 30 мин до введения ГД-23. Доза была выбрана исходя из литературных данных по ингибиторному анализу лигандов TSPO [207, 208]. Показано, что в контрольных экспериментах PK-11195 сам по себе не влиял на поведение животных в тесте ПКЛ: время пребывания в открытых рукавах и частота входов в них оставались на уровне контроля. Однако предварительное введение PK-11195 полностью устраняло анксиолитический эффект ГД-23: поведенческие показатели (время и частота входов в открытые рукава) возвращались к контрольным значениям и достоверно отличались от группы, получавшей только ГД-23. При этом сам PK-11195 в дозе 10 мг/кг не изменял поведение животных относительно контроля, что исключает его собственный анксиогенный или седативный вклад в условиях данного эксперимента (см. таблицу 6 и рисунок 47).

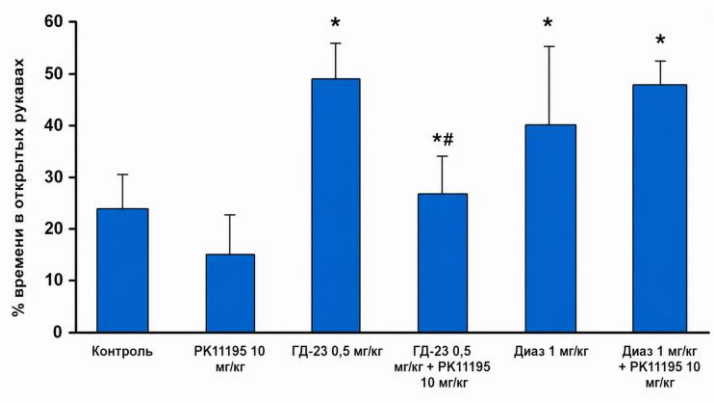
Таблица 6 - Влияние специфического ингибитора TSPO, соединения РК11195 на анксиолитический эффект дипептида ГД-23 и диазепама в тесте ПКЛ на мышах CD1 при в/б введении

Экспериментальные группы	Время в открытых рукавах, сек	Время в закрытых рукавах, сек	Число заходов в открытые рукава	Число заходов в закрытые рукава	Время в открытых рукавах /сумма времени в открытых и закрытых рукавах, %	Число заходов в открытые рукава /Число заходов в открытые и закрытые рукава, %
Контроль (КИ+КИ)	41.50 (15.99)	131.00 (18.02)	3.13 (2.23)	8.25 (1.91)	23.87 (7.58)	25.78 (13.16)
РК11195 (10 мг/кг)+ КИ	30.13 (26.82)	**167.25** (13.92)*	3.00 (2.98)	8.63 (2.39)	14.43 (11.82)	22.20 (17.77)
КИ+ ГД-23(0.5 мг/кг)	**105.50*** (27.93)	**106.88*** (9.51)	**7.38*** (1.06)	7.63 (1.41)	**48.99***** (7.87)	**49.33***** (7.59)
РК11195 (10.0 мг/кг)+ ГД-23(0.5 мг/кг)	**50.00#** (26.60)	125.13 (22.92)	5.38 (2.88)	9.38 (3.11)	**27.15###** (11.08)	**35.11##** (9.35)
КИ + диазепам (1.0 мг/кг)	**86.88*** (32.37)	125.88 (28.60)	6.50 (4.07)	8.50 (3.25)	**40.59*** (14.86)	**40.53*** (13.34)
РК11195 (10.0 мг/кг)+ диазепам (1.0 мг/кг)	**90.13**** (22.41)	**99.50*** (19.91)	**7.38*** (3.07)	8.25 (3.01)	**47.28***** (4.10)	**46.84**** (4.52)
p (ANOVA)	0.0001	0.0001	0.0052	0.888	0.00001	0.0007

Примечания: Данные представлены в виде M(SD), где M-среднее арифметическое; SD-стандартное отклонение;
n = 8 - число животных в каждой группе;
КИ-контрольная инъекция.

*, **, *** – статистически значимые различия ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$ соответственно) по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. #, ##, ### – достоверные различия ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$ соответственно) между группами «КИ+ГД-23(0.5 мг/кг)» и «РК11195 (10.0 мг/кг)+»ГД-23(0.5 мг/кг)» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Красным цветом выделены достоверные значения

Данные фармакологического ингибиторного анализа дополнительно иллюстрирует гистограмма (рисунок 47):



Примечания: Данные представлены в виде M(SD), где M-среднее арифметическое; SD-стандартное отклонение; n = 8 - число животных в каждой группе;
*p<0.05– статистически значимые различия по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони
– достоверные различия (p<0.05) между группами «КИ+ГД-23(0.5 мг/кг)» и «РК11195 (10.0 мг/кг)+»ГД-23(0.5 мг/кг)» согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Рисунок 47 - Влияние антагониста TSPO, соединения РК-11195, на анксиолитическую активность ГД-23 в тесте ПКЛ у мышей CD1 при в/б введении

Интересно, что эффект диазепама в этих условиях не блокировался. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что эффект дипептида ГД-23 опосредован его взаимодействием с TSPO, а не с ЦБР.

2.2.4.2 Доказательство TSPO-опосредованного анксиолитического эффекта дипептида ГД-102 с использованием антагониста TSPO, соединения РК-11195

Лигандные свойства ГД-102 к TSPO также доказаны методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием специфического антагониста TSPO, РК11195. Предварительное введение РК-11195 полностью устраняло анксиолитический эффект ГД-102 (см. таблицу 7 и рисунок 48): показатели времени и частоты посещения открытых рукавов возвращались к уровням контроля и достоверно отличались от группы, получавшей только ГД-102. При этом сам РК-11195 в дозе 10 мг/кг не изменял поведение животных относительно контроля, что исключает его собственный анксиогенный или седативный вклад в условиях данного эксперимента.

Таблица 7 - Влияние специфического ингибитора TSPO (PK11195) на анксиолитический эффект соединения ГД-102 в тесте ПКЛ на мышах CD1 при в/б введении

Экспериментальные группы	Время в открытых рукавах, сек	Время в закрытых рукавах	Число заходов в открытые рукава	Число заходов в закрытые рукава	Время в открытых рукавах /сумма времени в открытых и закрытых рукавах, %	Число заходов в открытые рукава /Число заходов в открытые и закрытые рукава, %
Контроль (КИ+КИ)	29.00 (5.35)	226.88 (15.34)	2.00 (0.76)	8.25 (1.91)	11.38 (2.33)	19.96 (8.91)
PK11195 (10 мг/кг)+ КИ	28.75 (23.91)	225.75 (19.12)	2.25 (1.91)	9.75 (3.37)	11.05 (8.74)	18.51 (11.98)
ГД-102 (0.5 мг/кг) + КИ	**114.13** (53.10)*	**139.13** (53.46)*	**5.50** (2.88)*	6.88 (2.53)	**45.09** (20.66)*	**43.72** (17.18)*
PK11195 (10.0 мг/кг) + ГД-102 (0.5 мг/кг)	25.88 (13.14)	234.38 (23.17)	2.63 (1.41)	9.75 (2.31)	9.99 (4.99)	21.19 (9.29)
p (ANOVA)	0.0140	0.0139	0.0308	0.1003	0.0123	0.0155

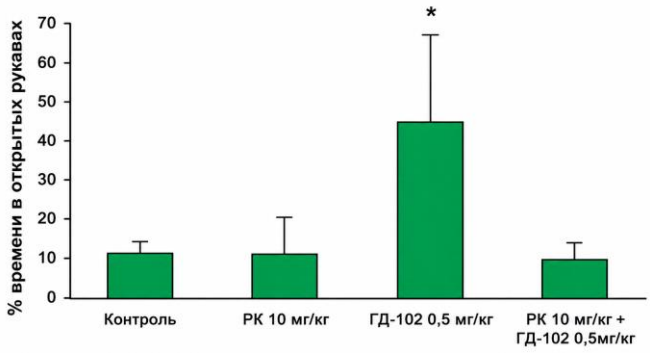
Примечания: Данные представлены в виде M(SD), где M-среднее арифметическое; SD-стандартное отклонение;

n = 8 - число животных в каждой группе;

КИ-контрольная инъекция дистиллированной воды.

*p<0.05, достоверные различия с контролем согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Красным цветом выделены достоверные значения

Данные фармакологического ингибиторного анализа дополнительно иллюстрирует гистограмма (рисунок 48):



Примечание: *p<0.05, достоверные различия с контролем согласно критерию Краскелла-Уоллеса и U-тесту Манна-Уитни с поправкой Бонферрони

Рисунок 48 - Влияние антагониста TSPO, соединения PK-11195, на анксиолитическую активность ГД-102 в тесте ПКЛ у мышей CD1 при в/б введении

Таким образом, фармакологическая блокада эффекта дипептида ГД-102 антагонистом TSPO свидетельствует о TSPO-зависимом механизме анксиолитического действия ГД-102.

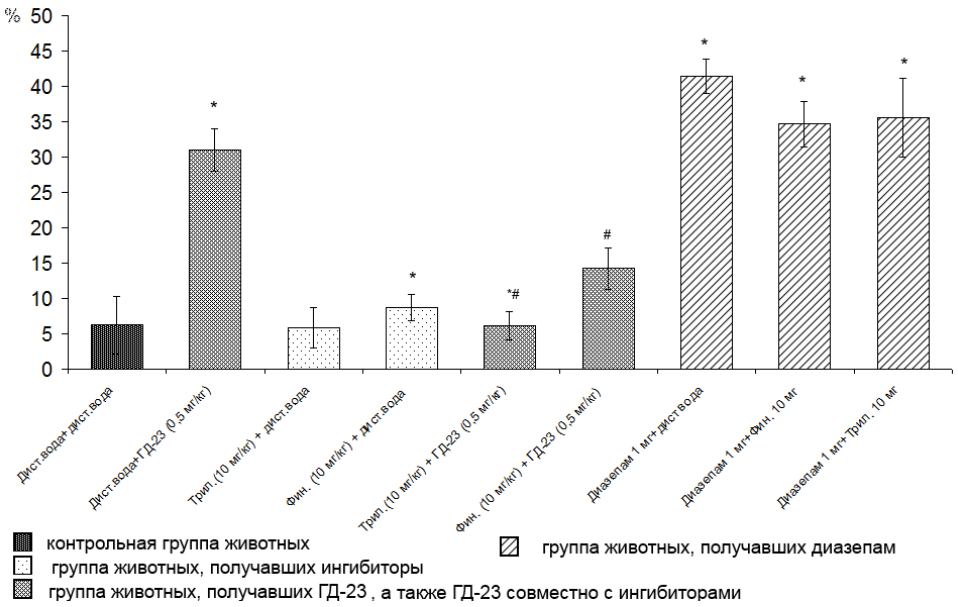
2.2.4.3 Доказательство нейростероидогенезного механизма анксиолитического действия дипептида ГД-23 с использованием блокаторов синтеза нейростероидов

Чтобы подтвердить нейростероидный механизм анксиолитического действия ГД-23, был проведён фармакологический ингибиторный анализ с блокадой ключевых ферментов нейростероидогенеза: трилостана - ингибитора 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-HSD) и финастерида - ингибитора 5α-редуктазы. Если эффект ГД-23 опосредуется через TSPO-индуцированный нейростероидогенез (в т.ч. образование аллопрегнанолона), то ингибирование этих ферментов должно ослаблять, либо полностью устранять анксиолитический эффект ГД-23.

Ингибиторный анализ проводили в тесте ПКЛ с использованием мышей CD1. ГД-23 вводили в дозе 0.5 мг/кг в/б, доза выбрана по ранее установленному максимальному эффекту. В качестве положительного контроля использовали диазепам, лиганд бензодиазепинового участка $ГАМК_А$-рецептора, в дозе 1.0 мг/кг в/б. Ингибиторы трилостан и финастерид вводили в дозе 10 мг/кг подкожно (п/к) за полчаса до ГД-23 или диазепама, из литературы известно [298], чтов этой дозе ингибиторы не вляют на двигательную активность животных.

Увеличение процентного отношения времени пребывания в открытых рукавах лабиринта и числа заходов в открытые рукава интерпретировали как наличие анксиолитического эффекта.

Дипептид ГД-23 в дозе 0.5 мг/кг увеличивал процент времени пребывания в открытых рукавах в 5 раз по сравнению с контролем ($p<0.001$) (рисунок 49). Предварительное введение как трилостана, так и финастерида блокировало анксиолитический эффект ГД-23. Показатели поведения животных, получавших только ингибиторы, статистически не отличались от контрольных, и с высокой достоверностью ($p<0.0001$ для трилостана и $p<0.0018$ для финастерида) отличались от показателей группы, получавшей ГД-23. В другой контрольной серии опытов с транквилизатором диазепамом, показано, что его анксиолитический эффект не предупреждался ни трилостаном, ни финастеридом, что подтверждает зависимость анксиолитического эффекта ГД-23 от нейростероидогенеза.



Примечание: * p<0.005 - относительно контроля, # p<0.005 относительно ГД-23 (критерий Краскелла-Уоллеса, последующий U-тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Рисунок 49 - 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

Таким образом, полная отмена эффекта ГД-23 трилостаном и выраженное ослабление финастеридом указывают, что анксиолитическое действие ГД-23 зависит от непрерывности каскада TSPO → транспорт холестерина → прегненолон → аллопрегнанолон → анксиогенез. Отсутствие влияния ингибиторов на эффект диазепама подтверждает то, что они не оказывают седативного или анксиогенного действия в используемых дозах, а воздействуют именно на нейростероидный путь.

2.3 Выявление ноотропной активности дипептида ГД-23 в тесте распознавания нового объекта в условиях скополаминовой амнезии у крыс. Доказательство TSPO-опосредованного ноотропного эффекта с использованием блокатора TSPO, соединения PK-11195[2]

Тест распознавания нового объекта основан на естественном для животных предпочтении новизны и позволяет оценить рабочую память, при сохранной памяти животное в большей степени исследует новый объект, чем знакомый [299]. Скополаминовая амнезия - фармакологическая модель гипохолинергического дефицита памяти: антагонист мускариновых

[2] Исследование ноотропной и антидепрессивной активностей выполнено совместно с к.б.н. в.н.с. лаборатории пептидных биорегуляторов Поварниной П.Ю, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

ацетилхолинорецепторов скополамин транзиторно нарушает воспроизведение следов памяти [300].

Оценка дефицита памяти в тесте распознавания нового объекта проводится следующим образом: после короткой адаптации животное (мышь или крыса) знакомят с двумя идентичными объектами (фаза обучения), затем спустя краткий интервал предъявляют один знакомый и один новый объект (тест). Контрольное животное предпочитает исследовать новизну, при скополамине это предпочтение снижается [301].

Для оценки рабочей памяти крыс использовали коэффициент дискриминации (КД), который рассчитывали по формуле:

КД=(а-б)/(а+б), где а – время исследования нового объекта во время теста (сек), а б – время исследования знакомого объекта во время теста (сек).

Значение КД может быть от -1 до +1. Чем оно больше, тем лучше животное различает новый и знакомый объекты.

Схематично процедура тестирования крыс в данном тесте представлена на рисунке 50.

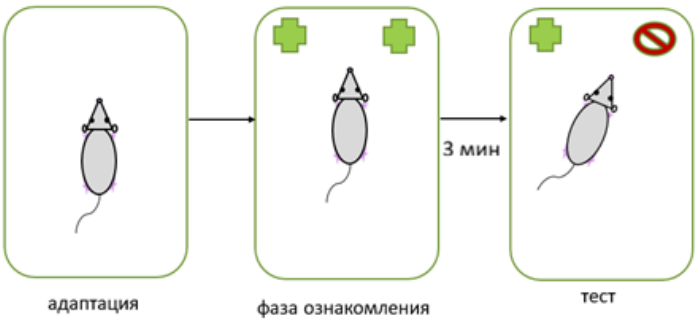
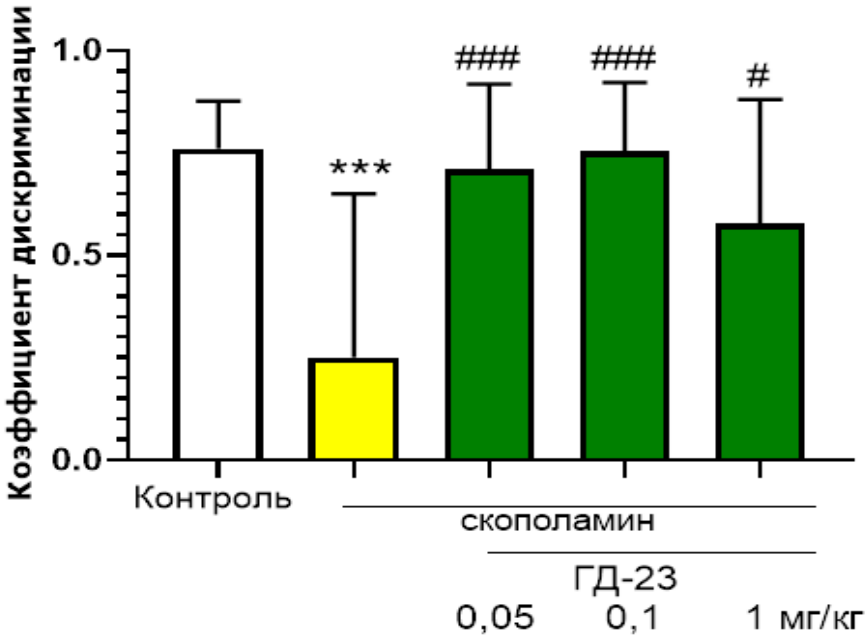


Рисунок 50 - Схематическое изображение теста распознавания нового объекта

Критерии выбора объектов – различия по форме, цвету/прозрачности и материалу; достаточный вес для того, чтобы крыса не смогла их уронить и перемещать по клетке; форма объектов такова, что они теоретически одинаково предпочтительны для крысы (отсутствуют мелкие выпуклости и углубления, которые могут сделать один объект значительно более интересным для животного); размер объектов примерно одинаковый.

Контрольные животные значительно больше времени проводили у нового объекта (высокие значения КД), чем у знакомого. Введение скополамина заметно нарушало способность животных к распознаванию объектов, что выражалось в снижении времени исследования нового объекта по отношению к суммарному времени исследования нового и знакомого объектов во время теста (КД уменьшался, отражая нарушение распознавания).

Показано, что ГД-23 в дозах 0.05, 0.1 и 0.1 мг/кг при в/б введении за 1 ч до скополамина (0.2 мг/кг, п/к) практически полностью восстанавливает нарушенную рабочую память крыс с терапевтическим эффектом 90, 95 и 85% соответственно (рисунок 51).



Примечание: коэффициент дискриминации рассчитывали по формуле: (а-б)/(а+б), где а – время исследования нового объекта (с), б – знакомого объекта (с). Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений. *** - p<0,001 по сравнению с контролем; ### - p<0,001, # - p<0,05 по сравнению со скополамином (критерий Краскела-Уоллиса с последующими множественными сравнениями с использованием теста Данна)

Рисунок 51 - Ноотропный эффект ГД-23 в тесте распознавания нового объекта в условиях скополаминовой амнезии у крыс

Предварительное введение селективного антагониста TSPO PK-11195 (3 мг/кг, внутрибрюшинно, за 30 мин до скополамина и через 30 мин после ГД-23) полностью нивелировало антиамнестический эффект ГД-23 (таблица 8). Сам PK-11195 не влиял на рабочую память крыс: КД в группе «PK-11195» не отличается от контроля; и не влиял на эффект скополамина: КД в группе «PK-11195+Ск» не отличается от группы «Ск», что исключает неспецифические моторные артефакты.

Таблица 8 - Антагонист TSPO PK-11195 противодействует антиамнестическому эффекту ГД-23 в условиях скополаминовой амнезии у крыс тесте распознавания нового объекта

Группа	**Число животных в группе**	**Коэффициент дискриминации**
Контроль	8	0.8 (0.75–0.9)
Скополамин	9	0.08 (0.03-0.24)**
Скополамин + ГД-23	10	0.66 (0.52-0.95)#
Скополамин + ГД23 + PK-11195	9	0.14(-0.1-0.42)^
PK-11195	6	0.8 (0.64-0.99)

Примечание. Коэффициент дискриминации рассчитывали по формуле: (а-б)/(а+б), где а – время исследования нового объекта (с), б – время исследования знакомого объекта (с). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных интервалов. ** - $p<0,01$ по сравнению с контролем, #- $p<0,05$ по сравнению с группой «Скополамин», ^ - $p<0,05$ по сравнению с группой «Скополамин + ГД23 + PK-11195» (критерий Краскела-Уоллиса с последующими множественными сравнениями с использованием теста Данна).

Быстрый (в пределах 1 ч) TSPO-зависимый эффект дипептида ГД-23 согласуется с остро индуцируемыми стероидогенными и нейромодуляторными каскадами, такими как усиление синтеза нейростероидов (прегненолона, аллопрегнанолона) и последующая положительная аллостерическая модуляция ГАМКа-рецепторов, улучшение энергетического статуса нейронов и устойчивости к холинергическому стрессу, снижение провоспалительной активации микроглии. Этот эффект ГД-23 способен компенсировать когнитивный дефицит, вызванный ингибированием мускариновых рецепторов скополамином.

Таким образом, ГД-23 демонстрирует достоверную, дозозависимую антиамнестическую активность в модели скополаминовой амнезии у крыс, антиамнестическое действие ГД-23 опосредовано его взаимодействием с рецептором TSPO.

2.4 Выявление антидепрессивной активности дипептида ГД-102

Тест вынужденного плавания по Порсолту (Porsolt Forced Swim Test, FST) — классическая поведенческая модель отчаяния [302, 303]. В данной работе применена методика с двумя посадками (Modified Forced Swim Test, FST-2) по Angoa-Pérez [304], которая является модификацией классического теста Порсолта и применяется для повышения чувствительности модели к антидепрессивному действию соединений. Метод основан на принципе

«поведенческого отчаяния»: животное (крыса или мышь) помещается в цилиндр, заполненный водой, из которого оно не может выбраться.

Эксперимент состоит из двух сессий (двух посадок). Первая посадка (фаза обучения): животное помещают в воду на продолжительное время (обычно 10–15 мин). На этом этапе формируется бессильное состояние, при котором животное после активных попыток выбраться переходит к иммобильности.

Вторая посадка (тест): через 24 ч животное вновь помещают в воду, но уже на короткий интервал (обычно 5 мин). На этом этапе регистрируют поведенческие параметры: суммарное время иммобильности, а также эпизоды активного плавания и попыток к побегу. Снижение суммарного времени иммобильности (накопленная длительность периодов неподвижности за весь сеанс) по сравнению с контролем интерпретируют как наличие антидепрессивного эффекта тестируемого соединения. Считается, что вторая посадка более чувствительна к действию антидепрессантов: у контрольных животных иммобильность выражена сильнее, тогда как под действием препаратов разных фармакологических классов наблюдается сокращение времени неподвижности и усиление активного поведения Используемые в эксперименте мыши самцы линии BALB/c считаются чувствительными к действию щирокого спектра антидепрессантов [305].

В первый день животных помещали в цилиндры (высота 30 см, диаметр 10 см), наполненные на 2/3 водой температурой 22ºС, на 10 мин. На следующий день (через 22 ч после первой посадки) животных снова помещали в сосуды с водой в те же условия и на протяжении 5-минутного тестового периода регистрировали время сохранения животным характерной позы иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения). Уменьшение длительности времени иммобильности мышей расценивали как свидетельство наличия антидепрессивной активности.

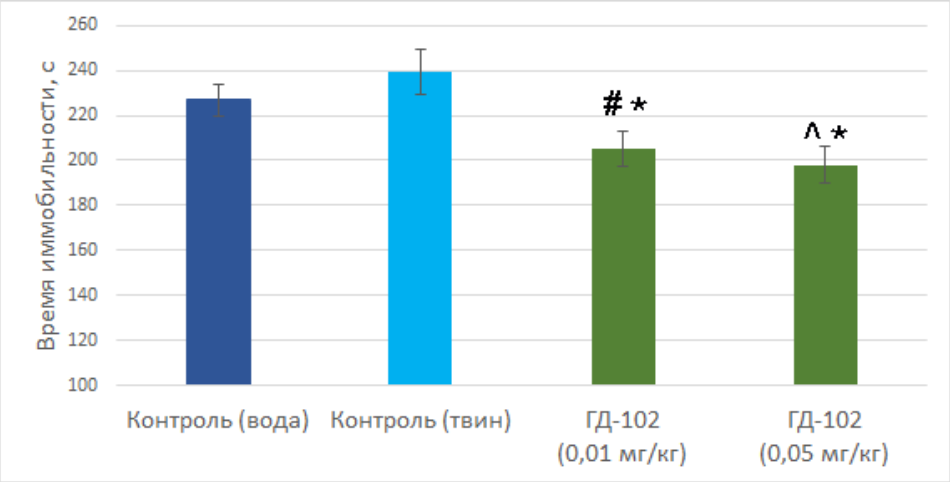
Дипептид ГД-102 изучали в дозах 0.01 и 0.05 мг/кг в/б. В качестве препарата сравнения использовали раствор Амитриптилина 10 мг/кг в дистиллированной воде.

Установлено, что в контрольных группах («Контроль (вода)» и «Контроль (твин)») суммарное время иммобильности составляло соответственно 227 и 239 с (таблица 9). Достоверных различий между этими группами не выявлено. ГД-102 статистически достоверно снижал время иммобильности в обеих изученных дозах на 9 и 10% по сравнению с группой «Контроль (вода)» и на 15 и 17% по сравнению с группой «Контроль (твин)» (рисунок 52).

Таблица 9 - Антидепрессивная активность ГД-102 в тесте Порсолта у мышей BALB/c

Группа животных/вещество/доза	Время иммобильности, с (средние ± стандартные ошибки средних)
Контроль	239±10
ГД-102 (0.01 мг/кг, в/б)	**205±8***
ГД-102 (0.05 мг/кг, в/б)	**198±8***

Примечание: * - p<0.05 по сравнению с группой «Контроль» (однофакторный ANOVA с последующим тестом Данета)



Примечание: # -p=0.06 по сравнению с группой «Контроль (вода)», ^ - p<0.05 по сравнению с группой «Контроль (вода)», * - p<0.05 по сравнению с группой «Контроль (Tween-80)» (однофакторный ANOVA с последующим тестом Данета). Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок средних

Рисунок 52 - Влияние ГД-102 на время иммобильности в тесте вынужденного плавания у мышей линии Balb/C.

Таким образом, дипептидный лиганд TSPO ГД-102 обладает антидепрессивной активностью в дозах 0.01 и 0.05 мг/кг в/б в тесте вынужденного плавания с двумя посадками у мышей линии BALB/c.

2.5 Изучение острой токсичности дипептидов ГД-23 и ГД-102[3]

При изучении острой токсичности соединений ГД-23 и ГД-102 на аутбредных мышах обоего пола (массой 18-20 г) при внутрибрюшинном введении определение средней смертельной дозы не представлялось возможным, из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально допустимых объемов и концентраций.

Исходя из полученных данных, дипептиды ГД-23 и ГД-102 могут быть отнесены к 5 классу токсичности – практически нетоксичного вещества по классификации Сидорова К.К. [306].

2.6 Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду потенциальных дипептидных лигандов TSPO

2.6.1 Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-23 на мышах

Для выявления влияния природы С-замещения на активность были получены соответствующие метиламид (ГД-33), метиловый эфир (ГД-30) и соединение со свободной карбоксильной группой (ГД-32).

Для получения этих соединений исходным реагентом послужил L-изолейцин, который превращали в гидрохлорид метилового эфира реакцией этерификации метанолом в присутствии хлористого тионила. Гидрохлорид нейтрализовывали разветвленным (для предотвращения рацемизации) амином в растворе ДМФА, затем незащищённый по аминогруппе метиловый эфир изолейцина ацилировали активированным эфиром Z-L-Trp-OSu с получением метилового эфира защищенного дипептида - Z-L-Trp-L-Ile-OMe (ГД-30). Для превращения этого метилового эфира Z-L-Trp-L-Ile-OMe (ГД-30) в замещенный амид Z-L-Trp-L-Ile-NHMe (ГД-33) проводили реакцию его аммонолиза в спиртовом растворе метиламида. Условия выбирали так, чтобы обеспечить полное замещение без затрагивания Z-группы, такие как умеренные температуры и избыток нуклеофила.

Для получения соединения со свободной карбоксильной группой Z-L-Trp-L-Ile-OH (ГД-32) проводили реакцию омыления метилового эфира в мягкой щелочной среде (0.1 M NaOH, водно-спиртовая/водно-органическая система) с последующим подкислением. Для предотвращения побочных процессов реакцию вели при умеренной температуре и в отсутствие длительного выдерживания в сильной щёлочи. Синтетический путь получения С-замещенных аналогов показан на рисунке 53:

[3] Исследование острой токсичности выполнено совместно с отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

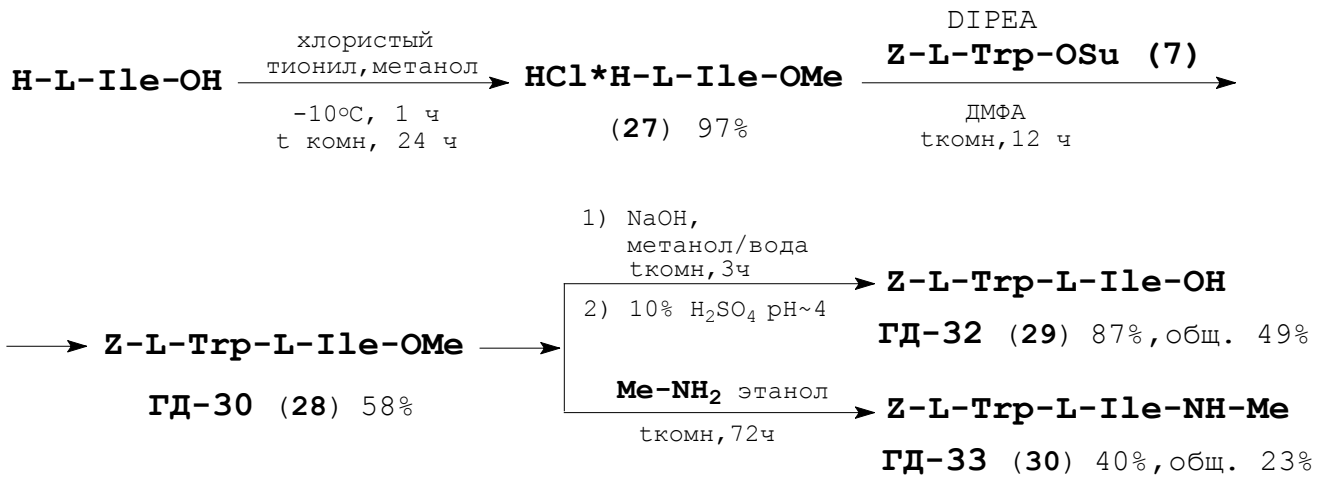


Рисунок 53 - Синтез С-замещенных аналогов дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-23

Для выявления оптимального расстояния между N-концевым фенильным радикалом и остатком триптофана были синтезированы аналоги дипептида ГД-23 с различной длиной фенилалканоильного остатка: соединения общей формулы $Ph(CH_2)_nC(O)$-L-Trp-L-IleNH_2, где n= 1, n=2, n=5 (ГД-36, ГД-57, ГД-28 соответственно). Эти N-фенилалканоильные аналоги ГД-23 получали удалением защитной Z-группы каталитическим гидрогенолизом в токе водорода в присутствии 10% Pd/C. Гидрогенолиз Z-группы на Pd/C представляет собой рабочий метод с высокими, практически количественными выходами. Сукцинимидные эфиры фенилуксусной/фенилпропионовой/фенилгексановой кислот ($Ph(CH_2)_nCO$-OSu) получали по стандартной методике Андерсона с DCC/Su-OH в ТГФ и затем конденсировали с H-Trp-Ile-NH_2 в растворе в ДМФА (рисунок 54).

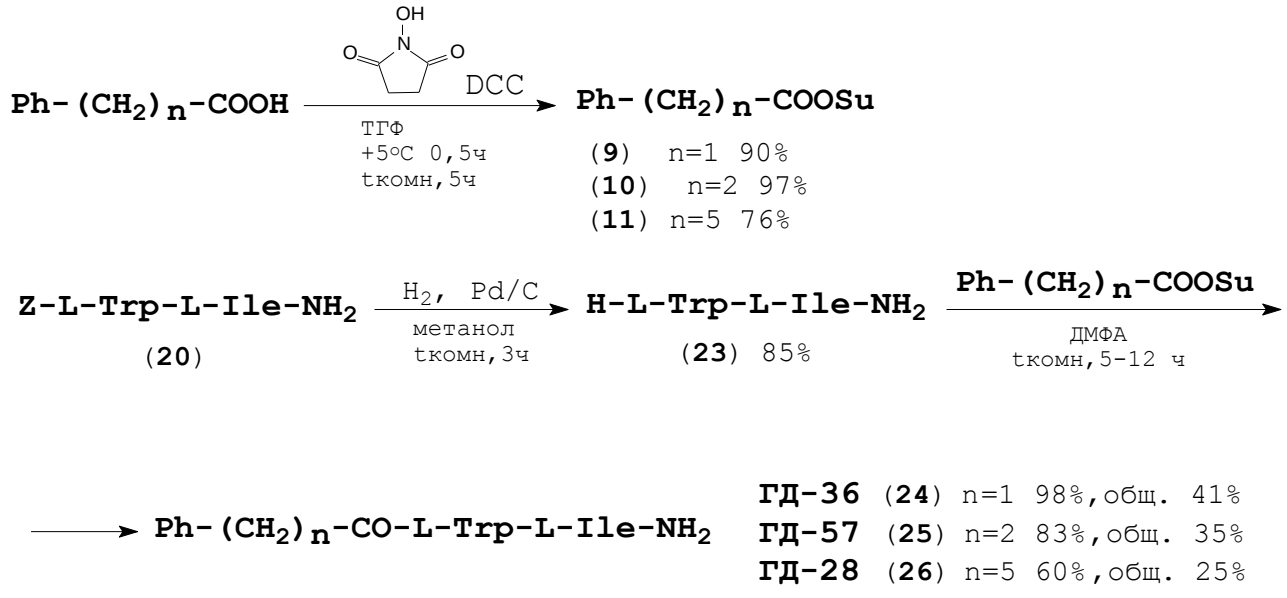


Рисунок 54 - Синтез *N*-замещенных аналогов дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-23

Для выявления роли боковых радикалов аминокислотных остатков в дипептиде ГД-23 были синтезированы его глициновые аналоги амид *N*-карбобензокси-глицил-L-изолейцина (ГД-56) и амид *N*-карбобензокси-L-триптофанил-L-глицина (ГД-39). Синтетическая схема аналогична схеме получения дипептида ГД-23, в качестве исходных защищенных аминокислот использовали Boc-Gly-OH (для получения ГД-39) либо Z-Gly-OH (для получения ГД-56) соответственно (рисунок 55):

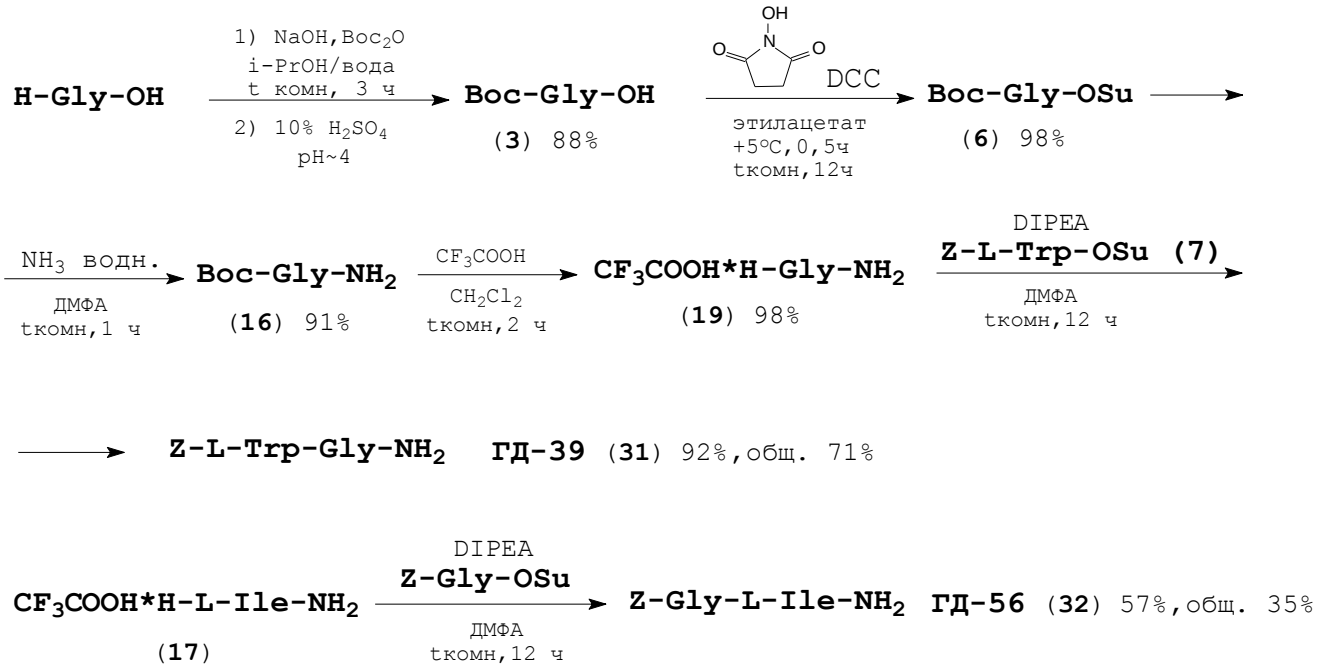


Рисунок 55 - Синтез глициновых аналогов дипептида ГД-23 с поочередной заменой каждого аминокислотного остатка на глицин

Анксиолитическую активность всех синтезированных соединений изучали на мышах BALB/c в тесте ОП со световой вспышкой. За меру анксиолитического эффекта принималось увеличение ОДА животных. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Анксиолитическая активность синтезированных дипептидов

Аналоги дипептида ГД-23 ($PhCH_2OC(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2)						
Соединение, № (шифр)	Доза, мг/кг в/б	ПА	ЦА	Ц	В	ОДА
Стереоизомеры						
ГД-25(D,L)	Контроль	7.38 (5.13)	0.63 (1.77)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.00 (5.76)
	0.1	7.50 (6.35)	1.38 (2.56)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.88 (8.37)
	0.5	6.25 (3.20)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.25 (3.20)
	5.0	7.13 (5.74)	1.50 (3.12)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	8.75 (5.50)
	p (ANOVA)	0.997	0.442	0.406	1.000	0.151

ГД-69 (L,D)	Контроль	11.27 (6.86)	2.00 (2.65)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	13.27 (9.16)
	0.01	9.88 (6.98)	0.13 (0.35)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	10.00 (7.01)
	0.1	23.75 (15.53)	6.00 (2.56)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	29.75 (14.29)*
	0.5	34.13 (11.62)*	6.38 (6.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	40.50 (15.13)*
	1.0	33.38 (8.28)*	4.50 (7.54)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	37.88 (13.85)*
	5.0	12.50 (6.85)	1.75 (1.91)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	14.25 (6.96)
	p (ANOVA)	0.000	0.002	1.000	1.000	0.000
Глициновый скан						
ГД-39 (Trp-Gly)	Контроль	10.50 (4.93)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	10.88 (5.30)
	0.1	10.13 (4.85)	1.13 (2.80)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	11.25 (4.53)
	0.5	7.38 (4.31)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.38 (4.31)
	1.0	9.50 (7.23)	0.63 (1.41)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	10.13 (7.32)
	5.0	7.25 (3.99)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.25 (3.99)
	p (ANOVA)	0.7067	0.1869	1.000	1.000	0.4065
ГД-56 (Gly-Ile)	Контроль	18.13 (10.72)	1.75 (1.83)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	19.88 (11.27)
	0.1	30.67 (8.07)	4.50 (1.87)*	0.33 (0.52)	0.50 (0.84)	36.00 (8.63)*
	1.0	20.00 (12.30)	16.00 (5.62)***	0.83 (0.75)*	0.00 (0.00)	36.83 (13.64)*
	p (ANOVA)	0.2298	0.0009	0.0284	0.0858	0.0516
Модификация N-конца						
ГД-28 (фенилгексаноил)	Контроль	7.88 (4.58)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.00 (4.78)
	0.1	11.63 (6.65)	1.13 (2.80)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	12.75 (7.96)
	0.5	4.75 (1.49)	0.25 (0.46)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	5.00 (1.31)
	1.0	14.00 (4.28)*	0.50 (1.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	14.50 (3.78)*
	5.0	8.25 (3.37)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.38 (3.58)
	p (ANOVA)	0.004	0.897	1.000	1.000	0.0004
ГД-36 (фенилацетил)	Контроль	3.50 (2.78)	1.50 (2.07)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	5.13 (3.94)
	0.1	8.75	0.13	0.00	0.00	8.88

		(7.29)	(0.35)	(0.00)	(0.00)	(7.34)
	0.5	8.25 (4.50)	1.00 (1.51)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.25 (4.56)
	1.0	4.38 (5.13)	1.63 (1.60)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.00 (5.45)
	5.0	3.50 (3.46)	1.38 (2.13)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	4.88 (5.25)
	p (ANOVA)	0.096	0.342	0.406	1.000	0.29
ГД-57 (фенилпропионил)	Контроль	18.13 (10.72)	1.75 (1.83)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	19.88 (11.27)
	0.1	32.50 (3.73)*	2.17 (2.32)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	34.67 (1.97)*
	0.5	19.67 (7.20)	3.17 (4.26)	0.17 (0.41)	0.00 (0.00)	23.00 (11.38)
	1.0	36.17 (9.52)**	1.50 (2.07)	0.00 (0.00)	0.17 (0.41)	37.00 (8.90)*
	p (ANOVA)	0.006	0.9045	0.343	0.343	0.0197
Модификация С-конца						
ГД-30 (OMe)	Контроль	7.88 (4.58)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.00 (4.78)
	0.1	8.88 (6.22)	0.38 (1.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.25 (6.58)
	1.0	9.38 (8.05)	0.88 (2.47)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	10.25 (9.39)
	0.5	9.25 (3.88)	0.50 (0.76)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.75 (4.03)
	5.0	8.75 (3.73)	0.88 (1.64)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.63 (4.21)
	p (ANOVA)	0.943	0.744	1.000	1.000	0.878
ГД-32 (OH)	Контроль	5.88 (3.00)	0.75 (1.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.63 (3.34)
	0.1	12.88 (7.20)	1.25 (1.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	14.13 (8.18)
	0.5	6.13 (1.73)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.13 (1.73)
	1.0	12.75 (6.43)	1.13 (2.80)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	13.88 (7.28)
	5.0	11.50 (4.84)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	11.50 (4.84)*
	p (ANOVA)	0.284	0.119	1.000	1.000	0.428
ГД-33 ($NHCH_3$)	Контроль	5.88 (3.00)	0.75 (1.75)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.63 (3.34)
	0.1	8.75 (10.71)	1.00 (2.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.75 (11.80)
	0.5	11.50 (7.50)	1.25 (1.91)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	12.75 (8.89)
	1.0	4.00	0.38	0.00	0.00	4.38

		(2.93)	(0.74)	(0.00)	(0.00)	(3.11)
	5.0	6.38 (5.80)	1.38 (2.56)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.75 (7.59)
	p (ANOVA)	0.157	0.945	1.000	1.000	0.177

Примечание: ПА - число пересеченных квадратов на периферии; ЦА - число пересеченных квадратов в центральных областях; Ц - число заходов в центр; ВА - число вертикальных стоек; ОДА - суммарное число пересеченных квадратов вместе с числом вертикальных стоек; Количество животных в каждой группе-8; Данные представлены в виде S (SD), где S – среднее значение, SD – стандартное отклонение; p (ANOVA) – p-значение по методу Краскела-Уоллеса. Розовым цветом показаны активные дозы

Анализ связи «структура–активность» в ряду аналогов дипептидного лиганда TSPO, дипептида ГД-23, выявил следующие особенности.

Стереохимия и вклад боковых групп аминокислот. Замена L-триптофана на D-триптофан (соединение ГД-25) приводит к потере активности, что указывает на важность конфигурации остатка триптофана. При этом наличие индольной группы триптофана необязательно: замена L-триптофана на глицин (соединение ГД-56) не приводит к потере активности. Замена L-изолейцина на D-изолейцин (соединение ГД-69) не приводит к потере активности,чтоуказывает на несущественность конфигурации остатка изолейцина. Однако замена L-изолейцина на глицин приводит к потере активности соединения ГД-39. Следовательно, наличие боковой цепи изолейцина играет ключевую роль в проявлении активности.

N-концевой заместитель. Длина спейсера между фенильным кольцом при *N*-фенилацильной группе и аминогруппой триптофана также имеет важное значение в проявлении анксиолитического эффекта соединений; оптимальное расстояние между фенильной и индольной группами составляет 7 σ-связей. Удлинение спейсера между двумя ароматическими фрагментами за счет удлинения цепи *N*-фенилацильной группы с 7 σ-связей (соединение ГД-57) до 10 σ-связей (соединение ГД-28) приводит к снижению анксиолитической активности, а укорочение числа σ-связей до 6 (соединение ГД-36) – к потере активности. Можно предположить, что размер карбобензоксильной группы в ГД-23 и размер фенилпропионильной группы в дипептиде ГД-57 полностью заполняют пространство липофильного кармана рецептора.

С-концевой фрагмент. Амидная группа (–$CONH_2$) на С-конце важна. Замена её на метиловый эфир или метиламид (ГД-30, ГД-33) приводила к потере активности; переход к свободной карбоксильной группе (ГД-32) вызывал снижение, но не полную утрату эффекта. Это указывает на требования к донорно-акцепторным и водородно-связывающим свойствам С-концевого фрагмента и возможные стерические ограничения, даже наличие метильного заместителя при С-конце оказывается избыточным.

На основании полученных данных установлено, что ключевую роль в проявлении анксиолитической активности играют L-конфигурация остатка триптофана, размер *N*-ацильной группы при аминогруппе триптофана и характер С-замещения.

2.6.2 Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-102 на мышах

Для выявления влияния природы С-замещения в молекуле ГД-102 на анксиолитическую активность были получены соответствующие метиламид (ГД-119), метиловый эфир (ГД-116) и соединение со свободной карбоксильной группой (ГД-118). Синтетический путь представлен на рисунке 56:

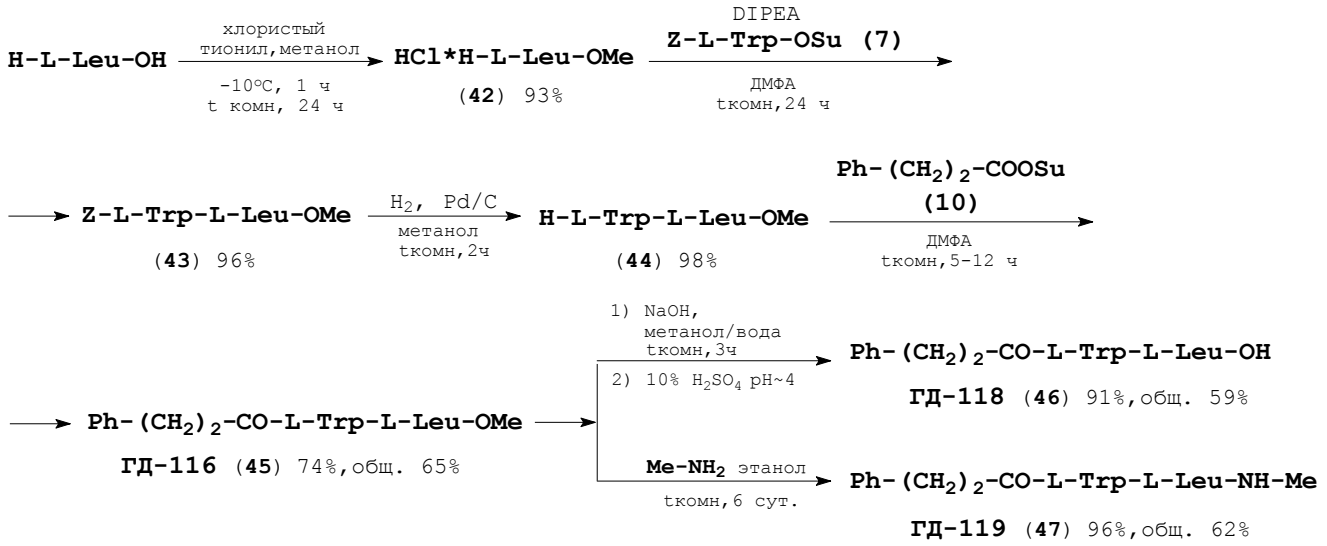


Рисунок 56 - Синтез С-замещенных аналогов дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-102

Для выявления влияния природы фенилалканоильного фрагмента были синтезированы следующие *N*-замещенные аналоги соединения ГД-102: амид *N*-фенилацетил-L-триптофанил-L-лейцина ($PhCH_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2, ГД-107) – с заменой остатка фенилпропионовой кислоты на остаток фенилуксусной кислоты и амид *N*-капроил-L-триптофанил-L-изолейцина ($CH_3(CH_2)_4C(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2, ГД-108) – с заменой остатка фенилпропионовой кислоты на остаток гексановой кислоты. Синтетический путь получения *N*-замещенных аналогов дипептида ГД-102 представлен на рисунке 57:

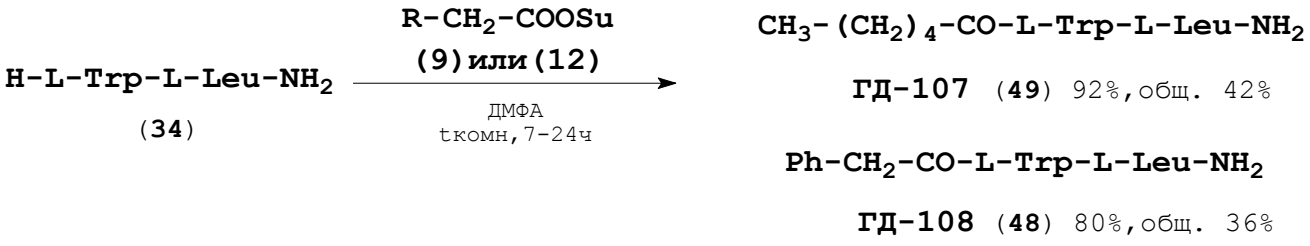


Рисунок 57 - Синтез *N*-замещенных аналогов дипептида ГД-102

Для выявления роли боковых радикалов аминокислотных остатков в дипептиде ГД-102 были синтезированы его глициновые аналоги амид *N*-карбобензокси-глицил-L-лейцина (ГД-129) и амид *N*-карбобензокси-L-триптофанил-L-глицина (ГД-125). Синтетический путь получения глициновых аналогов дипептида ГД-102 представлен на рисунке 58:

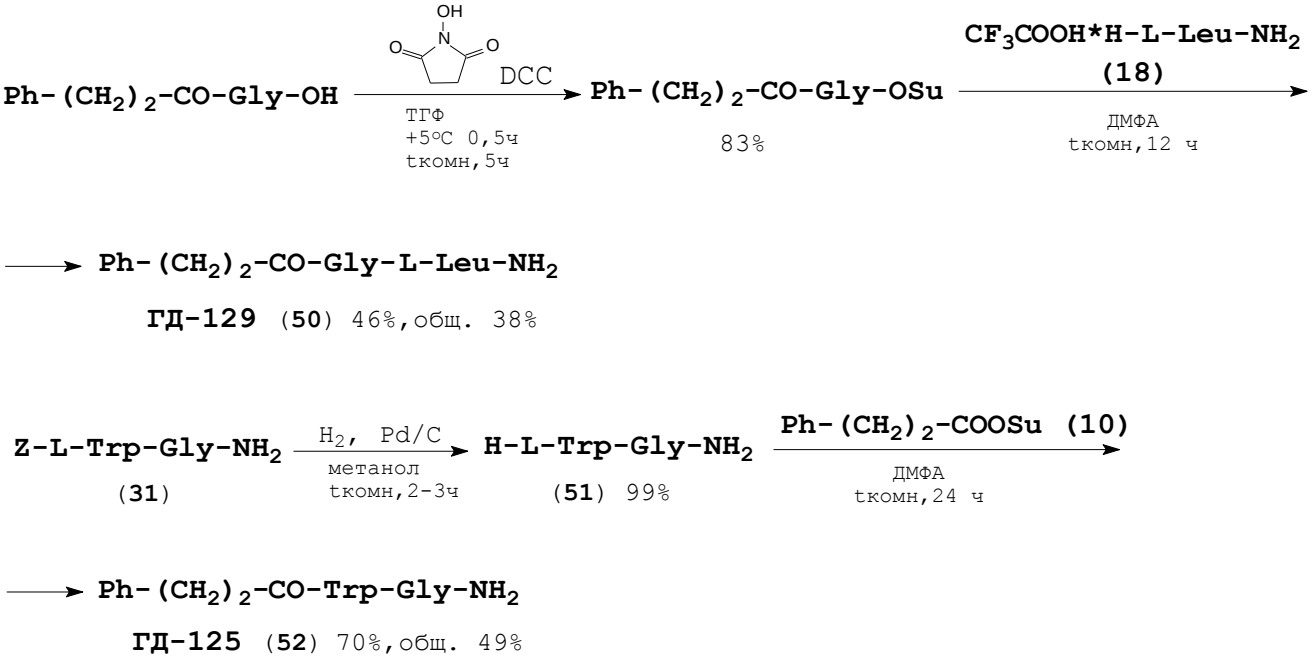


Рисунок 58 - Синтез глициновых аналогов дипептида ГД-102

Анксиолитическую активность всех синтезированных соединений изучали на мышах BALB/c в тесте ОП со световой вспышкой. За меру анксиолитического эффекта принималось увеличение ОДА животных. Результаты представлены в таблице 11:

Таблица 11 - Анксиолитическая активность аналогов дипептида ГД-102 ($Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2) в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой у мышей линии BALB/c

Соединение, № (шифр)	Доза, мг/кг, в/б	ПА	ЦА	Ц	ВА	ОДА
Стереоизомеры						
ГД-128 (D,L)	Контроль	35.88 (9.03)	2.38 (2.62)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	38.25 (10.98)
	0.1 мг/кг	37.13 (16.23)	18.00 (10.42)*	0.75 (1.16)	0.00 (0.00)	55.88 (21.43)

	0.5 мг/кг	42.75 (16.02)	15.75 (9.27)*	1.38 (1.77)	0.00 (0.00)	59.88 (10.29)*
	1.0 мг/кг	35.25 (11.62)	21.88 (12.64)*	1.63 (2.39)*	0.13 (0.35)	58.88 (17.55)
	p (ANOVA)	0.7884	0.0009	0.0807	0.3916	0.0599
ГД-123 (L,D)	Контроль	35.88 (9.03)	2.38 (2.62)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	38.25 (10.98)
	0.1 мг/кг	23.00 (15.25)	1.25 (1.49)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	24.25 (15.10)
	0.5 мг/кг	23.63 (20.87)	4.13 (7.18)	0.13 (0.35)	0.13 (0.35)	28.00 (25.82)
	1.0 мг/кг	23.13 (20.59)	5.38 (9.61)	0.50 (1.41)	0.13 (0.35)	29.13 (21.31)
	p (ANOVA)	0.1998	0.8590	0.5583	0.5587	0.3491
Глициновый скан						
ГД-129 (Gly-Leu)	Контроль	35.88 (9.03)	2.38 (2.62)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	38.25 (10.98)
	0.1 мг/кг	32.38 (11.12)	3.75 (3.77)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	36.25 (13.68)
	0.5 мг/кг	45.88 (10.43)	13.63 (11.87)*	0.50 (0.76)	0.50 (0.76)	60.50 (18.74)*
	p (ANOVA)	0.0715	0.0294	0.1258	0. 3792	0.0299
ГД-125 (Trp-Gly)	Контроль	35.88 (9.03)	2.38 (2.62)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	38.25 (10.98)
	0.1 мг/кг	34.75 (11.02)	5.63 (5.42)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	40.75 (9.79)
	0.5 мг/кг	56.75 (17.89)*	8.50 (5.18)*	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	65.38 (21.57)*
	1.0 мг/кг	24.88 (14.81)	24.88 (19.53)*	1.50 (1.60)*	0.00 (0.00)	51.25 (11.71)*
	p (ANOVA)	0.0022	0.0058	0.0198	1.0000	0.0032
Модификация N-конца						
ГД-107 (фенилацетил)	Контроль	26.00 (10.36)	3.38 (3.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	29.38 (11.70)
	0.1 мг/кг	55.88 (17.04)*	3.75 (2.87)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	59.63 (15.71)*
	0.5 мг/кг	54.38 (21.44)*	0.88 (1.36)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	55.50 (22.67)*
	1.0 мг/кг	48.75 (13.38)*	2.38 (4.21)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	51.25 (17.45)*
	p (ANOVA)	0.0057	0.0993	0.3916	0.1023	0.0068
ГД-108 (капроил)	Контроль	26.00 (10.36)	3.38 (3.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	29.38 (11.70)
	0.1 мг/кг	24.88 (10.97)	1.50 (1.41)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	26.38 (11.62)
	0.5 мг/кг	46.00	0.25	0.00	0.00	46.25

		(13.37)*	(0.46)*	(0.00)	(0.00)	(13.41)*
	1.0 мг/кг	59.50 (14.66)*	3.50 (5.04)	0.13 (0.35)	0.50 (1.07)	63.63 (12.53)*
	p (ANOVA)	0.0003	0.0193	0.3916	0.1026	0.0002
Модификация С-конца						
ГД-116 (OCH_3)	Контроль	26.00 (10.36)	3.38 (3.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	29.38 (11.70)
	0.1 мг/кг	60.88 (18.53)*	7.50 (10.81)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	68.50 (22.65)*
	0.5 мг/кг	44.75 (10.65)*	11.13 (12.24)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	56.00 (20.34)*
	1.0 мг/кг	44.13 (17.37)*	4.25 (6.34)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	48.50 (21.57)*
	p (ANOVA)	0.0033	0.1613	0.7846	1.000	0.0045
ГД-118 (OH)	Контроль	35.88 (9.03)	2.38 (2.62)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	38.25 (10.98)
	0.1 мг/кг	54.63 (21.75)*	15.13 (11.51)	0.50 (0.53)	0.00 (0.35)	70.38 (29.08)*
	0.5 мг/кг	36.63 (9.74)*	21.00 (11.21)	0.63 (0.74)	0.75 (1.04)	59.00 (20.31)*
	1.0 мг/кг	51.75 (14.80)*	27.88 (26.84)*	1.00 (1.31)*	0.63 (1.06)	81.25 (19.83)*
	p (ANOVA)	0.0481	0.0050	0.0626	0.0888	0.0063
ГД-119 ($NHCH_3$)	Контроль	26.00 (10.36)	3.38 (3.07)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	29.38 (11.70)
	0.1 мг/кг	44.50 (14.15)*	7.25 (7.69)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	52.13 (18.47)*
	0.5 мг/кг	38.50 (9.32)*	31.38 (9.88)*	1.25 (1.28)*	0.00 (0.00)	71.13 (15.39)*
	1.0 мг/кг	67.25 (12.48)*	16.25 (23.39)*	0.50 (1.07)	0.00 (0.00)	84.00 (18.92)*
	p (ANOVA)	0.0002	0.0001	0.0192	1.000	0.0002

Примечание: ПА - число пересеченных квадратов на периферии; ЦА - число пересеченных квадратов в центральных областях; Ц - число заходов в центр; ВА - число вертикальных стоек; ОДА - суммарное число пересеченных квадратов вместе с числом вертикальных стоек; Количество животных в каждой группе-8; Данные представлены в виде S (SD), где S – среднее значение, SD – стандартное отклонение; p (ANOVA) – p-значение по методу Краскела-Уоллеса. Розовым цветом показаны активные дозы

Анализ связи «структура-анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептидного лиганда ГД-102 выявил следующие особенности.

Стереохимия и вклад боковых групп аминокислот. Замена L-лейцина в структуре ГД-102 на D-лейцин полностью устраняет анксиолитическую активность (таблица 11): стереоизомер ГД-123 (L, D) не проявляет эффекта в диапазоне доз 0.1–1.0 мг/кг. Замена L-триптофана на D-триптофан приводит к снижению активности: для стереоизомера ГД-128 (D, L) минимальная

действующая доза возрастает в 50 раз по сравнению с ГД-102 (с 0.01 до 0.5 мг/кг; см. таблицу 11). Эти данные указывают на выраженную стереоспецифичность эффекта и критическую роль природной L-конфигурации, особенно для остатка лейцина. Вероятно, D-конфигурация лейцина создаёт стерические препятствия для оптимального связывания дипептида с участком рецептора.

Последовательное удаление боковых цепей путём замены каждого из а.о. на глицин снижает активность. При переходе от ГД-102 к ГД-125 (*N*-фенилпропионил-L-Trp-Gly-NH_2) и к ГД-129 (*N*-фенилпропионил-Gly-L-Leu-NH_2) минимальная действующая доза увеличивается с 0.01 до 0.5 мг/кг. Следовательно, индольный боковой фрагмент триптофана и алифатическая боковая цепь лейцина значимы для проявления анксиолитического эффекта. При этом индольный фрагмент важен, но не необходим - его замена на глицин не обнуляет активность, тогда как сохранение полноценной боковой цепи лейцина оказывается принципиальным.

N-концевой заместитель. Замена арилсодержащего *N*-фенилпропионильного фрагмента на алифатический *N*-гексаноильный, равного по количеству σ-связей (для ГД-108), ведёт к 50-кратному ухудшению эффекта по минимально эффективной дозе. Укорочение фенилпропионильного фрагмента до фенилацетильного (для ГД-107) снижает активность лишь в ~10 раз. Это подчёркивает необходимость ароматического фенильного ядра в *N*-ацильном заместителе и указывает на оптимальную дистанцию: длина линкера между ароматическими заместителями порядка 7-ми σ-связей.

C-концевой фрагмент. Наиболее активным соединением остаётся непосредственно сам ГД-102 с незамещенной амидной группой на С-конце: анксиолитический эффект проявляется уже в дозе 0.01 мг/кг, что на порядок эффективнее, чем у соединения со свободной карбоксильной группой (ГД-118) либо у замещенных производных - метилового эфира (ГД-116) и метиламида (ГД-119) (таблица 11). Таким образом, С-концевой амид предпочтителен для поддержания высокой эффективности.

Полученные данные позволяют предположить, что необходимыми фармакофорными элементами в структуре дипептидного лиганда являются: L-конфигурации обоих а.о., особенно критично для лейцина: замена на D-Leu приводит к утрате активности, Gly вместо Leu - увеличение минимально действующей дозы; ароматический *N*-ацильный фрагмент - фенильное ядро на расстоянии порядка семи σ-связей от индольного кольца триптофана; С-концевой амид как предпочтительная группа.

2.6.3 Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов дипептида ГД-102 с обратной последовательностью аминокислотных остатков (Leu-Trp) на мышах

В процессе докирования было отмечено, что взаимное расположение индолсодержащих гидрофобных остатков дипептидов и PK11195 (для которого имеется структура комплекса с TSPO) различается. Совмещение этих остатков могло быть достигнуто при обратной последовательности аминокислотных остатков в структуре дипептида.

Для изучения замены последовательности а.о. Trp-Leu на Leu-Trp были синтезированы 5 аналогов дипептида ГД-102 с обратной последовательностью а.о. и изучена связь структуры и анксиолитической активности в их ряду (рисунок 59). Синтезированы следующие соединения:

амид N-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана (ГД-136), отличающийся от ГД-102 только обратной последовательностью а.о.

Для выявления роли расстояния между фенильным радикалом и индольным ядром триптофана в структуре ГД-136 синтезирован *амид N-фенилацетил-L-лейцил-L-триптофана* (ГД-141) с укороченным на одну CH_2-группу ацильным радикалом.

Для выявления роли заместителя при С-конце дипептида ГД-136 синтезированы соединения:

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).

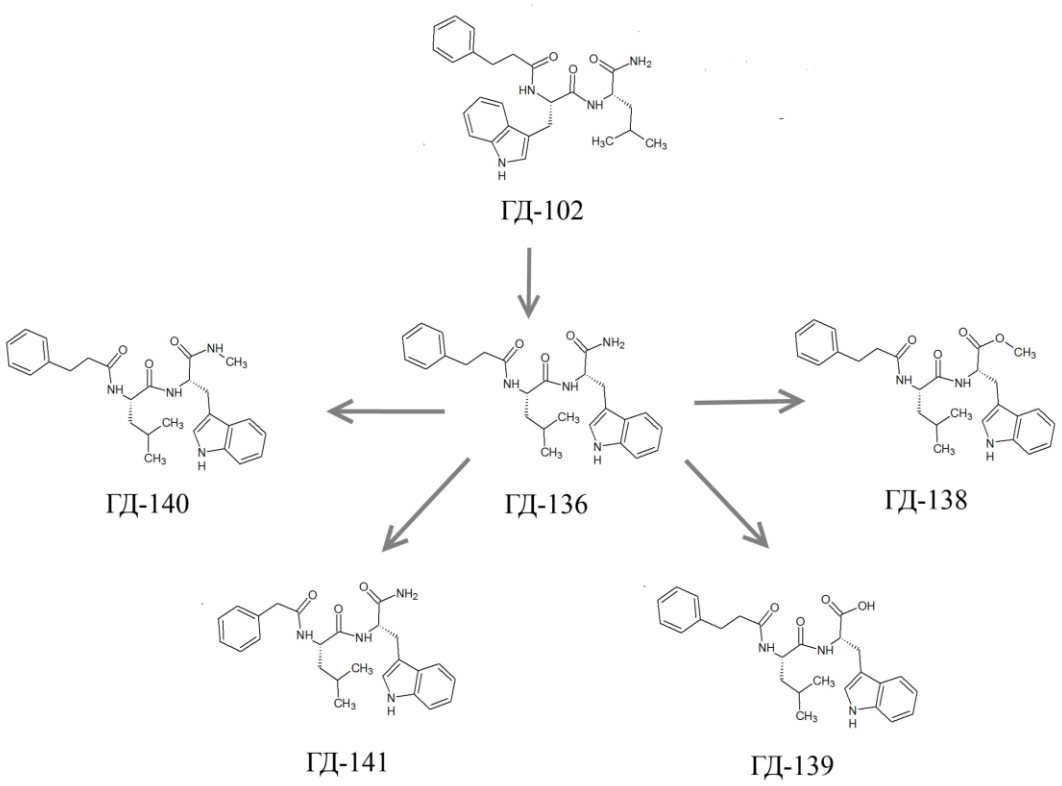


Рисунок 59 - Структуры замещенных дипептидов с обратной последовательностью аминокислотных остатков, аналогов дипептидного лиганда TSPO ГД-102

Эти дипептиды получены методами классического пептидного синтеза в растворе, используя активированные сукцинимидные эфиры.

Для синтеза дипептидов амида фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана и амида фенилацетил-L-лейцил-L-триптофана (ГД-136 и ГД-141 соответственно) использовали коммерчески доступные Z-L-триптофан и L-лейцин. Сукцинимидные эфиры Z-L-триптофана, Boc-L-лейцина, фенилпропионовой и фенилуксусной кислот получали, используя *N*-гидроксисукцинимид и дициклогексилкарбодиимид, в условиях Андерсона. Амид Z-L-триптофана получали взаимодействием его сукцинимидного эфира с раствором разбавленного водного аммиака. Z-защитную группу удаляли методом каталитического гидрогенолиза в присутствии катализатора 10% Pd/C. Амид L-триптофана со свободной аминогруппой ацилировали сукцинимидным эфиром Boc-L-лейцина в ДМФА, получая Boc-защищеный амид дипептида Boc-L-Leu-L-Trp-NH_2 с выходом 76%. Boc-защитную группу с полученного амида удаляли трифторуксусной кислотой в дихлорметане с количественным выходом. Конденсация активированных сукцинимидных эфиров фенилпропионовой и фенилуксусной кислот с трифторацетатом L-Leu-L-Trp-NH_2 в ДМФА при комнатной температуре давала с выходами 66% и 74% соединения ГД-136 и ГД-141 соответственно (рисунок 60).

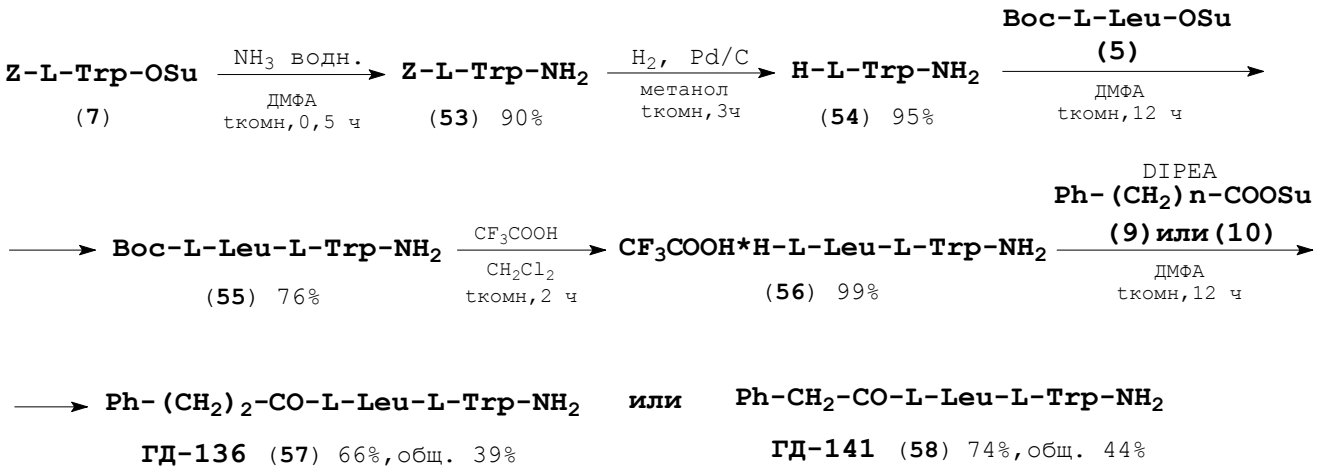


Рисунок 60 - Синтез замещенных дипептидов, амида фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана (ГД-136) и амида фенилацетил-L-лейцил-L-триптофана (ГД-141)

Для синтеза дипептидов с варьированием С-замещения (ГД-138, ГД-139, ГД-140) использовали коммерчески доступные L-триптофан и L-лейцин (рисунок 61). Метиловый эфир Boc-L-лейцил-L-триптофана (Boc-L-Leu-L-Trp-OMe) получали конденсацией в ДМФА полученного по методу Андерсона сукцинимидного эфира Boc-защищенного L-лейцина с гидрохлоридом метилового эфира L-триптофана. Затем Boc-защитную группу лейцина удаляли трифторуксусной кислотой в дихлорметане. Метиловый эфир *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана получали конденсацией в ДМФА сукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты и TFA*H-Leu-L-Trp-OMe с выходом 93%. Полученный продукт (метиловый эфир *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OMe, ГД-138) подвергали аммонолизу метиламином в метиловом спирте, получая замещенный амид $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-$NHCH_3$ (ГД-140) с выходом 96%. Соединение со свободной карбоксильной группой $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OH (ГД-139) получали с выходом 97% щелочным гидролизом метилового эфира *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана в водно-спиртовом растворе.

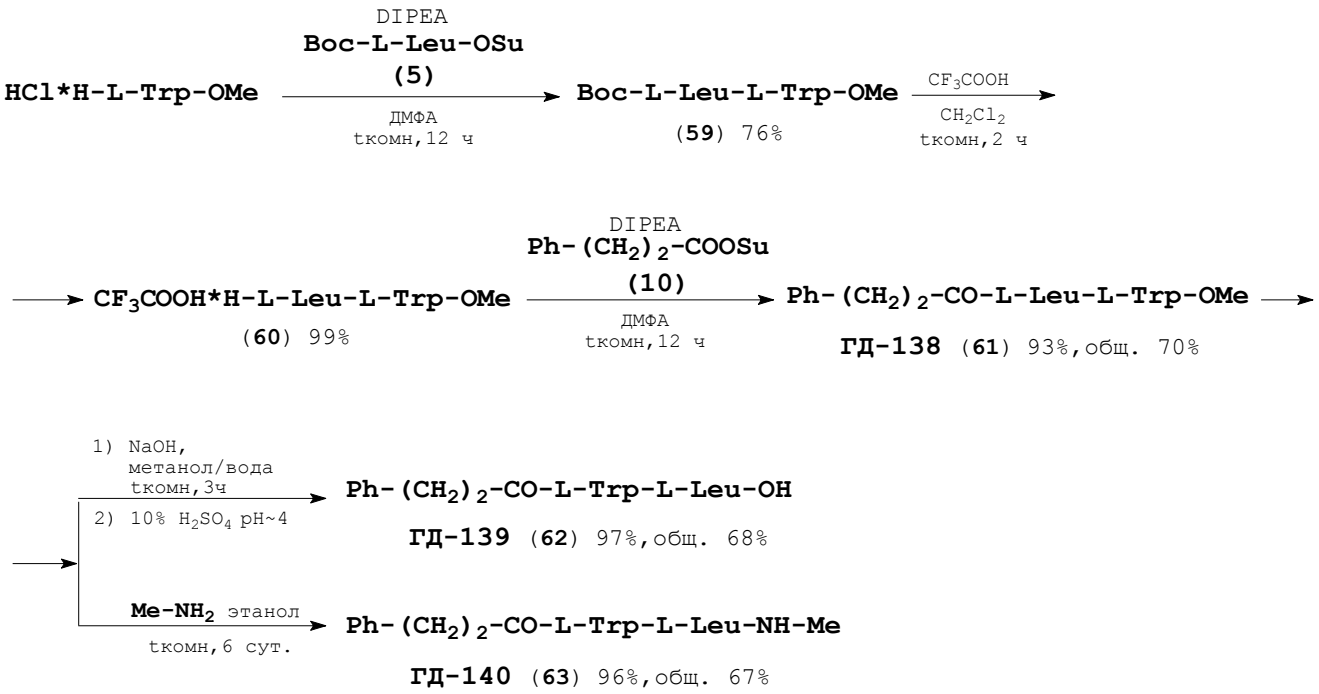


Рисунок 61 - Синтез дипептидов с варьированием С-замещения (ГД-138, ГД-139, ГД-140)

Синтезированные дипептиды исследованы на наличие анксиолитической активности в тесте ОП со световой вспышкой на мышах линии BALB/c. Результаты анализа представлены в таблице 12. Как видно из таблицы, наиболее активным в исследованной группе соединений 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 сединения ГД-136 (амид *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана) в интервале исследуемых доз 0.1-5.0 мг/кг в/б не зарегистрирована.

Таблица 12 - Влияние дипептидов с обратной последовательностью аминокислотных остатков (ГД-136, ГД-138, ГД-139, ГД-140, ГД-141) на поведение мышей BALB/c в тесте «Открытое поле» при внутрибрюшинном введении

Соединение, № (шифр)	Доза, мг/кг, в/б	ПА	ЦА	Ц	ВА	ОДА
ГД-102	Контроль 1	15.88 (7.75)	0.50 (0.53)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	16.38 (8.07)
	0.01	36.75 (14.35)*	6.25 (6.88)*	0.25 (0.46)	0.50 (0.53)	43.75 (19.11)*
	0.05	47.50 (20.45)*	3.75 (4.06)	0.00 (0.00)	0.50 (0.53)	51.75 (22.99)*
	p (ANOVA)	0.002	0.024	0.124	0.056	0.002

	Контроль 2	5.50 (3.51)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	5.50 (3.51)
	0.1	10.75 (4.46)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	10.75 (4.46)*
	0.5	8.50 (3.07)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	8.63 (3.16)
	1.0	8.00 (3.63)	1.00 (1.41)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	9.00 (3.78)
	5.0	7.13 (3.56)	0.38 (1.06)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.50 (3.21)
	p (ANOVA)	0.0868	0.0363	1.000	1.000	0.0911
ГД-136	Контроль	19.50 (8.60)	0.75 (0.89)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.25 (8.80)
	0.1	20.38 (8.42)	1.13 (1.13)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.50 (8.91)
	0.5	24.75 (8.84)	1.00 (1.60)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	25.75 (9.72)
	1.0	22.00 (9.07)	0.88 (1.36)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	23.13 (9.39)
	5.0	17.75 (7.29)	1.13 (1.81)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	19.13 (8.08)
	p (ANOVA)	0.507	0.958	1.000	0.165	0.573
ГД-138	Контроль	19.50 (8.60)	0.75 (0.89)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.25 (8.80)
	0.1	12.25 (5.06)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	12.25 (5.06)*
	0.5	14.63 (10.04)	0.25 (0.71)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	14.88 (10.68)
	1.0	28.75 (7.25)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	28.75 (7.25)
	5.0	18.00 (6.93)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	18.13 (7.06)
	p (ANOVA)	0.005	0.036	1.000	1.000	0.005
ГД-139	Контроль	19.50 (8.60)	0.75 (0.89)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.25 (8.80)
	0.1	18.25 (9.16)	1.50 (2.27)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	19.75 (10.63)
	0.5	33.63 (11.50)*	2.13 (2.03)	0.00 (0.00)	0.38 (0.74)	36.13 (13.44)*
	1.0	32.38 (16.59)	1.75 (3.45)	0.13 (0.35)	0.13 (0.35)	34.38 (17.30)
	5.0	32.75 (8.84)*	0.50 (0.76)	0.00 (0.00)	0.13 (0.35)	33.38 (8.98)*
	p (ANOVA)	0.012	0.464	0.406	0.416	0.024
ГД-140	Контроль	19.50 (8.60)	0.75 (0.89)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.25 (8.80)
	0.1	54.88 (17.04)*	0.50 (0.76)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	55.38 (16.91)*
	0.5	38.63 (16.58)*	5.63 (8.81)*	0.25 (0.46)	0.50 (0.76)	45.00 (13.98)*

	1.0	37.38 (13.61)*	2.38 (2.20)	0.25 (0.46)	0.25 (0.46)	40.25 (14.77)*
	5.0	18.75 (5.95)	0.88 (1.46)	0.88 (1.46)	0.00 (0.00)	20.50 (5.04)
	p (ANOVA)	0.0001	0.069	0.170	0.061	0.000
ГД-141	Контроль	19.50 (8.60)	0.75 (0.89)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.25 (8.80)
	0.1	20.13 (6.10)	3.13 (4.26)	0.25 (0.46)	0.00 (0.00)	23.50 (7.25)
	0.5	23.75 (9.42)	3.38 (3.93)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	27.25 (13.07)
	1.0	48.75 (15.46)*	3.25 (2.87)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	52.38 (13.03)*
	5.0	47.88 (15.80)*	1.25 (2.43)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	49.38 (17.89)*
	p (ANOVA)	0.0001	0.366	0.314	0.084	0.0001

Примечание: ПА - число пересеченных квадратов на периферии; ЦА - число пересеченных квадратов в центральных областях; Ц - число заходов в центр; ВА - число вертикальных стоек; ОДА - суммарное число пересеченных квадратов вместе с числом вертикальных стоек; Количество животных в каждой группе-8; Данные представлены в виде S (SD), где S – среднее значение, SD – стандартное отклонение; *p (ANOVA) <0.05–значение по методу Краскела-Уоллеса. Розовым цветом показаны активные дозы

Таким образом, ни один из дипептидов последовательности Leu-Trp не имел анксиолитический эффект, превосходящий по минимальной действующей дозе таковой для дипептидного лиганда ГД-102. Полученные результаты указывают, что дополнительным требованием к минимальному фармакофорному элементу дипептидного лиганда TSPO является последовательность а.о. Trp-Leu, а не последовательность Leu-Trp.

Для верификации лигандных свойств всех полученных дипептидных соединений был проведен их молекулярный докинг в активный центр TSPO. Молекулярный докинг проводился с использованием структуры TSPO, взятой из базы данных PDB в комплексе с модельным лигандом PK-11195 (PDB ID: 2MGY), в программе Glide v9.1. Величины оценочной функции Docking Score (DS) находятся в интервале -10 – -7, что показывает возможность связывания этих соединений в активном кармане TSPO. В таблице 13 приведены сравнительные данные величин DS и активных доз, выявленных в тесте «Открытое поле» со световой вспышкой у мышей BALB/c.

Таблица 13 - Сравнение данных докинга дипептидных лигандов TSPO и их анксиолитической активности в тесте открытого поля со световой вспышкой на мышах Balb/c

№ (по убыванию DS)	Шифр	Структура	Docking Score (DS)	Наличие анксиолитической активности в ОП	Дозы, мг/кг, в/б
1	ГД-39	Z-L-Trp-Gly-NH_2	-10.2828	++	0.01, **0.1*, 0.5*, 1.0*,** 5.0
2	ГД-125	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-Gly-NH_2	-10.1012	+	0.1, **0.5*, 1.0***
3	ГД-23	Z-L-Trp-L-Ile-NH_2	-9.96696	++	**0.05*, 0.1*, 0.5***, **1.0***, 5.0
4	ГД-136	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-**Leu**-L-**Trp**-NH_2	-9.87576	0	0.1, 0.5, 1.0, 5.0
5	ГД-107	$Ph(CH_2)C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2	-9.80618	+	**0.1***, **0.5*, 1.0***
6	ГД-36	$Ph(CH_2)C(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2	-9.77786	0	0.1, 0.5, 1.0, 5.0
7	ГД-108	$CH_3(CH_2)_4C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2	-9.63644	0+	0.1, **0.5*, 1.0***
8	ГД-139	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-**Leu**-L-**Trp**-OH	-9.50703	0+	0.1, **0.5***, 1.0, **5.0***
9	ГД-123	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-D-Leu-NH_2	-9.3902	0	0.1, 0.5, 1.0
10	ГД-57	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2	-9.33464	++	**0.1*, 0.5*, 1.0***
11	ГД-118	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Ile-OH	-9.17627	++	**0.1*, 0.5*, 1.0***
12	ГД-141	$Ph(CH_2)C(O)$-L-**Leu**-L-**Trp**-NH_2	-9.15915	0+	0.1, 0.5, **1.0*, 5.0***
13	ГД-25	Z-D-Trp-L-Ile-NH_2	-9.14513	0	0.1, 0.5, 5.0
14	ГД-32	Z-L-Trp-L-Ile-OH	-9.03284	0	0.1, 0.5, 1.0, **5.0***
15	ГД-102	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2	-8.72751	+++	**0.01*, 0.05*, 0.1***, 0.5, 1.0, 5.0
16	ГД-128	$Ph(CH_2)_2C(O)$-D-Trp-L-Leu-NH_2	-8,72751	0+	0.1, **0.5***, 1.0
17	ГД-69	Z-L-Trp-D-Ile-NH_2	-8.63608	0	0.1, 0.5, 1.0, 5.0
18	ГД-129	$Ph(CH_2)_2C(O)$-Gly-L-Leu-NH_2	-8.44372	0+	0.1, **0.5***
19	ГД-140	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-**Leu**-L-**Trp**-$NHCH_3$	-8.30725	0+	0.1, **0.5*, 1.0***, 5.0
20	ГД-138	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-**Leu**-L-**Trp**-OCH_3	-8.24448	-	0.1, 0.5, 1.0, 5.0
21	ГД-116	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OCH_3	-7.99562	++	**0.1***, **0.5*, 1.0***
22	ГД-30	Z-L-Trp-L-Ile-OCH_3	-7.97917	0	0.1, 0.5, 1.0, 5.0
23	ГД-56	Z-Gly-L-Ile-NH_2	-7.59755	+	**0.1*, 1.0*,**
24	ГД-119	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-	-7.57086	++	**0.1*, 0.5*, 1.0***

		$NHCH_3$			
25	ГД-28	$Ph(CH_2)_5C(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2	-7.13969	0	0.1, 0.5, **1.0***, 5.0
26	ГД-33	Z-L-Trp-L-Ile-$NHCH_3$	-6.66013	0	0.1, 0.5, 1.0, 5.0

Примечание: **p* (ANOVA) <*0*.05–значение по методу Краскела-Уоллеса. Красным цветом выделены варьируемые группы. Розовым цветом выделены лидерные соединения. Активные дозы выделены жирным шрифтом

Как и предполагает используемый протокол Glide с надстройкой для докинга пептидных лигандов [307], значения DS на 65-70% коррелируют с наличием анксиолитической активности *in vivo* в ряду изученных аналогов дипептидных лигандов ГД-23 и ГД-102 (18 активных соединений из 26). Высокие абсолютные значения DS в данном случае не могут гарантировать 100% наличия активности в *in vivo* моделях, так как расчеты оценочной функции плохо учитывают вклад энтропии боковых цепей а.о. [308, 309] и роль липидной среды, так как TSPO - мембранный белок. Также виртуальные расчеты DS в Glide не могут учесть такие процессы в *in vivo* моделях, как способность соединений проникать через ГЭБ и их распределение в тканях мозга животных.

Таким образом, изучение связи структуры и анксиолитической активности в ряду синтезированных дипептидных лигандов TSPO показало необходимость природной L-конфигурации обоих а.о. и последовательности Trp-Leu в структуре дипептида, а также оптимальность незамещенной амидной группы при С-конце и фенилпропионильного остатка при N-конце для проявления анксиолитической активности. Эти данные позволили предположить, что в структуру эндогенного лиганда TSPO может входить фрагмент -Phe-Trp-Leu-. Анализ базы данных пептидов EROP-Moscow [310] показал, что из 19327 пептидов только два содержат последовательность Phe-Trp-Leu: Gastrin/cholecystokinin like peptide D1 (SEGGQDFWL) и Natalisin 2 (TLVMGSDGAFWLTR). Эти пептиды могут быть предшественниками активного трипептидного лиганда TSPO: соединения амида L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, H-Phe-Trp-Leu-NH_2. Этот трипептид также был синтезирован (шифр ГД-186).

2.6.4 Синтез потенциального эндогенного трипептидного лиганда TSPO, амида L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, ГД-186

Трипептид структуры H-Phe-Trp-Leu-NH_2 был синтезирован с использованием методов активированных эфиров по методу Андерсона [287] (рисунок 62).

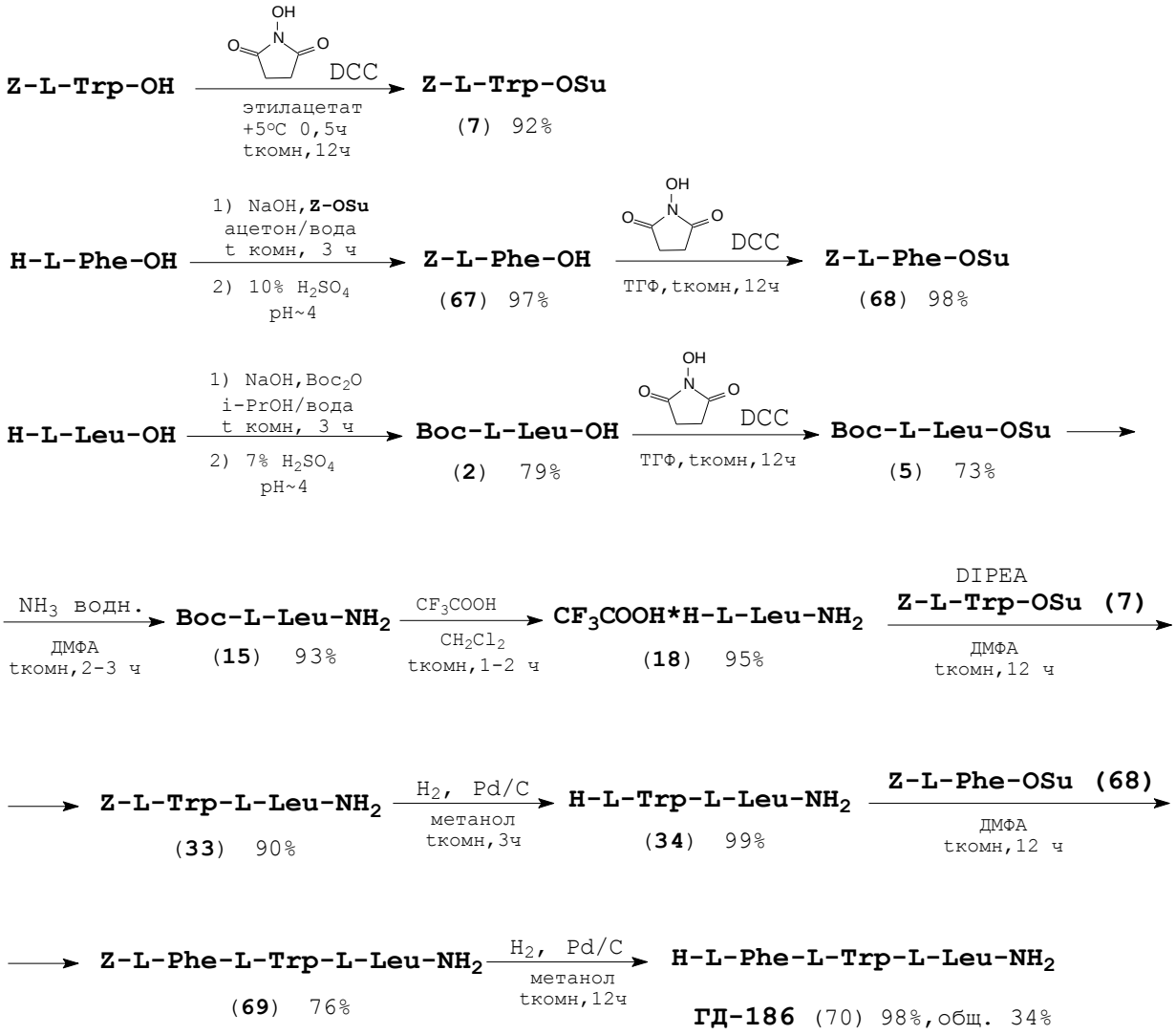


Рисунок 62 - Синтез трипептида H-Phe-Trp-Leu-NH_2, предполагаемого лиганда TSPO пептидной природы

Для верификации лигандных свойств по отношению к TSPO для ГД-186 был осуществлён молекулярный докинг в активный центр TSPO. Молекулярный докинг проводился с использованием структуры TSPO в комплексе с селективным лигандом PK-11195 (PDB ID: 2MGY), в программе Glide v9.1. с использованием XP протокола. Трипептид ГД-186 докируется в активный центр TSPO, показывая при этом характерную для лигандов TSPO энергию связывания по оценочной функции Docking Score (DS), сопоставимую с таковой для селективного лиганда PK-11195 и дипептидного лиганда ГД-102 (таблица 14), а также характерную для лигандов TSPO высокую липофильность (logP~3). Для ГД-186 и лигандов сравнения было показано наличие π-π стэкинга между фенильным фрагментом лиганда и Trp143 рецептора (таблица 14), что возможно может играть важную роль для проявления лигандных свойств.

Таблица 14 - Данные молекулярного докинга дипептида ГД-186 в сравнении с модельным лигандом TSPO PK-11195 и дипептидным лигандом ГД-102

Шифр	Формула	logP	π -π взаимодействие Ph-Trp	функция DS
PK-11195	*N*-бутан-2-ил-1-(2-хлорофенил)-*N*-метилизохинолин-3-карбоксамид	3.50	Trp143	-10.0
ГД-186	H-L-Phe-L-Leu-L-Trp-NH_2	2.95	Trp143	-9.87
ГД-102	$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-NH_2	3.18	Trp143	-10.35

Дополнительно был проведен расчет молекулярной динамики трипептида ГД-186. Для моделирования молекулярной динамики исходная структура комплекса TPSO с ГД-186 была получена с помощью молекулярного докинга в программе AutoDock Vina 1.1.2 [311]. Моделирование молекулярной динамики проводилось как описано в [312], с использованием силового поля CHARMM36/CGenFF 4.4 [313-315] в программном обеспечении GROMACS 2021.2 [315]. Положение молекулы ГД-186 в кармане TSPO, рассчитанное как в программе AutoDock Vina 1.1.2. [311], так и после моделирования молекулярной динамики показано на рисунке 63:

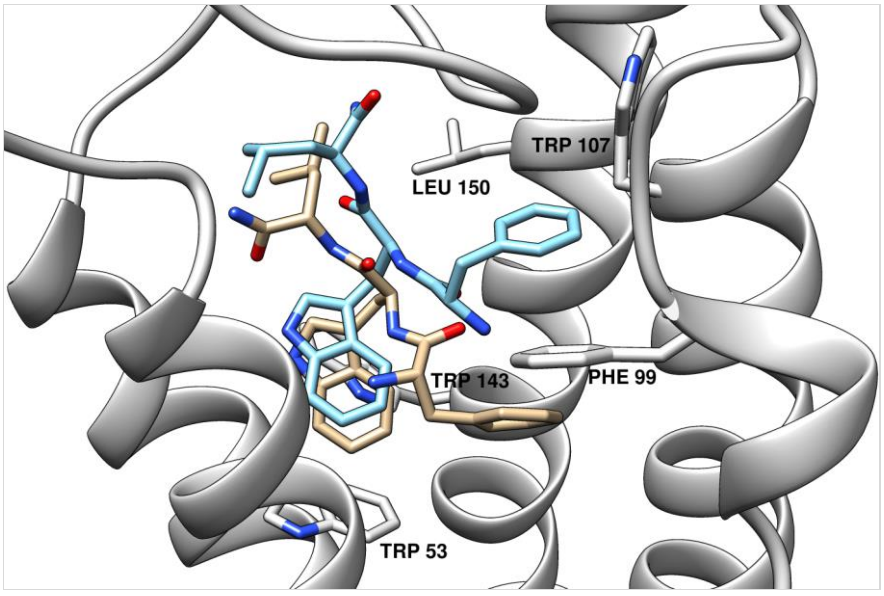


Рисунок 63 - Сравнительное расположение трипептида ГД-186 в сайте связывания PK-11195 в TPSO, предсказанное методом молекулярного докинга с использованием Autodock Vina 1.1.2 (представлено светло-голубой стержневой моделью), и способ связывания трипептида ГД-186, полученный после моделирования молекулярной динамики (показан бежевой стержневой моделью). Молекулы липидов и атомы водорода опущены для наглядности

Согласно данным докинга, положение трипептида ГД-186 довольно близко к положению PK-11195 из-за взаимодействия ароматических фрагментов трипептида с аминокислотными остатками Trp143 и Trp107, а также расположения боковой цепи Leu вблизи гидрофобных остатков в TSPO. Различное расположение бензольных колец соответствует предположению о различной функциональной активности PK-11195 и ГД-186.

Молекулярно-динамические симуляции (см. график среднеквадратичных отклонений от исходных положений неводородных атомов белка и лиганда на рисунке 64) показывают, что динамическое равновесие достигается через 20 нс, и подтверждают (вместе с визуальным анализом), что система сохраняет стабильность в течение последующего хода производственной симуляции (всего 100 нс).

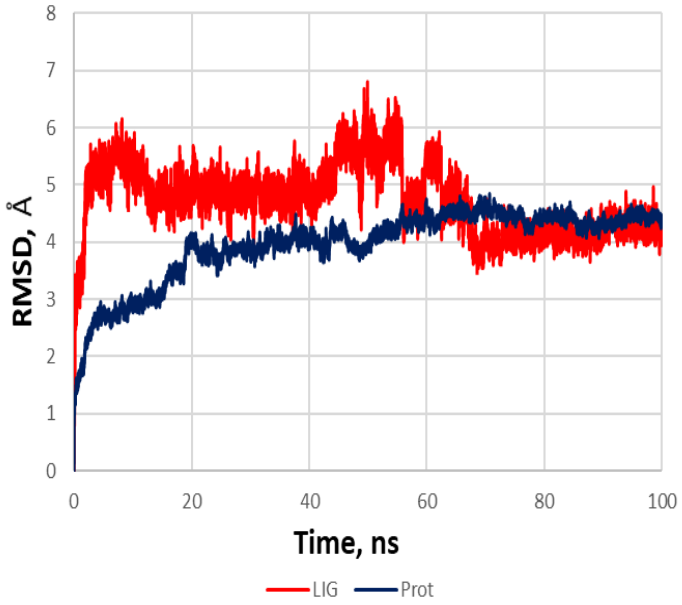


Рисунок 64 - Среднеквадратичное отклонение (RMSD) неводородных атомов системы ГД-186/белок/мембрана/вода/ионы (показано синим цветом) и трипептида ГД-186 (показано красным цветом) в ходе моделирования молекулярной динамики комплекса с TSPO

2.6.5 Выявление анксиолитической активности трипептидного лиганда ГД-186 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

В эксперименте использовались мыши-самцы линии BALB/c массой 20-25 г, полученных из питомника «Андреевка». ГД-186 был изучен в дозах 1.0, 5.0 и 10 мг/кг (в/б).

Соединение ГД-186 в дозе 10 мг/кг статистически значимо увеличивало процент выходов мышей на открытые рукава ПКЛ и в виде тенденции вызывало увеличение продолжительности нахождения в открытых рукавах лабиринта (в %) (таблица 15). Два этих параметра рассматриваются как основные показатели анксиолитического действия соединений в данном тесте [297]. Также ГД-186 в дозе 10 мг/кг вызывал тенденцию к увеличению

абсолютного времени, проведенного мышами в открытых рукавах ПКЛ, что также свидетельствует об его анксиолитическом действии. В дозах 1 и 5 мг/кг ГД-186 был неактивен.

Таблица 15 - Анксиолитическая активность трипептидного лиганда ГД-186 в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах BALB/c

Группа, доза	Время на открытых рукавах, с	Время в закрытых рукавах, с	Число выходов на открытые рукава, ед.	Число заходов в закрытые рукава, ед.	Процент времени на открытых рукавах	Процент выходов на открытые рукава
Контроль	2.7±1.1	184.0±11.7	0.8±0.3	6.6±1.1	1.6±0.6	12.4±4.35
ГД-186 1 мг/кг	5.3±2.2	178.0±16.2	0.9±0.3	6.2±1.1	3.0±1.2	12.1±3.6
ГД-186 5 мг/кг	33.7±25.6	146.3±25.8	1.3±0.5	4.3±1.1	16.3±10.7	23.9±10.7
ГД-186 10 мг/кг	38.2±16.7$^{\#}$ (p=0.067)	143.4±22.4	2.3±0.7	4.5±0.7	21.5±9.0$^{\#}$ (p=0.076)	**32.1**±4.8* (p=0.039)

Примечание: # - тенденция (p<0,10) по сравнению с контролем; * - p<0.05 – по сравнению с контролем согласно критерию Краскелла-Уоллиса с последующим попарным межгрупповым сравнением по Данну. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего

Таким образом, соединение ГД-186 при однократном в/б введении в дозе 10 мг/кг проявляло анксиолитическую активность в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах BALB/c.

2.6.6 Выявление антидепрессивной активности трипептидного лиганда ГД-186 в тесте вынужденного плавания по Порсолту

ГД-186 изучали в дозах 10 и 30 мг/кг в/б в тесте вынужденного плавания по Порсолту в модификации с двумя посадками [304]. В качестве препарата сравнения использовали Амитриптилин (10 мг/кг в/б).

Установлено, что в изученных дозах 10 и 30 мг/кг ГД-186 статистически значимо снижал время иммобильности мышей по сравнению с контрольной группой соответственно на 26% (p=0.019) и 32% (p=0.002) (таблица 16). Амитриптилин снижал время иммобильности на 51% по сравнению с контрольной группой (p<0.0001).

Таблица 16 - Антидепресивный эффект при однократном в/б введении трипептидного лиганда ГД-186 в тесте вынужденного плавания у мышей BALB/c

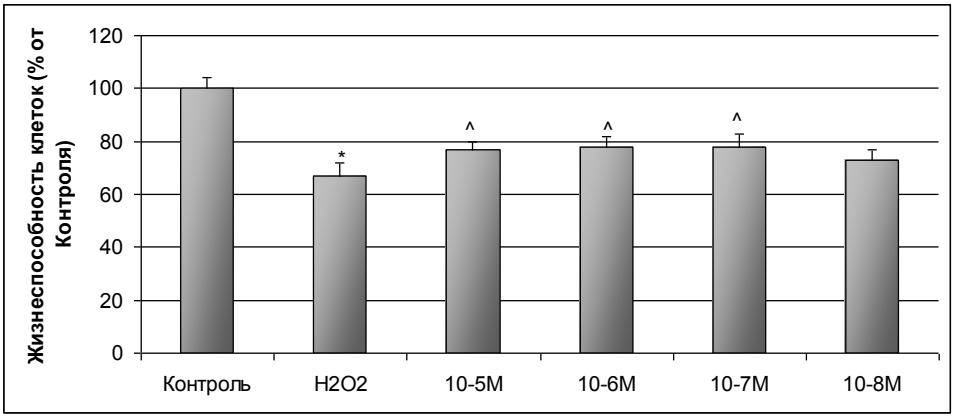
Группа, доза	Среднее время иммобильности, с	Время иммобильности, % от контрольной группы
Контроль	183.8±8.8	100
ГД-186 10 мг/кг	135.4±15.4*	73*
ГД-186 30 мг/кг	125.3±7.2**	68**
Амитриптилин 10 мг/кг	90.3±16.4****	49****

Примечание: * - p<0.05, ** - p<0.01, **** - p<0.0001 – по сравнению с контролем согласно критерию Краскелла-Уоллиса с последующим попарным межгрупповым сравнением по Данну.

Таким образом, соединение ГД-186 в дозах 10 и 30 мг/кг при однократном в/б введении проявляет антидепрессантоподобную активность в тесте вынужденного плавания на мышах.

2.6.7 Выявление нейропротекторной активности трипептидного лиганда ГД-186[4]

Нейропротекторная активность трипептида ГД-186 была изучена на модели окислительного стресса с использованием клеток гиппокампа мыши НТ-22 по методу [316]. Перекись водорода статистически значимо снизила жизнеспособность клеток примерно на 30% по сравнению с контролем (тест МТТ [317]). Трипептид ГД-186, введенный за 24 ч до воздействия перекиси водорода, значительно улучшил выживаемость клеток в диапазоне концентраций 10^{-5}– 10^{-7} М (рисунок 65).



Примечание: * - p<0.05 по сравнению с контролем, ^ p<0.05 по сравнению с H_2O_2 согласно однофакторному дисперсионному анализу ANOVA и критерию Краскела-Уоллиса с последующим применением критерия Данна

Рисунок 65 - Нейропротекторный эффект трипептида ГД-186 на культуре клеток линии НТ-22 в условиях окислительного стресса за 24 ч до внесения перекиси водорода

[4] Исследование нейропротекторной активности выполнено совместно с к.б.н. в.н.с. лаборатории молекулярной фармакологии Антиповой Т.А., ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Активность имела куполообразную зависимость от дозы, типичную для пептидов. Мы предполагаем, что наличие нейропротекторного эффекта ГД-186 за 24 ч до повреждения может быть связано с его влиянием на активацию синтеза нейростероидов *de novo*.

Таким образом, мы продемонстрировали, что полученный трипептид H-L-Phe-L-Trp-L-Leu-NH_2 обладает выраженными анксиолитическими, антидепрессантными и нейропротекторными свойствами, вероятнее всего, за счет действия на TSPO (учитывая его структурное сходство с лигандом TSPO ГД-102).

Это позволяет предположить, что указанный трипептид может быть потенциальным эндогенным лигандом TSPO, и делает интересным его дальнейшее исследование в ходе экспериментов *in/ex vivo*.

2.7 Разработка оптимальной схемы синтеза наиболее активного дипептидного лиганда TSPO, соединения ГД-102

Для разработки фармакологически активного соединения в качестве потенциального лекарственного средства необходимо выбрать оптимальный метод синтеза, который ляжет в основу лабораторного регламента. Были опробованы три различные схемы синтеза дипептида ГД-102.

Из методов активации карбоксильной группы, применяемых в пептидном синтезе наиболее популярны реагенты, образующие активированные эфиры в присутствии водоотнимающих агентов, а также имидазолиды аминокислот. Метод активированных эфиров дает меньше побочных продуктов по сравнению, например, с методом смешанных ангидридов. Из активированных эфиров чаще всего применяются *N*-оксисукцинимидные эфиры. Это связано с тем, что выделяющийся в процессе конденсации *N*-гидроксисукцинимид легко переходит в водную фазу, что облегчает очистку продукта реакции. В некоторых случаях используют пентафторфениловые эфиры, достоинством которых является большая скорость реакции по сравнению с *N*-оксисукцинимидными эфирами, а в случае наличия функциональных боковых радикалов - селективный ход реакции по карбоксильной группе, а также возможность получить продукт в твердом виде. Недостатком является канцерогенность пентафторфенола. При активации карбоксильной группы аминокислоты имидазолидным методом использование водоотнимающего агента не требуется. Скорость реакции выше по сравнению с активированными эфирами, однако, конечный имидазолид мало устойчив в растворе и требует более тщательного подбора и осушения растворителей.

Были осуществлены 3 схемы синтеза дипептида ГД-102. Первая схема (рисунок 66) - с использованием метода активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров; вторая схема (рисунок

67) - с использованием метода активированных пентафторфениловых эфиров; третья схема (рисунок 68) – с применением карбонилдиимидазола. Все реакции конденсации проводили в ДМФА. В качестве критериев оптимальности принимались 1) общий выход; 2) оптическая чистота конечного продукта; 3) стоимость исходных реагентов; 5) токсичность промежуточных продуктов.

Синтез по схеме, обозначенной на рисунке 66, как и по схеме на рисунке 67, состоит из 9 стадий. На первой стадии получали Boc-защищенный по аминогруппе лейцин. На второй стадии получали его активированный эфир - *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, которые в дальнейшем на третьей стадии подвергали аммонолизу в растворе разбавленного водного аммиака; затем удаляли Boc-защитную группу ацидолизом в присутствии трифторуксусной кислоты, получая, таким образом, трифторацетат амида лейцина. На следующем этапе проводилась активация карбоксильной группы Z-L-триптофана получением соответствующего активированного эфира - *N*-оксисукцинимидного или пентафторфенилового; затем ацилировали полученным активированным эфиром Z-L-триптофана деблокированный амид лейцина. Для удаления Z-защитной группы триптофана использовали метод каталитического гидрогенолиза. На следующем этапе получали активированный эфир фенилпропионовой кислоты, *N*-оксисукцинимидный или пентафторфениловый, с последующим ацилированием полученным эфиром деблокированного амида L-триптофанил-L-лейцина.

Принципиальное отличие третьей схемы (рисунок 68) синтеза дипептида ГД-102 от двух предыдущих в том, что в качестве исходных реагентов использовали защищенный сложноэфирной группой по карбоксильной группе лейцин. В этом случае нет необходимости защищать аминогруппу лейцина, и, как следствие, в схеме будут отсутствовать две стадии: введение Boc-защитной группы и удаление ее реакцией с трифторуксусной кислотой. Также, активация карбоксильной группы аминокислоты с помощью карбонилдиимидазола не требует использование водоотнимающего агента, что упрощает выделение конечного продукта.

При синтезе дипептида ГД-102 по схеме, обозначенной на рисунке 66, на первом этапе получали соответствующий амино-компонент: трифторацетат амида L-лейцина. Для этого синтезировали защищенный по аминогруппе лейцин (Boc-L-Leu-OH) стандартным методом введения Boc-защиты по Поздневу [288] с выходом 90%. Полученный Boc-защищенный L-лейцин превращали в *N*-оксисукцинимидный эфир по методике Андерсона [287] с выходом 73 %. В качестве растворителя использовали этилацетат, реакцию проводили при комнатной температуре. От твердого осадка дициклогексилмочевины избавлялись фильтрованием. Далее для получения амида (Boc-L-Leu-NH_2) сукцинимидный эфир подвергали аммонолизу разбавленным водным раствором аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Boc-защиту

удаляли ацидолизом с использованием трифторуксусной кислоты. Признаком окончания реакции было прекращение выделения пузырьков газа. Для удаления избытка трифторуксусной кислоты реакционную смесь трижды переупаривали с диэтиловым эфиром. Продукт выделяли в виде белого кристаллического вещества растиранием с диэтиловым эфиром. На следующей стадии получали сукцинимидный эфир Z-триптофана по стандартной методике Андерсона, используя в качестве растворителя этилацетат. Получали продукт в виде пены с высоким выходом (80-95%). Синтезированный *N*-оксисукцинимидный эфир Z-триптофана вводили в реакцию с трифторацетатом амида лейцина, который предварительно нейтрализовывали добавлением эквимолярного количества диизоропилэтиламина. Реакцию проводили в ДМФА, предварительно очищенном от содержащихся аминов перегонкой над нингидрином. Продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, фильтровали, сушили на воздухе. Продукт содержал примесь *N*-гидроксисукцинимида, от которой избавлялись перекристаллизацией из системы горячий этилацетат – гексан. Полученный защищенный дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора - 10% Pd на активированном угле. Реакцию проводили в течение двух часов в закрытой системе, используя метанол в качестве растворителя. Водород подавали через газометр Берцелиуса. После прохождения реакции катализатор отделяли фильтрованием, раствор с продуктом упаривали. Важно не оставлять катализатор сухим на фильтре в связи с его пирофорностью. Полученный *N*-свободный дипептид ацилировали сукцинимидным эфиром фенилпропионовой кислоты, получая конечный продукт с высоким выходом (71-80%) кристаллизацией из дистиллированной воды. Для дополнительной очистки перекристаллизовывали из горячего этилацетата с добавлением гексана. Соединение ГД-102 имело вид белого порошка с температурой плавления 198^{o}C, удельным углом оптического вращения -27˚ (c= 1, ДМФА) при 25˚C, сигналы ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектра соответствовали структуре. Диастереомерная чистота по данным ЯМР не ниже 98%.

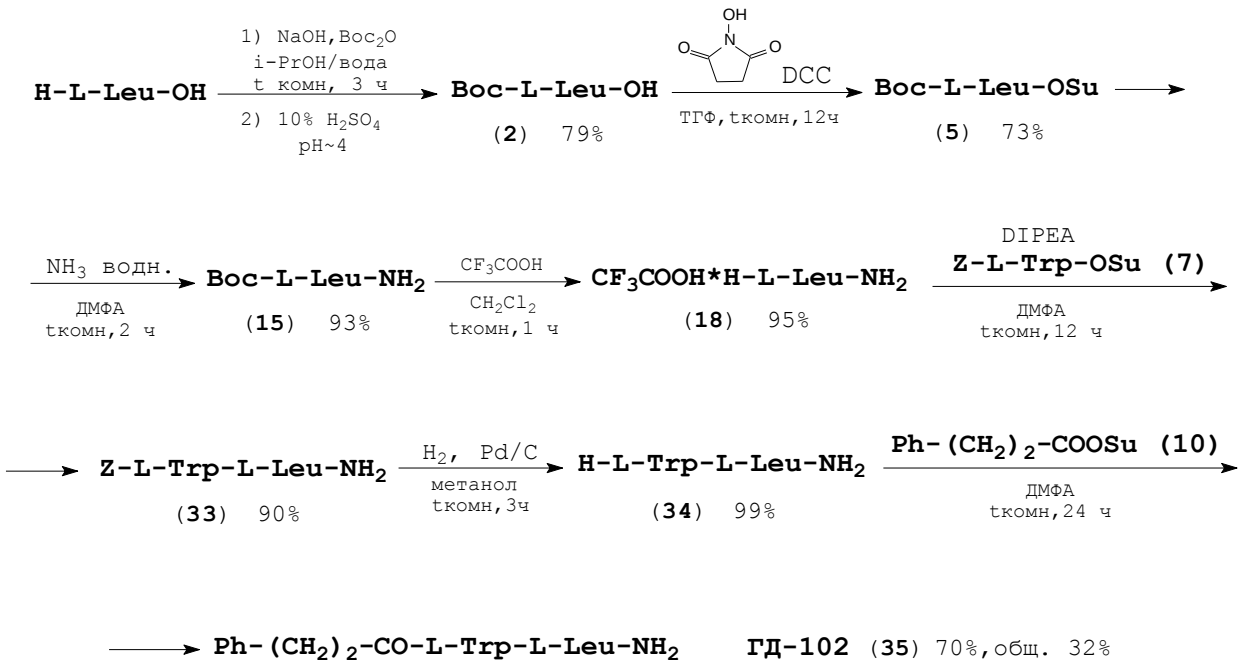


Рисунок 66 - Получение ГД-102 методом активированных сукцинимидных эфиров (Схема 1)

Для проведения синтеза методом активированных пентафторфениловых эфиров (рисунок 67), защищенный лейцин (Boc-L-Leu-OH) вводили в реакцию с пентафторфенолом, в качестве водоотнимающего агента использовали дициклогексилкарбодиимид, реакцию проводили в предварительно перегнанном безводном этилацетате. Продукт получали с выходом 97%. Выход пентафторфенилового эфира выше, чем сукцинимидного эфира. Пентафторфениловый эфир растворяли в небольшом количестве ДМФА и подвергали аммонолизу с использованием разбавленного водного раствора аммиака. Реакция полностью проходила в течение получаса, получаемый амид хорошо кристаллизовался и легко отделялся фильтрованием. Продукт имел вид желтоватого порошка. Однако, кристаллизация продукта происходит хуже, чем в случае аммонолиза сукцинимидного эфира этой же аминокислоты. Продукт имел запах пентафторфенола даже после многократных промывок дистиллированной водой и диэтиловым эфиром. Выход составил 60%, что может быть связано с неустойчивостью пентафторфениловых эфиров в водно-щелочных средах. Boc-защиту удаляли ацидолизом трифторуксусной кислотой как и в случае схемы с использованием сукцинимидных эфиров. Продукт получали с выходом 89% в виде масла. Затем получали пентафторфениловый эфир Z-триптофана. Продукт получали в кристаллическом виде с выходом 96%, который затем вводили в реакцию конденсации с трифторацетатом амида L-лейцина, предварительно нейтрализованным эквимолярным количеством диизопропилэтиламина. Полученный дипептид кристаллизовали из дистиллированной воды. Продукт имел вид желтого порошка. Затем полученный защищенный дипептид подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора - 10%Pd/C по той же методике, как представлено на рисунке 65. Деблокированный

дипептид H-L-Trp-Leu-NH_2 ацилировали пентафторфениловым эфиром фенилпропионовой кислоты. Конечный продукт плохо кристаллизовался в воде, поэтому его очищали последовательной промывкой этилацетатного раствора 5% водным раствором $NaHCO_3$ и 3% водным раствором H_2SO_4, упаривали, кристаллизовали добавлением холодной воды. Дополнительно промывали на фильтре дистиллированной водой и диэтиловым эфиром для удаления примеси пентафторфенола. Продукт содержал примесь мочевины, а также обладал желтым цветом и резким запахом. Попытка перекристаллизовать из системы этилацетат-гексан не привела к улучшению качества продукта. Поэтому дополнительно очищали на колонке с силикагелем в системе хлористый метилен-метанол. После очистки соединение ГД-102 имело вид белого порошка с температурой плавления 178-183^{o}C, углом вращения -24˚ при 24˚C (c=1, ДМФА). По данным ^{1}H ЯМР спектроскопии соединение находится в форме сольвата с метанолом в соотношении 1 молекула ГД-102 и 0.5 молекулы MeOH. Диастереомерная чистота по данным ЯМР не ниже 98%.

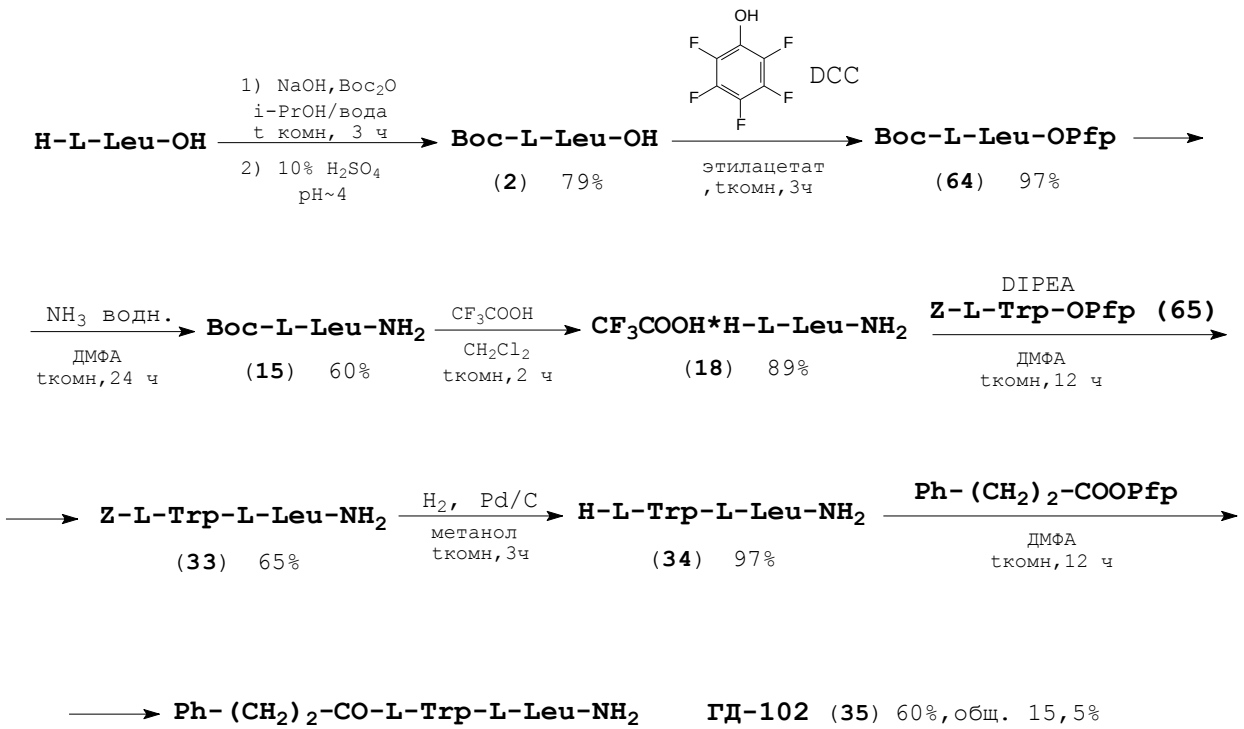


Рисунок 67 - Получение ГД-102 методом активированных пентафторфениловых эфиров (Схема 2)

По сравнению с методом активированных сукцинимидных эфиров (рисунок 66) использование метода пентафторфениловых эфиров (рисунок 67) увеличивает стоимость синтеза ГД-102 в 2.5 раза.

Имидазолид Z-L-триптофана получали в условиях Андерсона (рисунок 68) [318]. Для этого Z-Trp-OH вводили в реакцию с карбонилдиимидазолом, реакцию проводили в течение получаса. Признаком окончания реакции являлось прекращение выделения пузырьков CO_2. Полученный активированный имидазолид триптофана без выделения вводили в реакцию с гидрохлоридом метилового эфира лейцина, который предварительно нейтрализовывали эквимолярным количеством диизопропилэтиламина. Реакцию проводили в предварительно перегнанном над нингидрином ДМФА. Продукт Z-L-Trp-L-Leu-OMe выделяли в виде масла. Полученный метиловый эфир попытались подвергнуть прямому аммонолизу, для чего его растворяли в метаноле, пропускали газообразный аммиак в течение получаса, однако ТСХ контроль показал, что в реакции присутствовал только исходный метиловый эфир. Поэтому для получения целевого амида Z-L-Trp-L-Leu-OMe подвергали щелочному гидролизу, получая соединение со свободной карбоксильной группой Z-L-Trp-L-Leu-OH, которое, в свою очередь, вводили в реакцию с карбонилдиимидазолом и через полчаса обрабатывали водным аммиаком. Получали продукт в виде белого порошка, однако выход реакции был значительно ниже, чем при аммонолизе *N*-оксисукцинимидных или пентафтофениловых эфиров. Возможно, это связано с высокой скоростью распада имидазолидов в водных средах. Полученный защищенный амид дипептида подвергали каталитическому гидрогенолизу в присутствии катализатора - 10% Pd на активированном угле по той же методике, как описано на рисунках 65 и 66. Деблокированный дипептид ацилировали имидазолидом фенилпропионовой кислоты, реакцию проводили в ДМФА, однако выход реакции опять же был невысоким (34%). Возможно, это связано с малой стабильностью имидазолидов фенилалкиловых кислот. Конечный продукт выделяли кристаллизацией добавлением воды, однако он имел вид маслянистого порошка, поэтому для улучшения его физико-химических характеристик дополнительно очищали на колонке с силикагелем в системе хлористый метилен-метанол. После очистки дипептид ГД-102 имел вид белого порошка с температурой плавления 185-190^{o}C, углом вращения -23.6˚ при 24˚C (c=1, ДМФА). По данным ^{1}H ЯМР спектроскопии соединение находится в форме сольвата с метанолом в соотношении 1 молекула ГД-102:0,5 молекулы MeOH. Диастереомерная чистота по данным ЯМР не ниже 98%.

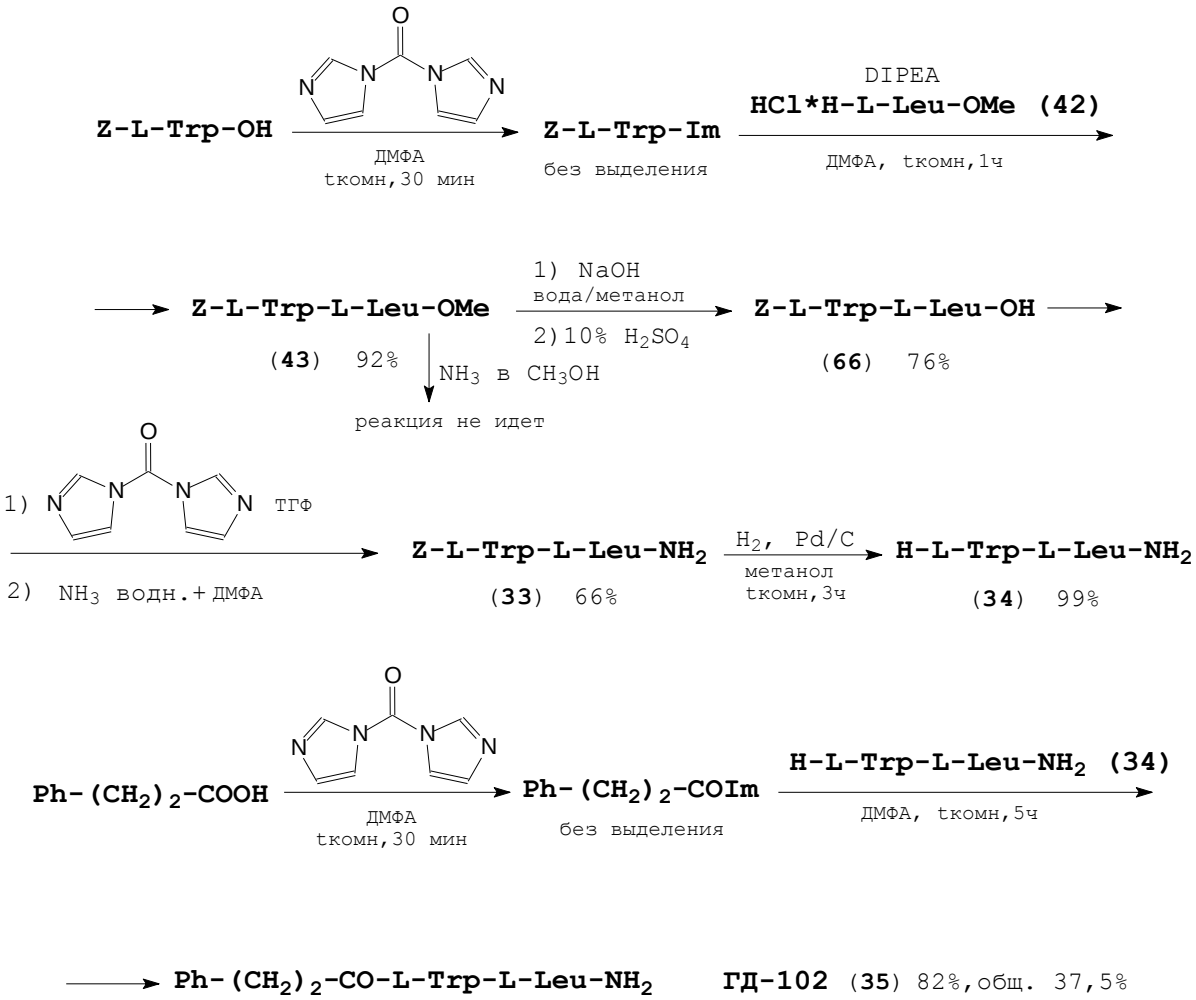


Рисунок 68 - Получение ГД-102 имидазолидным методом (Схема 3)

Невысокие выходы реакций образования пептидной связи приводят к троекратному удорожанию синтеза конечного продукта по сравнению с методом *N*-оксисукцинимидных эфиров.

Для выбора наилучшего способа получения ГД-102 все преимущества и недостатки экспериментальных методов были тщательно проанализированы (таблица 17).

Таблица 17 - Сравнение методов получения дипептидного лиганда TSPO ГД-102

Параметр	**Метод активированных N-оксисукцинимидных эфиров**	**Метод активированных пентафторфенилов ых эфиров**	**Имидазолидный метод**
Метод очистки конечного продукта	1. Кристаллизация под водой. 2. Перекристаллизация из системы этилацетат-гексан	1. Кристаллизация под водой. 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен-метанол	1. Кристаллизация под водой. 2. Колоночная хроматография на силикагеле в системе хлористый метилен-метанол
Диастереомерная чистота	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР	Подтверждена ЯМР
Температура плавления ГД-102	197-198^{o}C	178-183^{o}C	185-190^{o}C
Угол оптического вращения, с 1, ДМФА при 24^{o}C	-27,0^{o}	-24,0^{o}	-23,6^{o}
Выход (на защищенный триптофан)	42%	43%	16%
Стоимость в пересчете на 100 г конечного продукта по ценам каталога Alfa Aesar	909 евро	2323 евро	2 646 евро
Преимущества	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Малая токсичность реагентов. Процессы протекают при комнатной температуре. Относительная дешевизна синтеза по сравнению с другими двумя схемами	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов, возможность выделять промежуточные соединения в кристаллическом виде. Процессы протекают при комнатной температуре.	Простота технологической схемы и используемого оборудования. Доступность исходных реагентов. Реакции протекают в малом промежутке времени. Процессы протекают при комнатной температуре.

	получения		
Недостатки	Реакции протекают в большом промежутке времени.	Возможность образования токсичных примесей. Дополнительная очистка с использованием диэтилового эфира. Высокая стоимость реагентов. Физико-химические константы занижены, что связано с образованием сольватов с метанолом.	Метод требует более тщательной подготовки и очистки растворителей и промежуточных реагентов, так как реакции влагочувствительны. Угол оптического вращения ниже, что связано с образованием сольватов с метанолом. Малые выходы реакций и как следствие высокая стоимость синтеза.

Как видно из таблицы 17 общий выход по схеме 1 составил 42%, по схеме 2 – 43 %, а в схеме 3 – 16% в расчете на коммерчески доступный *Z*-триптофан. Основное влияние на общий выход оказывала стадия образования пептидной связи между триптофаном и лейцином: метод *N*-оксисукцинимидных эфиров давал существенно больший выход по сравнению с методом пентафторфениловых эфиров. Оптическая чистота конечных продуктов синтеза при использовании метода *N*-оксисукцинимидных эфиров была выше. Общий выход по схеме 3 был наименьший, что вероятно связано с низкой стабильностью имидазолидов. Получение по схемам 2 и 3 предполагает дополнительную очистку продукта на колонке, что приводит к образованию сольватов с метанолом, что было подтверждено ПМР спектром - присутствует сигнал метанола при 3.32 м.д. Метод получения ГД-102 по схеме 3 предполагает использование раствора щелочи, что также может привести к уменьшению оптической чистоты продукта и увеличить время синтеза.

Полученные данные позволяют предположить, что оптимальной схемой для синтеза дипептидного лиганда TSPO ГД-102 является схема 1 с использованием метода активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров, преимущества которой больший выход продукта по сравнению со схемой 3. Кроме того, при синтезе ГД-102 по схеме 1 промежуточные вещества и конечный дипептид легко выделялись кристаллизацией и имели более высокие физико-химические показатели по сравнению с таковыми при синтезе по схемам 2 и 3. Используемые исходные реагенты коммерчески доступны, малотоксичны, проводимые реакции не требуют сложного технического оснащения и условий.

Таким образом, поставленные в диссертационной работе задачи выполнены полностью.

Глава 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Материалы и методы

3.1.1 Исходные вещества и вспомогательные реагенты

Аминокислоты: L-изолейцин (Reanal, Венгрия), глицин (Reanal, Венгрия), D-изолейцин (Alfa Aesar, США), D-лейцин (Alfa Aesar, США), L-фенилаланин (Macklin, КНР).

Производные аминокислот: Z-L-триптофан (GL Biochem, КНР), Z-D-триптофан (GL Biochem, КНР), HCl*H-L-Trp-OMe (Alfa Aesar, США), Z-глицин (Reanal, Венгрия), $Ph(CH_2)_2C(O)$-Gly-OH (получен ранее в лаб. пептидных биорегуляторов ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (т. пл. 110-113˚С (Лит. данные 113-114˚С [319]).

Компоненты и реагенты: трифторуксусная кислота (TFA) (Chemical Line, Россия), ди-трет-бутилпирокарбонат (Boc_2O) (Chemical Line, Россия), дициклогексилкарбодиимид (DCC) (Acros Organics, Германия, и Chemical Line, Россия), бензилоксикарбонилсукцинимид (Z-OSu) (Acros Organics, Германия, и Chemical Line, Россия), катализатор 10% Pd/C (Alfa Aesar, США), *N*-гидроксисукцинимид, диизопропилэтиламин (ДИПЭА) (Alfa Aesar, США), *N*,*N*-диметил-1,3-диаминопропан (ДМПДА) (Alfa Aesar, США), и пентафторфенол (Pfp) (Alfa Aesar, США), силикагель (Macherey-Nagel, Германия), водный аммиак (Химмед, Россия)

Растворители производства РФ, поставщик ООО «Химмед»: этилацетат (ЭА), тетрагидрофуран (ТГФ), диэтиловый эфир, изопропиловый спирт (*i*-Pr-OH), метиловый спирт (MeOH), гексан, дихлорметан, хлороформ, диметилформамид (ДМФА).

Очистка растворителей и реагентов:

Используемые растворители очищали стандартными методами [320, 321]. ДМФА очищали путем перегонки в вакууме над нингидрином, хранили в склянках темного стекла над молекулярными ситами 4 Å.

Этилацетат промывали на делительной воронке равным объемом 5% $NaHCO_3$, выдерживали над $CaCl_2$ в течение ночи, фильтровали и перегоняли при атмосферном давлении. Диэтиловый эфир хранили над твердым NaOH. ТГФ хранили над твердым КОН.

Гексан, дихлорметан, хлороформ, метанол, этанол, пропанол-2 (все х.ч.) использовали без дополнительной очистки.

ДИПЭА и ДМПДА перегоняли при атмосферном давлении над КОН. Хранили над КОН в склянках темного стекла.

N-гидроксисукцинимид сушили 12 ч в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином.

3.1.2 Аналитические методы

Хроматография в тонком слое силикагеля. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на алюминиевых пластинах DC Kieselgel 60 G/F_{254} (Merck, Германия) и стеклянных пластинах DC Kieselgel 60 G/F_{254} (Merck, Германия) в системах растворителей: хлороформ-метанол, 9:1 (А), изопропиловый спирт-водный аммиак, 7:3 (Б), бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:1 (В), хлороформ-метанол-уксусная кислота 80:19:1 (Г).

Качественное обнаружение соединений на ТСХ проводили облучением в УФ-свете при длине волны 254 нм с помощью УФ-лампы («Vilber Lourmat», Франция).

ЯМР-спектроскопия. Строение и диастереомерную чистоту целевых пептидов и промежуточных соединений устанавливали методами одномерной ^{1}H- ,^{13}C- и двумерной (COSY – гомоядерная корреляция, HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция, HMBC – гетероядерная многосвязная корреляция) ЯМР-спектроскопии. Спектры ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР регистрировали по шкале δ, м.д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (300 и 75 МГц, соответственно) в растворах DMSO-d_6, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.).

Температуру плавления определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) в открытых капиллярах без корректировки.

Поляриметрия. Удельное оптическое вращение регистрировали на автоматическом поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham+Stanley Ltd., Великобритания) при длине волны линии D спектра натрия (589.3 нм) и длине кюветы 0.5 дм.

Величины удельных оптических вращений рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D = (\alpha \times V)/(l \times a), \text{ где}$$

α – наблюдаемое оптическое вращение в градусах; V – объем раствора в мл; l – толщина слоя в дм; a – навеска вещества в г.

3.2 Синтез

3.2.1 Синтез исходных соединений

3.2.1.1 Синтез *N*-защищенных аминокислот

Общая методика синтеза *N-трет*-бутилоксикарбонил аминокислот [288]

Растворяли 0.1 моль аминокислоты в 350 мл смеси 1 N раствора NaOH, воды и пропанола-2 (соотношение объемов 1:2:4). После полного растворения прибавляли 20 % изб. (по молям) ди-*трет*-бутилпирокарбоната. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, поддерживая pH = 9 - 10 постепенным прикапыванием малых порций (по 3 мл) раствора 1N NaOH. Контроль за ходом реакции вели методом ТСХ в системах А и В. По окончании реакции реакционную массу упаривали в вакууме до одной трети объема. Избыток ди-*трет*-бутилпирокарбоната экстрагировали гексаном (2х100 мл). Водный раствор подкисляли 7 % раствором H_2SO_4 до pH 4. Продукт выпадал в виде белого «творожистого» осадка. Осадку давали выстоять в течение 12 ч при комнатной температуре, затем отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод, сушили на воздухе. В случае водорастворимого продукта, его экстрагировали ЭА (3х100 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, осушитель отфильтровывали, ЭА упаривали.

***N-трет*-бутилоксикарбонил-L-изолейцин, Boc-L-Ile-OH (1).** Получен из 15.00 г (114.5 ммоль) L-изолейцина. Получали 21.71 г (82 %) продукта в виде стеклообразных кристаллов. R_f 0.35 (В); т. пл. 66-69 °С; $[\alpha]_D^{20}$ = -3.6° (с = 1, ДМФА), $[\alpha]_D^{20}$ = +2° (с = 2, CH_3COOH). (Лит. данные: т. пл. 66 °С [322], $[\alpha]_D^{26}$ = +3° (с = 2, CH_3COOH) [323]).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82 (3 Н, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.85 (3 Н, д, $C^{\gamma^{o}}H_3$ Ile), 1.17 и 1.35 (2 Н, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.37 (9 Н, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.72 (1 Н, м, C^{β}H Ile), 3.82 (1 Н, дд, C^{α}H Ile), 6.89 (1 Н, д, NH Ile).

***N-трет*-бутилоксикарбонил-D-изолейцин, Boc-D-Ile-OH (1D).** Получен из 1.50 г (11.43 ммоль) D-изолейцина. Получали 1.79 г (69 %) продукта в виде желтого масла без четкой т.пл. R_f 0.35 (В); $[\alpha]_D^{20}$ = -3.4 (с=2, CH_3COOH). (Лит. данные $[\alpha]_D^{25}$ = -44.2˚ (с = 0.5, $CHCl_3$) [324])

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.80 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.86 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 1.15 и 1.38 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.38 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.71 (1 H, м, C^{β}H Ile), 3.80-3.85 (1 H, д.д., C^{α}H Ile), 6.90-6.93 (1 H, д, NH Ile), 12.34-12.53 (1 H, уш .с. OH).

***N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцин, Boc-L-Leu-OH (2).** Получен из 8.00 г (60.98 ммоль) L-лейцина. Получали 11.14 г (79 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.35 (B); т. пл. 86-87 °C; $[\alpha]_D^{20}$ = -23° (с = 1, CH_3COOH). (Лит. данные: т. пл. 83 °C; $[\alpha]_D^{20}$ = - 24° (с = 1, CH_3COOH)) [288]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6 +CF_3COOD.) δ, м.д.: 0.82-0.85 (6 H, два дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.22 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 1.36 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.86-3.88 (1 H, дд, C^{α}H Leu), 6.72 (1 H, д, *J* = 7.9 Гц, NH Leu), 11.53-13.29 (1 H, уш. с, OH).

***N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцин, Boc-D-Leu-OH (2D).** Получен из 7.00 г (53.3 ммоль) D-лейцина. Получали 11.09 г (90 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.35 (B); т. пл. 83 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = +30.6° (с = 1, CH_3COOH).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6 CF_3COOD.) δ, м.д.: 0.82-0.86 (6 H, 2 д д, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu),1.08-1.16 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 1.41 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.49 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.86-3.89 (1 H, д.д., C^{α}H Leu), 7.2-7.5 (1 H, д, *J* = 7.9 Гц, NH Leu), 11.72-13.19 (1 H, уш. с., OH).

***N-трет*-бутилоксикарбонилглицин, Boc-Gly-OH (3)**. Получен из 10.00 г (133 ммоль) глицина. Получали 20.31 г (88 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.42 (A); т. пл. 87-89 °C. (Лит. данные: т. пл. 86-89 °C [325]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6), δ, м.д.: 1.37 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 3.57 (2 H, д, *J* = 6.15 Гц, $C^{\alpha}H_2$ Gly), 7.04 (1 H, т, *J* = 6.00 Гц, NH Gly), 12.42 (1 H, с, COOH).

3.2.1.2 Синтез *N*-оксисукцинимидных эфиров *N*-защищенных аминокислот

Общая методика синтеза активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров кислот [287]

К раствору 0.01 моль кислоты в 150-200 мл ЭА или ТГФ при перемешивании добавляли 15 % изб. (по молям) *N*-гидроксисукцинимида, затем 15 % изб. (по молям) дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК), охлаждали до +5°С на водно-ледяной бане. Смесь перемешивали 30 мин при +5°С, а затем 5-8 ч при комнатной температуре. Реакцию контролировали с помощью ТСХ в системе А. Выпавший осадок дициклогексилмочевины (ДЦГМ) отфильтровывали. Если использовался ТГФ, то растворитель упаривали, разбавляли 150-200 мл ЭА. Раствор в ЭА экстрагировали 150 мл 5 % раствора $NaHCO_3$, затем 100 мл

дистиллированной воды, органический слой отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение получаса, фильтровали, растворитель упаривали. Остаток растирали с гексаном, гексан декантировали, заново упаривали, сушили в вакуумированном эксикаторе над Na_2SO_4, и парафином. При необходимости перекристаллизовывали из диэтилового эфира или пропанола-2. Чистый продукт хранили в морозильной камере при -20 °C.

***N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-изолейцина, Boc-L-Ile-OSu (4)**. Получен из 5 г (21.6 ммоль) Boc-L-Ile-OH (1) в ТГФ. Светло-желтый порошок, выход 75 %. R_f 0.87 (A); т. Пл. 91-93 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = -10.5° (c = 1, ДМФА). (Лит. Данные: т.пл. 92-93 ˚C, $[\alpha]_D^{26}$ = -26.5° (c = 2, диоксан) [287].

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.86 (3 H, т, *J* = 7.4 Гц, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.95 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 1.29 и 1.47 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.38 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.86 (1 H, м, C^{β}H Ile), 2.79 (4 H, м, OSu), 4.23 (1 H, дд, C^{α}H Ile), 7.57 (1 H, д, NH Ile).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-D-изолейцина, Boc-D-Ile-OSu (4D).** Получен из 1.72 г (7.44 ммоль) Boc-D-Ile-OH (1D) в ТГФ. Желтоватое масло. R_f 0.91 (A); $[\alpha]_D^{26}$ = +10.7° (c=1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.86 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile,), 0.97 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile,), 1.27 и 1.52 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile,), 1.40 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.87 (1 H, м, C^{β}H Ile), 2.80 (4 H, м, O<u>Su</u>), 4.24 (1 H, м, C^{α}H Ile), 7.57 (1 H, д, *J* = 8.4 Гц, NH Ile).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцина, Boc-L-Leu-OSu (5).** Получали из 7.00 г (30.3 ммоль) Boc-L-Leu-OH (2) в ТГФ, перекристаллизован из диэтилового эфира. Белый порошок, выход 73 %. R_f 0.81 (A); т. пл. 110-112 °C; $[\alpha]_D^{24}$ = -36° (c = 1, ДМФА) и $[\alpha]_D^{26}$ = -40˚ (c = 2, диоксан). (Лит. данные: т. пл. 111 ˚C [326] и $[\alpha]_D^{26}$ = -41.8° (c = 2, диоксан) [287]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, два дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.39 (9 H, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 1.45 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 2.82 (4 H, м, OSu), 3.86-3.88 (1 H, м, C^{α}H Leu), 7.93 (1 H, д, NH Leu).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонил-D-лейцина, Boc-D-Leu-OSu (5D)**. Получали из 7.00 г (30.3 ммоль) Boc-D-Leu-OH (2D) в ТГФ. Белое воскообразное вещество без четкой т.пл., выход 98 %. R_f 0.81 (A); $[\alpha]_D^{21}$ = +39° (c = 2, диоксан) и $[\alpha]_D^{21}$ = +26° (c=1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.78-0.85 (6 H, 2 дд, 2 C$^{\delta}$H$_3$ Leu), 1.39 (9 H, с, -OC(CH$_3$)$_3$ Boc), 1.49 (2 H, т, C$^{\beta}$H Leu), 1.59-1.76 (1 H, м, C$^{\gamma}$H Leu), 2.82 (4 H, м, OSu), 3.86-3.88 (1 H, м., C$^{\alpha}$H Leu), 7.94 (1 H, д, NH Leu).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N-трет*-бутилоксикарбонилглицина, Boc-Gly-OSu (6)**. Получен из 3.00 г (17.1 ммоль) Boc-Gly-OH (3) в ЭА. Белый порошок, выход 78 %. R_f 0.81 (А); т. пл. 165-167 °С). (Лит данные: 168-170 ˚С [287]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 1.39 (9 H, с, -OC(CH$_3$)$_3$ Boc), 2.82 (4 H, м, OSu), 3.56 и 3.59 (2 H, дд, CH$_2$ Gly), 7.48 (1 H, т, NH Gly).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофана, Z-L-Trp-OSu (7).** Получен из 10.00 г (29.5 ммоль) Z-L-Trp-OH в ЭА. Белая пена без четкой т.пл., выход 96 %. R_f 0.86 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -60° (с = 1, ДМФА). (Лит. данные: т.пл. 64 ˚С [327]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.78 (4 H, м, OSu), 3.01 и 3.25 (2 H, два дд, C$^{\beta}$H$_2$ Trp), 3.98 (1 H, м, C$^{\alpha}$H Trp), 4.97 (2 H, с, -OC$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 6.73-7.62 (10 H, м, -OCH$_2$C$_6\underline{H}_5$, индол), 8.56 (1 H, д, *J* = 8.8 Гц, NH Trp), 10.78 (1 H, с, NH индол).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-D-триптофана Z-D-Trp-OSu (7D).** Получен из 2.00 г (4.77 ммоль) Z-D-Trp-OH в ЭА. Белая пена, выход 99 %. R_f 0.87 (А); $[\alpha]_D^{25}$ = +44.3° (с=1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.80 (4 H, м, OSu,), 3.07 - 3.25 (2 H, м, C$^{\beta}$H$_2$ Trp,), 4.00 (1 H, м, C$^{\alpha}$H Trp), 4.95 (2 H, с, -OC$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 6.94-7.77 (10 H, м, -OCH$_2$C$_6\underline{H}_5$, индол), 8.56 (1 H, д, *J* = 8.8 Гц, NH Trp), 10.80 (1 H, с, NH индол).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-глицина Z-Gly-OSu (8).** Получен из 3.00 г (14.3 ммоль) Z-Gly-OH в ЭА. Стеклообразное желтоватое вещество без четкой т.пл., выход 75 %. R_f 0.71 (А). (Лит. данные: т.пл. 113-114 ˚С, перекрист. из системы хлористый метилен-петролейный эфир [287]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.84 (4 H, м, OSu), 3.64 и 3.67 (2 H, дд, CH$_2$ Gly), 5.03 (2 H, с, -OC$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 7.27-7.43 (5 H, м, -OCH$_2$C$_6\underline{H}_5$), 7.47 (1 H, т, NH Gly).

***N*-оксисукцинимидный эфир фенилуксусной кислоты, PhCH$_2$-C(O)-OSu (9).** Получен из 5.9 г (43.5 ммоль) PhCH$_2$-C(O)-OH в ТГФ. Белый порошок, выход 90 %. R_f 0.89 (А); т. пл. 111-112 °С. (Лит. т.пл. 113-117 ˚С [328]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.81 (4 H, м, OSu), 4.10 (2 H, с, -C$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 7.20-7.42 (5 H, м, -CH$_2$C$_6\underline{H}_5$).

***N*-оксисукцинимидный эфир фенилпропионовой кислоты, Ph(CH$_2$)$_2$-C(O)-OSu (10).** Получен из 4.00 г (26.6 ммоль) Ph(CH$_2$)$_2$-C(O)-OH в ТГФ. Белое воскообразное вещество, выход 97 %. R_f 0.90 (A); т. пл. 113-114 °C. (Лит. т.пл. 111-113 ˚C [329]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.81 (4 H, м, OSu), 2.97-3.01 (2 H, м, -C$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 3.34 (2 H, с, CH$_2$CO) 7.16-7.31 (5 H, м, -CH$_2$C$_6\underline{H}_5$).

***N*-оксисукцинимидный эфир фенилгексановой кислоты (Ph(CH$_2$)$_5$-C(O)-OSu) (11).** Получен из 5.00 г (26 ммоль) 6-фенилгексановой кислоты в ТГФ, перекристаллизован из пропанола-2. Белый порошок, выход 5.87 г (76 %). R_f 0.79 (A); т. пл. 53 °C.

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 1.25–1.45 (4 H, м, C$^{\gamma}$H$_2$ и C$^{\delta}$H$_2$ цепи), 1.58–1.66 (2 H, м, C$^{\beta}$H$_2$ цепи), 2.30–2.35(2 H, м, C$^{\alpha}$H$_2$ цепи), 2.63-2.72 (2 H, т, J=7.5 C$^{\varepsilon}\underline{H}_2$-Ar), 2.80-2.82 (4 H, м, O$\underline{Su}$), 7.11-7.32 (5 H, м, Ar).

***N*-оксисукцинимидный эфир капроновой кислоты, CH$_3$(CH$_2$)$_4$-C(O)-OSu (12).** Получен из 7.00 г капроновой кислоты (перекристаллизован из диэтилового эфира). Белое воскообразное вещество, выход 6.27 г (49 %), без четкой температуры плавления. R_f 0.80 (A). (Лит. т.пл. 55-57 ˚C [330]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6) δ, м.д.: 0.86-0.90 (3 H, т, *J* = 7.0 Гц, терминальный CH$_3$), 1.28–1.40 (4 H, м, C$^{\gamma}$H$_2$ и C$^{\delta}$H$_2$цепи), 1.59–1.63 (2 H, м, C$^{\beta}$H$_2$), 2.30-2.33 (2 H, т, J = 7.3, C$^{\alpha}$H$_2$), 2.82-2.88 (4 H, м, OSu).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N*-фенилпропионилглицина, Ph(CH$_2$)$_2$C(O)-Gly-OSu (13).** К раствору 2.00 г (9.65 ммоль) Ph(CH$_2$)$_2$C(O)-Gly-OH в 50 мл ТГФ добавляли 1.33 г (11.58 ммоль, 20 % избыток) *N*-гидроксисукцинимида, затем прибавляли 2.38 г (11.58 ммоль, 20 % избыток) ДЦГК. Реакцию вели 12 ч при комнатной температуре. Осадок ДЦГМ отфильтровывали, промывали небольшим количеством ТГФ, растворитель упаривали на роторном испарителе. Получали легко-кристаллизующееся масло, которое растворяли в 200 мл ЭА. Промывали 5 % водного раствора NaHCO$_3$ (2x100мл), затем однократно дистиллированной водой. Органическую фазу сушили над безводным Na$_2$SO$_4$ в течение получаса. Осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством ЭА, упаривали. Получали продукт в количестве 2.55 г (83 %) в виде белых стеклообразных кристаллов без четкой температуры плавления R_f 0.82 (A).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.37 (2 H, т, *J*=7.4 Гц, $\underline{CH_2}C(O)$), 2.69 (2 H, т, *J*=7.5 Гц, $\underline{CH_2}C_6H_5$), 3.56 (2 H, м, CH_2 Gly), 2.80, (4 H, м, OSu), 7.20–7.35 (5 H, м, Ar), 8.00 (1 H, д, NH Gly).

3.2.1.4 Синтез амидов аминокислот

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-изолейцина, Boc-L-Ile-NH_2 (14). К раствору 3.00 г (9 ммоль) Boc-L-Ile-OSu (4) в 5 мл ДМФА при перемешивании приливали 25 мл разбавленного в 2 раза водой раствора аммиака (10-12 %), сразу выпадал белый творожистый осадок. Полученную суспензию перемешивали 30 мин, затем упаривали до половины объема, приливали 50 мл охлажденной дистиллированной воды, оставляли без перемешивания при комнатной температуре. Через 2 ч хорошо сформировавшийся осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили на воздухе. Получали 1.94 г (93 %) Boc-L-Ile-NH_2 в виде белого порошка с т. пл. 167-169 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -3.9° (c = 1, C_2H_5OH). (Лит. данные: т.пл. 153 ˚C, $[\alpha]_D^{31}$ = -7° (c = 1, $CHCl_3$) [331].

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.81 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.82 (3 H, д, $C^{\gamma^{\circ}}H_3$ Ile), 1.06 и 1.36(2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.36 (9 H, с, $-OC(CH_3)_3$), 1.61 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 3.74 (1 H, д.д., $C^{\alpha}H$ Ile), 6.53 (1 H, д, NH Ile), 6.97 и 7.25 (2 H, два с., NH_2 амид).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-D-изолейцина, Boc-D-Ile-NH_2 (14D). Синтез проводили аналогично (14) из 3.05 г (9 ммоль) Boc-D-Ile-OSu (4D). Получали 1.45 г (75 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 164-165 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = +7.7° (c = 1, C_2H_5OH).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.78 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.82 (3 H, д, $C^{\gamma^{\circ}}H_3$ Ile), 1.06 и 1.37 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.36 (9 H, с, $-OC(CH_3)_3$), 1.63 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 3.71-3.76 (1 H, д.д., $C^{\alpha}H$ Ile), 6.53-6.56 (1 H, д, NH Ile), 6.98 и 7.25 (2 H, 2с., NH_2 амид).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцина, Boc-L-Leu-NH_2 (15). К раствору 5.13 г (16.5 ммоль) Boc-L-Leu-OSu (5) в 10 мл ДМФА при перемешивании приливали 20 мл водного раствора аммиака, получая белый творожистый осадок, приливали еще 100 мл охлажденной дистиллированной воды для лучшего перемешивания. Через 2 ч сформировавшийся осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили на воздухе. Получали 3.52 г (93 %) Boc-L-Leu-NH_2 в виде белого порошка с т. пл. 148-149 °C; $[\alpha]_D^{20}$ = -11° (c = 1, ДМФА) и $[\alpha]_D^{16}$ = -8.7° (c = 1, C_2H_5OH) (Лит. данные: т.пл. 150-152 ˚C, $[\alpha]_D^{24}$ -11.9˚ (c = 1, MeOH) [332]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.85 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.36 (9 H, с, -OC(CH_3)$_3$ Boc), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.86-3.88 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.72 (1 H, д, NH Leu), 6.89 и 7.19 (2 H, два с, NH_2 амид).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-D-лейцина, Boc-D-Leu-NH_2 (15D). Синтез проводили аналогично (15) из 8.00 г (24.36 ммоль) Boc-D-Leu-OSu (5D). Получали 3.37 г (60 %) Boc-L-Leu-NH_2 в виде белого порошка с т. пл. 148-149 °C; $[\alpha]_D^{17}$ = +11.2° (с = 1, ДМФА) и $[\alpha]_D^{17}$ = +5.6° (с = 1, C_2H_5OH). (Лит. данные: т.пл.147-149 ˚C [333]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.85 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu),1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.36 (9 H, с, -OC(CH_3)$_3$ Boc), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.86-3.88 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.72 (1 H, д, NH Leu), 6.89 и 7.19 (2 H, два с, NH_2 амид).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонилглицина, Boc-Gly-NH_2 (16). К раствору 6.00 г (21.0 ммоль) Boc-Gly-OSu (6) в 10 мл ДМФА добавляли 40 мл разбавленного в 2 раза водного раствора аммиака. Полученный раствор перемешивали 30 мин, затем упаривали досуха. Полученный продукт затирали под диэтиловым эфиром, эфир декантировали, эту процедуру повторяли трижды, остаток сушили на воздухе. Получали продукт в виде стеклообразного твердого вещества массой 3.32 г (91 %) с т.пл. 80 °C. (Лит. данные: т.пл. 85-87 ˚C [334]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 1.39 (9 H, с, -OC(CH_3)$_3$ Boc), 3.54 - 3.59 (2 H, дд, CH_2 Gly), 7.10 (2 H, два с, NH_2), 7.48 – 7.50 (1 H, т, NH Gly).

Трифторацетат амида L-изолейцина, TFA*H-L-Ile-NH_2 (17). К суспензии 1.30 г (4.9 ммоль) Boc-L-Ile-NH_2 (14) в 7 мл дихлорметана приливали 3 мл (300 % изб.) трифторуксусной кислоты (ТФУ) и перемешивали до прекращения выделения газа. Раствор упаривали с диэтиловым эфиром (3х10 мл). Полученное белое масло затирали под диэтиловым эфиром до кристаллизации. Продукту давали сформироваться в течение 12 ч на воздухе при комнатной температуре, отфильтровывали, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$. Получали 1.17 г (99 %) TFA*H-Ile-NH_2 в виде белого порошка с т. пл. 135-137 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = +41.5° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.91 (3 H, д, $C^{\gamma^{\circ}}H_3$ Ile), 1.13 и 1.45 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.80-1.83 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 3.56 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 7.55 и 7.82 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.08 (3 H, уш. с, $N^{+}H_3$ Ile).

Трифторацетат амида D-изолейцина, TFA*H-D-Ile-NH_2 (17D). Получали аналогично 17 из 1.10 г (4.77 ммоль) Boc-D-Ile-NH_2 (14D) Выход 1.13 г (92 %), белый порошок с т.пл. 134-135˚C, $[\alpha]_D^{21}$ = -34.3˚, (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д: 0.86 (3 H, м, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.93 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 1.14 и 1.46 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.78-1.81 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 3.54 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 7.59 и 7.80 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.03 (3 H, уш. с, $N^{+}H_3$ Ile).

Трифторацетат амида L-лейцина, TFA*H-L-Leu-NH_2 (18). К суспензии 2.53 г (11 ммоль) Boc-L-Leu-NH_2 (15) в 20 мл дихлорметана приливали 12.5 мл (150 % изб.) ТФУ, перемешивали 1 ч. Раствор упаривали до получения масла, затем переупаривали трижды с 20 мл диэтилового эфира, получая белый порошок. Продукту давали хорошо сформироваться в течение 12 ч под слоем диэтилового эфира при +5°C, отфильтровывали, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$. Получали 2.75 г (95 %) TFA*H-L-Leu-NH_2 в виде белого порошка с т. пл. 118-119 °C; $[\alpha]_D^{18}$ = -21.7° (с = 1, ДМФА). (Лит. данные: т.пл. 118-120 ˚C [335]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.89 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.36 (9 H, с, -OC(CH_3)$_3$ Boc), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.69 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 7.52 и 7.93 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.12 (3 H, уш. с, $N^{+}H_3$ Leu).

Трифторацетат амида D-лейцина, TFA*H-D-Leu-NH_2 (18D) К суспензии 5.12 г (22.3 ммоль) Boc-D-Leu-NH_2 (17D) в 20 мл дихлорметана приливали 26 мл (330 ммоль, 150 % избыток) ТФУ, перемешивали 2 ч. Раствор упаривали с диэтиловым эфиром (3х50 мл). Полученное белое масло затирали под диэтиловым эфиром, получали белый порошок, эфир декантировали, остаток фильтровали. Продукт сушили на воздухе. Получали 5.37 г (98 %) TFA*H-D-Leu-NH_2 в виде желтоватого стеклообразного вещества без четкой температуры плавления, $[\alpha]_D^{18}$ = +16.5° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д: 0.83-0.88(6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.69 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 7.52 и 7.93 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.12 (3 H, уш. с, $N^{+}H_3$ Leu).

Трифторацетат амида глицина, TFA*H-Gly-NH_2 (19). 3.65 г (21.0 ммоль) Boc-Gly-NH_2 (16) растворили в 10 мл дихлорметана и 25.14 г (221 ммоль, 1000 % избыток) ТФУ, перемешивали 2 ч. Затем растворители упаривали, полученное масло переупаривали трижды с диэтиловым эфиром для удаления избытка ТФУ. Получали продукт в виде желтого масла, выход составил 4.13 г (98 %).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 3.50 (2 H, м, CH_2 Gly), 7.10 и 7.21 (2 H, два с, NH_2), 8.05 (3 H, уш. с, N^+H_3 Gly).

3.2.2 Синтез потенциальных дипептидных лигандов TSPO

3.2.2.1 Синтез амида *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина, Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (20, ГД-23)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина, Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (20, ГД-23). Растворили 1.00 г (4 ммоль) TFA*H-L-Ile-NH_2 (17) в 20 мл ДМФА с добавлением 0.8 мл (4 ммоль) ДИПЭА. Перемешивали полученный раствор в течение 30 мин. Затем к этому раствору прибавляли раствор 1.96 г (4.4 ммоль 10 % избыток) Z-L-Trp-OSu (7) в 20 мл ДМФА. Перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А), растворитель упаривали, полученное масло растворяли в 100 мл ЭА, промывали 5 % раствором H_2SO_4 (2x100 мл), 5 % раствором $NaHCO_3$ (2x100 мл), дистиллированной водой (100 мл), органическую фазу отделяли, сушили над Na_2SO_4, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали до состояния подвижного масла. Остаток разбавляли 100 мл дистиллированной воды, получая белый осадок, который выдерживали в холодильнике 12 ч. После чего отфильтровывали, промывали водой, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 0.73 г (80 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 214-216°C; R_f 0.58(A); $[\alpha]_D^{27}$ = -23° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.80 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.83 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 1.07 и 1.44 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.72 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.92 и 3.11 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.17 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.34 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 и 4.98 (2 H, 2 д, -OC$\underline{H}_2$C$_6$H$_5$), 6.95-7.28 (10 H, м, -OCH$_2$C$_6\underline{H}_5$, индол), 7.46 (1 H, д, NH Trp), 7.77 (1 H, д, NH Ile), 7.41 и 7.13 (2 H, два с, NH_2 амид), 10.80 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.68, 15.87, 24.71, 28,07, 37.41, 56.15, 57.12, 65.73, 110.69, 111.77, 118.69, 118.99, 121.31, 124.19, 127.84, 128.11, 128.76, 136.57, 137.46, 156.30, 171.99, 173.35. $C_{25}H_{30}N_4O_4$.

3.2.2.2 Синтез амида *N*-бензилоксикарбонил-D-триптофанил-L-изолейцина, Z-D-Trp-L-Ile-NH_2 (21, ГД-25)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-D-триптофанил-L-изолейцина, Z-D-Trp-L-Ile-NH_2 (21, ГД-25) Был получен аналогично Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23), с использованием 0.98 г (2.2 ммоль) Z-D-Trp-OSu (7D) и 0.50 г (2.0 ммоль) TFA*L-Ile-NH_2 (17). Выход составил 0,80 г (90 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 195-198 ^oC; R_f 0.58 (A); $[\alpha]_D^{27}$ = +29° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.80 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.83 (3 H, д, $C^{\gamma^o}H_3$ Ile), 1.07 и 1.44 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.72 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.92 и 3.11 (2 H, два д.д., $C^{\beta}H$ Trp), 4.17 (1 H, д.д., $C^{\alpha}H$ Ile), 4.34 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 и 4.98 (2 H, 2 д, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.95-7.28 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.46 (1 H, д, NH Trp), 7.77 (1 H, д, NH Ile), 7.41 и 7.13 (2 H, два с., NH_2 амид), 10.80 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.61, 15.86, 24.59, 28.41, 37.01, 56.23, 57.08, 65.78, 110.49, 111.72, 118.66, 119.05, 121.29, 124.38, 127.74, 127.98, 128.16, 128.77, 136.57, 137.42, 156.37, 172.25, 173.44.

3.2.2.3 Синтез амида *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-D-изолейцина, Z-L-Trp-D-Ile-NH_2 (22, ГД-69).

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-D-изолейцина,

Z-D-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-69) Был получен аналогично Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23), с использованием 1.03 г (2.54 ммоль) Z-L-Trp-OSu (7) и 0.53 г (2.31 ммоль) TFA*D-Ile-NH_2. (17D). Выход составил 0,75 г (72 %) продукта с т. пл. 182-183 ^oC, R_f 0.53 (A) $[\alpha]^D_{27}$ = -25.2^o (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.:0.78 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.83 (3 H, д, $C^{\gamma^o}H_3$ Ile), 1.02 и 1.37 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.69 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.83 и 3.04 (2 H, два д.д., $C^{\beta}H$ Trp), 4.13 (1 H, д.д., $C^{\alpha}H$ Ile), 4.40 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 (2 H, м, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.96-7.30 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.48 (1 H, д, NH Trp), 7.88 (1 H, д, NH Ile), 7.45 и 7.16 (2 H, два с., NH_2 амид), 10.79 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.67, 15.90, 24.64, 28.47, 37.04, 56.26, 57.13, 65.83, 110.52, 111.76, 118.71, 119.10, 121.33, 124.43, 127.79, 128.02, 128.20, 128.80, 136.62, 137.44, 156.42, 162.80, 172.32, 173.51. $C_{25}H_{30}N_4O_4$.

3.2.2.4 Синтез амида *N*-фенилацетил-L-триптофанил-L-изолейцина, $PhCH_2C(O)$-L-Trp-L-Ile-NH_2 (24, ГД-36)

Амид L-триптофанил-L-изолейцина, H-L-Trp-L-Ile-NH_2 (23). В колбу, содержащую суспензию 0.10 г 10 % Pd/C в 20 мл метанола и 1 мл воды помещали 1.00 г (2.2 ммоль) Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (20). Полученную суспензию дегазировали на водоструйном насосе при перемешивании, после чего в колбу запускали газообразный водород из газометра. Данную процедуру повторяли трижды. Затем реакционную массу интенсивно перемешивали в течение 3 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) катализатор отфильтровывали, промывали метанолом и ДМФА. Фильтрат упаривали, получали 0.70 г (85 %) продукта в виде желтоватого масла. R_f 0.45 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -15° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.78 (3 Н, т, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 0.80 (3 Н, д, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.95 и 1.34 (2 Н, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.64 (1 Н, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.75 и 3.11 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.50 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 6.94-7.55 (5 Н, м, индол), 7.05 и 7.41 (2 Н, два д, NH_2 амид), 7.95 (1 Н, д, NH Ile), 10.85 (2 Н, уш с, NH_2 Trp).

Амид *N*-фенилацетил-L-триптофанил-L-изолейцина, $PhCH_2C(O)$-LTrp-L-Ile-NH_2 (24, ГД-36). К 0.12 г (0.38 ммоль) H-Trp-L-Ile-NH_2 (21) в 10 мл ДМФА прибавляли 0.10 г (0.44 ммоль, 20 % изб.) $Ph(CH_2)$-C(O)-OSu (9). Раствор перемешивали 12 ч (ТСХ контроль в системе А). Избыточное количество *N*-оксисукцинимидного эфира гасили добавлением 0.5 мл *N,N*-диметил-1,3-диаминопропана (ДМПДА), после чего перемешивали еще 30 мин. Затем реакционную массу сильно разбавляли дистиллированной водой до выпадения белого осадка, которому давали выстоять в холодильнике 12 ч. Полученный осадок отфильтровывали, промывали на фильтре растворами 15 мл 3 % H_2SO_4, 15 мл 5 % $NaHCO_3$ и дистиллированной водой до нейтрального pH. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 0.17 г (98 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.74 (А); т. пл. 226-230 °С; $[\alpha]_D^{27}$ = -16.2° (с = 0.5, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.78 (3 Н, т, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 0.81 (3 Н, д, $C^{\delta}H_3$ Ile), 1.03 и 1.39 (2 Н, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.70 (1 Н, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.95 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H$ Trp), 3.39 (2 Н, с, -$C\underline{H}_2C_6H_5$), 4.15 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.62 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.97-7.38 (10 Н, м, -$CH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.07 и 7.58 (2 Н, 2 д, NH_2 амид), 7.77 (1 Н, д, NH Ile), 8.28 (1 Н, д, NH Trp), 10.81 (1 Н, с, NH индол).

3.2.2.5 Синтез амида *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-изолейцина, $Ph(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-L-Ile-NH_2 (25, ГД-57)

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-изолейцина, $Ph(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-L-Ile-NH_2 (25, ГД-57). 0.32 г (1.0 ммоль) H-L-Trp-L-Ile-NH_2 (23) растворяли в 10 мл ДМФА, затем добавляли 0.29 г (1.1 ммоль) $Ph(CH_2)_2$-C(O)Su (10) и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали до состояния подвижного масла. Остаток разбавляли 100 мл дистиллированной воды, получая «молочный» осадок, который выдерживали в холодильнике 12 ч. После чего хорошо сформированный осадок отфильтровывали через стеклянный фильтр, промывали 50 мл воды и 50 мл гексана, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 0.37 г (83 %) продукта в виде белого порошка с R_f 0.60 (A); т. пл. 212-220 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -15° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82 (3H, т, *J* = 7.5 Hz, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.84 (3H, д, *J* = 6.9 Hz, $C^{\gamma^o}H_3$ Ile), 1.03 и 1.18 (2H , 2 м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 0.69 (1H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.37 (2H, т, *J* =15.6 Hz, CH_2CO), 2.69(2H, т, *J* = 15.3 Hz, $\underline{CH_2}C_6H_5$), 2.90 и 3.10 (2H, 2 дд, *J* = 14.7 Hz, *J* = 4.6 Hz, *J* = 14.7 Hz, *J* = 4.8 Hz, $C^{\beta}H$ Trp), 4.15 (1H, дд, *J* = 7.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.62 (1H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.93-7.57 (10H, м, C_6H_5, Ar), 7.74 (1H, d, *J* =8.9 Hz, NH Ile), 8.11 (1H, д, *J* = 8.1 Hz, NH Trp) 7.18 и 7.36 (2H, 2 с, NH_2 амид), 10.79 (1H, с, NH индол, 1H).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.71, 15.90, 24.93, 27.85, 30.84, 33.82, 37.35, 53.84, 57.20, 110.70, 111.71, 118.65, 121.27, 123.97, 126.26, 127.85, 128.54, 128.68, 128.76, 136.53, 141.68, 154.02, 157.15, 171.91, 173.34.

3.2.2.6 Синтез амида *N*-фенилгексаноил-L-триптофанил-L-изолейцина, $Ph(CH_2)_5$-C(O)-L-Trp-L-Ile-NH_2 (26, ГД-28)

Амид *N*-фенилгексаноил-L-триптофанил-L-изолейцина, $Ph(CH_2)_5$-C(O)-L-Trp-L-Ile-NH_2 (26). Растворяли 0.30 г (0.94 ммоль) H-L-Trp-L-Ile-NH_2 (21) в 7 мл ДМФА, при перемешивании добавляли 0.28 г (0.95 ммоль) $Ph(CH_2)_5$C(O)Su (11). Перемешивали 5 ч, затем упарили. Полученное масло разбавляли 50 мл ЭА, промывали 50 мл 5 % раствора $NaHCO_3$, затем дистиллированной водой (2x50 мл). Отделяли органическую фракцию, высушивали над $MgSO_4$, упаривали. Получали 0,28 г (60 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0. 53(A); т. пл. 202-204 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -30° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.81 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.84 (3 H, д, $C^{\gamma^o}H_3$ Ile), 1.06 и 1.13 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.15 (2 H, т, CH_2 цепи), 1.43 (4 H, м, CH_2CH_2 цепи), 1.72 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.02 (2 H, т, CH_2 цепи), 2.95 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.15 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.59 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.96-7.60 (10 H, м, Ar, индол), 7.70 (1 H, д, NH Ile), 8.07 (1 H, д, NH Trp) 7.16 и 7.39 (2 H, два с, NH_2 амид), 10.80 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.69, 15.89, 24.65, 25.53, 27.68, 28.65, 31.24, 35.46, 35.67, 37.39, 53.82, 57.16, 110.80, 111.70, 118.60, 118.90, 121.23, 123.89, 127.84, 128.64, 128.67, 136.54, 142.76.

3.2.2.7 Синтез метиламида бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина, Z-L-Trp-L-Ile-NHCH$_3$ (30)

Гидрохлорид метилового эфир L-изолейцина, HCl*H-L-Ile-OMe (27). В трехгорлую колбу, снабженную термометром, воздушным холодильником и капельной воронкой помещали 5.00 г (38 ммоль) L-изолейцина. Приливали 54 мл (133 ммоль) безводного метанола (высушен над ситами с размером пор 3 Å). Суспензию охлаждали до -20 °C. При перемешивании по каплям прибавляли 5.75 мл (80 ммоль) хлористого тионила, поддерживая температуру реакционной смеси -20 °C. После прекращения прикапывания реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и оставляли на 24 ч при перемешивании. Затем упаривали, получая стеклообразную массу с резким запахом, которую высушивали в вакуумированном эксикаторе над KOH и парафином. Получали стеклообразные кристаллы гидрохлорида метилового эфира L-изолейцина массой 6,65 г (97 %). R_f 0.62 (Б); т. пл. 81 = 85°C; $[\alpha]_D^{26}$ = +39° (c = 1, ДМФА).(Лит. данные: т.пл. 85-86 ˚C $[\alpha]_D^{20}$ = +37.8° (c = 2, MeOH) [336].

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.86 (3 H, т, C$^{\delta}$H$_3$ Ile), 0.90 (3 H, д, C$^{\gamma'}$H$_3$ Ile), 1.27 и 1.44 (2 H, два м, C$^{\gamma}$H$_2$ Ile), 1.94 (1 H, м, C$^{\beta}$H Ile), 3.71 (3 H, с, -OCH$_3$), 3.88 (1 H, дд, C$^{\alpha}$H Ile), 8.65 (3 H, уш. с, N^{+}H$_3$ Ile).

Метиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина, Z-L-Trp-L-Ile-OMe (28). Растворяли 1.09 г (6.05 ммоль) HCl*H-L-Ile-OMe (27) в 20 мл ДМФА с 1.05 мл (6.05 ммоль) DIPEA, к этому раствору прикапывали 2.09 г (6.66 ммоль) Z-L-Trp-OSu (7) в 50 мл ДМФА. Реакцию вели 24 ч при комнатной температуре (ТСХ контроль в системе А). Реакционную массу упаривали досуха, разбавляли хлористым метиленом, выпавший осадок хлорида ДИПЭА отфильтровывали, фильтрат промывали 3 % раствором H_2SO_4, затем 5 % раствором $NaHCO_3$ и дистиллированной водой. Органическую фракцию высушивали над безводным $MgSO_4$, упаривали досуха, сушили в вакуумном эксикаторе над $CaCl_2$. Получали 1.58 г (58 %) вещества в виде белой пены. R_f 0.78 (А); т. пл. 227-230 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -21.6 (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.86 (3 H, д, C$^{\gamma'}$H$_3$ Ile), 0.87 (3 H, т, C$^{\delta}$H$_3$ Ile), 1.20 и 1.41 (2 H, два м, C$^{\gamma}$H$_2$ Ile), 1.80 (1 H, м, C$^{\beta}$H Ile), 2.90 и 3.06 (2 H, два дд, C$^{\beta}$H$_2$ Trp), 3.63 (3 H, с, -

OCH_3), 4.29 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.41 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.96 и 5.02 (2 H, 2 д, -$OC\underline{H}_2C_6H_5$), 6.98-7.51 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.67 (1 H, д, NH Trp), 8.27 (1 H, д, NH Ile), 10.83 (1 H, с, NH индол).

***N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцин, Z-L-Trp-L-Ile-OH (29).** Растворяли 1.31 г (2.9 ммоль) Z-L-Trp-L-Ile-OMe (28) в 10 мл метанола, при перемешивании приливали раствор 0.23 г (5.8 ммоль) NaOH в воде. Наблюдалось помутнение раствора. Перемешивали в течение 3 ч до полного растворения суспензии. Реакционную массу разбавляли водой, подкисляли 10 % H_2SO_4 до pH 4. Продукт из водного раствора экстрагировали ЭА (3x50 мл), органические фракции объединяли, сушили над безводным $MgSO_4$, отфильтровывали, ЭА упаривали, затем переупаривали 3 раза с диэтиловым эфиром до получения устойчивой пены, которую измельчали в порошок. Выход составил 1.11 г (87 %) продукта. R_f 0.46 (A); т. пл. 66-69 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -17° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.77 (3 H, т, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 0.81 (3 H, д, $C^{\delta}H_3$ Ile), 1.07 и 1.41 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.78 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.72 и 2.92 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.02 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.41 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.89 и 4.99 (2 H, с, -$OC\underline{H}_2C_6H_5$), 6.89-7.46 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.65 (1 H, д, NH Trp), 8.07 (1 H, д, NH Ile), 10.84 (1 H, с, NH индол), 12.63 (1 H, уш с, OH).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.81, 15.96, 25.26, 28,29, 31.32, 33.86, 37.09, 55.89, 56.87, 65.79, 110.63, 111.80, 118.71, 118.99, 121.35, 124.33, 127.89, 128.11, 128.76, 136.62, 137.49, 156.32, 172.51, 173.43.

Метиламид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-изолейцина, Z-L-Trp-L-Ile-$NHCH_3$ (30). 1.05 г (2.3 ммоль) Z-L-Trp-L-Ile-OMe (28) растворяли в 10 мл 5 М раствора метиламина в этаноле. Оставляли в герметично закрытой колбе на 72 ч при комнатной температуре, время от времени встряхивая реакционную колбу. Образовавшийся осадок отфильтровали, промывали этанолом, дистиллированной водой и диэтиловым эфиром. Высушивали на воздухе. Получали 0.36 г (40 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.27 (A); т. пл. 235.6-237.8 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -17.7° (c = 0.5, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.77 (3 H, т, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 0.81 (3 H, д, $C^{\delta}H_3$ Ile), 1.16 и 1.39 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.68 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 2.57 (3 H, д, -$NHC\underline{H}_3$), 2.91 и 3.11 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.12 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 4.35 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 и 4.99 (2 H, 2 д, -$OC\underline{H}_2C_6H_5$), 6.91-7.28 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.60 (1 H, д, NH Trp), 7.85 (1 H, д, NH Ile), 10.83 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.52, 15.77, 24.81, 25.86, 28,13, 37.33, 56.05, 56.91, 57.12, 65.73, 110.58, 111.74, 118.66, 118.99, 118.99, 121.29, 124.20, 127.85, 128.11, 128.75, 136.56, 137.48, 156.23, 171.90, 172.64.

3.2.2.8 Синтез амида *N*-бензилоксикарбонила-L-триптофанил-глицина Z-L-Trp-Gly-NH_2 (31)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-глицина, Z-L-Trp-Gly-NH_2 (31). В 30 мл ДМФА растворили 1.251 г (9.0 ммоль) TFA*H-Gly-NH_2 (19) добавили 3.51 мл ДИПЭА, перемешивали 30 мин. Добавили 4 г (9.1 ммоль) Z-L-Trp-OSu (7), перемешивали при комнатной температуре 12 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А). Добавили 0.5 мл ДМПДА, перемешивали еще 30 мин, растворители упарили. Полученное масло разбавили 200 мл дистиллированной воды. Полученный водный раствор экстрагировали ЭА (2×30 мл), после чего органическую фракцию промывали однократно по 30 мл 3 % H_2SO_4, 5 % $NaHCO_3$, 30 мл воды, сушили над $MgSO_4$ 30 минут, фильтровали, упаривали до устойчивой пены. Выход составил 2.26 г (92 %) продукта с т.пл. 123 °С; $[\alpha]_D^{27}$ = -37° (с = 0.5, ДМФА). (Лит. т. пл 118-119 °С; $[\alpha]_D^{24}$ = +4° (с = 0.5, CH_3COOH) [337] и $[\alpha]_D^{23}$ = -26.4° (с=1.8, ДМФА) [338])

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.97 и 3.21 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.64 и 3.81 (2 H, 2 дд, CH_2 Gly), 4.26-4.38 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.98 (2 H, с, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.98-7.37 (10 H, м, Ar), 7.68 (1 H, д, NH Trp), 7.41 и 7.10 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.36 (1 H, д, NH Gly), 10.87 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 42.58, 44.23, 56.21, 65.87, 110.65, 11.82, 118.73, 121.35, 124.35, 128.01, 128.79, 136.6, 137,36, 156.53, 171.46, 172.61

3.2.2.9 Синтез амида *N*-бензилоксикарбонилглицил-L-изолейцина, Z-Gly-L-Ile-NH_2 (32)

Амид *N*-бензилоксикарбонилглицил-L-изолейцина, Z-Gly-L-Ile-NH_2 (32). Растворяли 1.015 г (4.15 ммоль) TFA*H-L-Ile-NH_2 (17) в 20 мл ДМФА с добавлением 0.837 мл (4.35 ммоль) ДИПЭА. При перемешивании прибавляли раствор 1.4 г (4.57 ммоль 10 % избыток) Z-Gly-OSu (8) в 20 мл ДМФА. Перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) растворитель упаривали, разбавляли 50 мл дихлорметана, промывали однократно по 50 мл 3 % H_2SO_4, 5 % $NaHCO_3$ и дистиллированной водой, органическую фазу сушили над Na_2SO_4, осушитель отфильтровывали, упаривали. По мере упаривания образовывался белый осадок. Осадок перенесли на бумажный фильтр, промыли

малым количеством охлажденного гексана, высушили на воздухе. Выход составил 0.763 г (57 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.54 (A); т. пл. 156-158 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -7.6° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.81 (3 H, т, $C^{\delta}H_3$ Ile), 0.83 (3 H, д, $C^{\gamma'}H_3$ Ile), 1.01 и 1.40 (2 H, два м, $C^{\gamma}H_2$ Ile), 1.68 (1 H, м, $C^{\beta}H$ Ile), 3.68 и 3.65 (2 H, дд, CH_2 Gly), 4.15 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Ile), 5.03 (2 H, с, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 7.06 и 7.43 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.27-7.43 (5 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$), 7.47 (1 H, т, NH Gly), 7.72 (1 H, д, NH Ile).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 11.69, 15.90, 24.64, 37.25, 43.91, 57.01, 65.88, 128.11, 128.79, 137.52, 156.95, 169.33, 173.39.

3.2.2.10 Синтез амида *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина Ph-$(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH_2 (35, ГД-102)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33). Растворяли 2.50 г (10.2 ммоль) TFA*H-L-Leu-NH_2 (18) в 20 мл ДМФА, прикапывали 1.97 мл (11.2 ммоль, 10 % изб.) ДИПЭА, перемешивали 0.5 ч. Затем прибавляли раствор 4.88 г (11.2 ммоль, 10 % избыток) Z-L-Trp-OSu (7) в 20 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме. К полученному маслу приливали 100 мл ЭА, раствор промывали 3 % H_2SO_4 (2x100), 5 % $NaHCO_3$ (2x100 мл) и дистиллированной водой (100 мл), органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали. После упаривания к еще теплому подвижному маслу приливали 100 мл дистиллированной воды, образовавшийся осадок выдерживали в холодильнике 12 ч, отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали дистиллированной водой, затем гексаном, высушивали на воздухе. Выход составил 4.13 г (90 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.76 (A); т. пл. 169-173 °C; $[\alpha]_D^{27}$ = -31.5° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.90 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.28-4.31 (2 H, м, $C^{\alpha}H$ Leu и $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 (2 H, м, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.99-7.30 (10 H, м, Ar, индол) 7.25 и 7.33 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.62 (1 H, д, NH Leu), 7.97 (1 H, д, NH Trp), 10.81 (1 H, с, NH индол).

Амид L-триптофанил-L-лейцина H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34). В колбу, содержащую суспензию 0.10 г 10 % Pd/C в 20 мл метанола и 1 мл воды помещали 1.10 г (2.44 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33). Полученную суспензию дегазировали на насосе, после чего пропускали газообразный водород. Данную процедуру повторяли трижды. Затем реакционную массу

интенсивно перемешивали в течение 3 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) катализатор отфильтровывали, промывали метанолом и ДМФА. Фильтрат упаривали, получали 0.89 г (99 %) продукта в виде пены кремового цвета. R_f 0.48 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -25° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.26 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 Н, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.90 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.50 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.94-7.55 (5 Н, м, индол),7.05 и 7.41 (2 Н, два д, NH_2 амид), 7.60 (1 Н, д, NH Leu), 8.05 (1 Н, д, NH Trp), 10.85 (2 Н, уш с, NH_2).

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, Ph-$(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH_2 (35, ГД-102). Растворяли 4.50 г (14.3 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 50 мл ДМФА, добавляли 3.86 г (15.6 ммоль, 10 % изб.) *N*-оксисукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты Ph-$(CH_2)_2$-C(O)-Su (10) перемешивали 12 ч. Затем добавляли 0.20 мл ДМПДА, перемешивали еще полчаса, затем растворитель упарили в вакууме. Полученное масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» раствор. Раствору давали выстоять в течение 24 ч в холодильнике, получали белый порошкообразный осадок, который затем отфильтровывали, промывали на фильтре 100 мл дистиллированной воды, 100 мл гексана и 50 мл диэтилового эфира. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 4.49 г (70 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.73 (А); т. пл. 197-198 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -27° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.38 (2 Н, т, $C\underline{H}_2C_6H_5$), 2.69 (2 Н, т, $\underline{CH}_2CO$), 2.90 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.22 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.54 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.99-7.20 (10 Н, м, Ar, индол), 7.33 и 7.60 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 Н, д, NH Leu), 8.08 (1 Н, д, NH Trp), 10.78 (1 Н, с, NH индол).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 22.14, 22.51, 24.67, 25.80, 27.97, 31.47, 33.82, 37.36, 41.51, 51.42, 53.94, 110.65, 111.99, 118.64, 118.97, 121.28, 124.01, 126.25, 127.85, 128.68, 128.74, 136.55, 141.71, 171.87, 171.96, 174.50. $C_{26}H_{32}N_4O_3$

3.2.2.11 Синтез амида *N*-фенилпропионил-D-триптофанил-L-лейцина Ph$(CH_2)_2$-C(O)-D-Trp-L-Leu-NH_2 (38, ГД-128)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-D-триптофанил-L-лейцина, Z-D-Trp-L-Leu-NH_2 (36). Растворяли 3.30 г (13.52 ммоль) TFA*H-L-Leu-NH_2 (18) 30 мл ДМФА с добавлением 2.35 мл (13.52 ммоль) ДИПЭА. Реакционную массу перемешивали с амином в течение 0.5 ч. Затем при перемешивании прибавляли раствор 7.06 г (16.22 ммоль 20 % избыток) Z-D-Trp-OSu (7D) в 30

мл ДМФА. Перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) раствор упаривали до состояния подвижного масла, растворяли в 200 мл ЭА, экстрагировали 3 % H_2SO_4 (100 мл), затем 5 % раствором $NaHCO_3$ (2х100 мл) и дистиллированной водой (100 мл), органическую фазу сушили над Na_2SO_4, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растворяли в минимальном количестве ДМФА, разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый осадок. Осадку давали выстоять 12 ч в холодильнике при +5°С, отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и гексаном. Сушили в вакуумном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 6.78 г (86 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.72 (А); т. пл. 176-179 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -31° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 Н, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.90 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H$ Trp), 4.28-4.31 (2 Н, м, $C^{\alpha}H$ Leu и $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 (2 Н, м, $C\underline{H}_2CO$), 6.99-7.30 (10 Н, м, Ar) 7.25 и 7.33 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.62 (1 Н, д, NH Leu), 7.97 (1 Н, д, NH Trp), 10.81 (1 Н, с, NH индол).

Амид D-триптофанил-L-лейцина, H-D-Trp-L-Leu-NH_2 (37). В колбу, содержащую суспензию 0.500 г 10 % Pd/C в 50 мл метанола помещали 6.78 г (0.015 моль) Z-D-Trp-L-Leu-NH_2 (36). Через полученную суспензию пропускали ток водорода из газометра в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. По окончании реакции катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «черная лента», промывали 50 мл метанола, фильтрат упарили. Получали продукт в количестве 4.71 г (99 %) в виде серого, немного воскообразного порошка. R_f 0.12 (А); т. пл. 108 °С; $[\alpha]_D^{23}$ = +19 ° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.26 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 Н, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.75 и 3.11 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.50 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.94-7.55 (5 Н, м, индол), 7.05 и 7.41 (2 Н, 2 д, NH_2 амид) 7.95 (1 Н, д, NH Leu), 10.85 (2 Н, уш с, NH_2 Trp).

Амид *N*-фенилпропионил-D-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-D-Trp-L-Leu-NH_2 (38, ГД-128). Растворяли 4.50 г (14.3 ммоль) H-D-Trp-L-Leu-NH_2 (37) в 50 мл ДМФА, добавляли 3.86 г (15.6 ммоль, 10 % изб.) $Ph(CH_2)_2C(O)OSu$ (10), перемешивали 12 ч. Затем добавляли 0.30 мл ДМПДА для удаления избытка (10), перемешивали еще 0.5 ч, затем растворитель упаривали. Полученное масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» раствор. Раствору давали выстоять в течение 24 ч в холодильнике при температуре +5°С, получали белый порошкообразный осадок, который затем

отфильтровывали, промывали 100 мл теплой (43-45 °С) воды и затем 100 мл холодного гексана и 50 мл холодного диэтилового эфира. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 4.49 г (70 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.73 (А); т. пл. 190 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -22° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, C^{γ}H Leu), 2.38 (2 Н, т, $C\underline{H}_2C_6H_5$), 2.69 (2 Н, т, $C\underline{H}_2CO$), 2.90 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.22 (1 Н, дд, C^{α}H Leu), 4.54 (1 Н, м, C^{α}H Trp), 6.99-7.20 (10 Н, м, Ar), 7.33 и 7.60 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 Н, д, NH Leu), 8.08 (1 Н, д, NH Trp), 10.78 (1 Н, с, NH индол).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 21.73, 23.55, 24.53, 28.12, 41.05, 51.31, 56.29, 65.85, 110.26, 111.70, 118.66, 118.96, 121.27, 124.36, 127.71, 128.08, 128.78, 136.57, 137.36, 156.46, 172.15, 174.65, 127.72, 128.78, 172.15, 174.65.

3.2.2.12 Синтез амида *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-D-изолейцина, $Ph(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-D-Leu-NH_2 (41, ГД-123)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-D-лейцина, Z-L-Trp-D-Leu-NH_2 (39). Растворяли 1.10 г (4.50 ммоль) TFA*H-D-Leu-NH_2 (18D) 15 мл ДМФА с добавлением 0.78 мл (4.50 ммоль) ДИПЭА. Реакционную массу перемешивали с амином в течение получаса. Затем при перемешивании прибавляли раствор 2.35 г (5.40 ммоль 20 % избыток) Z-L-Trp-OSu (7) в 15 мл ДМФА. Перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) раствор упаривали до состояния подвижного масла, растворяли в 100 мл ЭА, экстрагировали 3 % H_2SO_4 (1х80 мл), затем 5 % раствором $NaHCO_3$ (2х80 мл) и дистиллированной водой (1х100 мл), органическую фазу сушили над Na_2SO_4, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное масло растворяли в минимальном количестве ДМФА, разбавляли 100 мл дистиллированной воды, получали «молочный» осадок. Осадку давали выстоять 12 ч в холодильнике при +5°С, отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и гексаном. Сушили в вакуумном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Выход составил 1.53 г (76 %) продукта в виде кремового порошка. R_f 0.77 (А); т. пл. 186-189 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = - 5° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0,82-0,88 (6 Н, 2 д д, $2C^{\delta}H_3$ Leu), 1,08-1,22 (1 Н, м, $C^{\gamma}H_2$ Leu), 1,45 (2 Н, м, C^{β}H Leu), 2,90 и 3,09 (2 Н, два д.д., C^{β}H Trp), 4,28-4,31 (2 Н, м., C^{α}H Leu и C^{α}H Trp), 4,93 (2 Н, м, $\underline{CH_2}CO$), 6,99-7,30 (10 Н, м, Ar) 7,25 и 7,33 (2 Н, два с., NH_2 амид), 7,62 (1 Н, д, NH Leu), 7,97 (1 Н, д, NH Trp) , 10,81 (1 Н, с, NH индол).

Амид L-триптофанил-D-лейцина, H-L-Trp-D-Leu-NH_2 (40). В колбу, содержащую суспензию 0.500 г 10 % Pd/C в 50 мл метанола помещали 6.78 г (15 ммоль) Z-L-Trp-D-Leu-NH_2 (39). Через полученную суспензию пропускали ток водорода из газометра в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. По окончании реакции катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «черная лента», промывали 50 мл метанола, фильтрат упарили. Получали продукт в количестве 4.71 г (99 %) в виде серой пены с т.пл.110 ˚C; R_f 0.12(A); $[\alpha]_D^{25}$ = +19° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.26 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.75 и 3.11 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.50 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.94-7.55 (5 H, м, индол), 7.05 и 7.41 (2 H, два д, NH_2 амид) 7.95 (1 H, д, NH Leu), 10.85 (2 H, уш с, NH_2 Trp).

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-D-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-D-Leu-NH_2 (41, ГД-123). Растворяли 4.50 г (14.3 ммоль) H-L-Trp-D-Leu-NH_2 (40) в 50мл ДМФА, добавляли 3.86 г (15.6 ммоль, 10 % изб.) *N*-оксисукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты $Ph(CH_2)_2C(O)OSu$ (10), перемешивали 24 ч. Затем добавляли 0.20 мл ДМПДА, для удаления избытка (10), перемешивали еще 30 мин, затем растворитель упаривали в вакууме при температуре не выше +45 °C. Полученное масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» осадок. Осадку дали выстоять 12 ч в холодильнике при температуре +5°C, затем отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали 100 мл теплой (43-45 °C) воды, затем 100 мл охлажденного гексана и 50 мл охлажденного диэтилового эфира. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$. Выход составил 4.49 г (70 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.73 (A); т. пл. 197-198 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = -27° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.38 (2 H, т, $C\underline{H}_2C_6H_5$), 2.69 (2 H, т, $C\underline{H}_2CO$), 2.90 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.22 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.54 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.99-7.20 (10 H, м, Ar), 7.33 и 7.60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 H, д, NH Leu), 8.08 (1 H, д, NH Trp), 10.78 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 21.60, 23.56, 24.44, 28.05, 31.53, 33.82, 37.26, 48.00, 51.28, 54.65, 110.18, 111.65, 118.63, 118.90, 121.26, 124.11, 126.27, 127.75, 128.60, 128.70, 136.56, 141.69, 172.06, 172.21, 174.75.

3.2.2.13 Синтез метилового эфира *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OMe (45, ГД-116)

Гидрохлорид метилового эфира L-лейцина, HCl*H-L-Leu-OMe (42). В трехгорлую круглодонную колбу, снабженную термометром, капельной воронкой и воздушным холодильником с хлоркальциевой трубкой вносили 150 мл безводного метанола (высушен над ситами с размером пор 3 Å), колбу охлаждали до -20 ^oC на бане со спиртом и жидким азотом. При перемешивании по каплям из капельной воронки прибавляли 7.67 мл (106.7 ммоль, 200 % изб.) хлористого тионила. Во время прибавления поддерживали температуру реакционной смеси в интервале -20 °C - -15 °C. После прибавления всего хлористого тионила в реакционную колбу вносили 7.00 г (53.35 ммоль) L-лейцина, также следя за тем, чтобы температура реакционной смеси не поднималась выше -15 °C. Реакцию вели при -20 °C – -15 °C в течение 10 мин, затем давали нагреться до -5 °C, после чего реакцию вели при этой температуре в течение 2 ч. Реакционную массу нагревали до +40 °C при помощи водяной бани с регулируемой температурой, реакцию вели при перемешивании еще 8 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе Б) упаривали, получали белые стеклообразные кристаллы, которые измельчали, переупаривали с метанолом (2х100 мл), затем затирали под 50 мл безводного (выдержанного над $CaCl_2$) диэтилового эфира, эфир декантировали, твердый остаток отфильтровывали. Полученный продукт сушили в вакуумированном эксикаторе над KOH. Получали белый порошок гидрохлорида метилового эфира L-лейцина массой 8.96 г (92.4 %); т. пл. 147-149 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = -13.8° (c = 5, H_2O). (Лит. данные: т. пл. 148-150 °C [339]; $[\alpha]_D^{25}$ = -13.5° (c = 5, H_2O) [340]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.86 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.64-1.67 (3 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu, $C^{\gamma}H$ Leu), 3.72 (3 H, с, -OCH_3), 3.88 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 8.75 (3 H, уш. с, N^+H_3 Leu).

Метиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-OMe (43). Растворяли 2.43 г (13.36 ммоль) HCl*H-L-Leu-OMe (42) в 30 мл ДМФА с 2.54 мл (14.57 ммоль, 10 % избыток) ДИПЭА, к этому раствору прикапывали 6.98 г (16.03 ммоль, 20 % избыток) Z-L-Trp-OSu (7) в 50 мл ДМФА. Реакцию вели 24 ч при комнатной температуре (ТСХ-конроль в системе А). Реакционную массу упаривали до состояния подвижного масла, разбавляли 300 мл ЭА, этот раствор промывали 3 % раствором H_2SO_4 (2х300 мл) затем 5 % раствором $NaHCO_3$ (2х300 мл) и дистиллированной водой (300 мл). Органическую фракцию отделяли, высушивали над безводным $MgSO_4$ в течение получаса, упаривали до состояния подвижного масла, к нему приливали 200 мл дистиллированной воды комнатной температуры, получали «молочный» осадок, воду упаривали досуха, продукт сушили в вакуумном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Получали 5.95 г (95,6 %) вещества в виде густого масла с

вкраплениями кристаллов. R_f 0.73 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -21.8° (с = 1, ДМФА). (Лит. данные: т. пл. 55-57 ˚С [341], $[\alpha]_D^{24}$ = -28° (с = 0.1, ацетонитрил) [342]).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.90 и 3.06 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.63 (3 Н, с, -OCH_3), 4.29 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.41 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.96 и 5.02 (2 Н, два д, -$OC\underline{H}_2C_6H_5$), 6.98-7.51 (10 Н, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.67 (1 Н, д, NH Trp), 8.27 (1 Н, д, NH Leu), 10.83 (1 Н, с, NH индол).

Метиловый эфир L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-OMe (44). В колбу, содержащую суспензию из 1.00 г 10 % Pd/C с 100 мл метанола и 1 мл дистиллированной воды помещали 5.79 г (12.44 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OMe (43). Через полученную суспензию пропускали водород в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе А По окончании реакции катализатор отфильтровывали через стеклянный фильтр, проложив фильтрующее дно бумагой маркировки «черная лента», промывали метанолом. Фильтрат упаривали, получали 4.15 г продукта в виде белого густого масла. R_f 0.35 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -28.6° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.90 и 3.06 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.42 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 3.63 (3 Н, с, -OCH_3), 4.10 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.92-7.54 (10 Н, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.67 (1 Н, д, NH Trp), 8.27 (1 Н, д, NH Leu), 10.90 (1 Н, с, NH индол).

Метиловый эфир *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OMe (45, ГД-116). К 4.10 г (12.37 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-OMe (44) в 70 мл ДМФА прибавляли 3.67 г (14.85 ммоль, 20 % избыток) $Ph(CH_2)_2C(O)OSu$ (10). Раствор перемешивали 12 ч. Избыточное количество *N*-оксисукцинимидного эфира гасили добавлением 0.35 мл ДМПДА, перемешивали еще 0.5 ч. Растворитель упаривали, разбавляли 300 мл ЭА. Экстрагировали 3 % раствором H_2SO_4 (2х300 мл) затем 5 % раствором $NaHCO_3$ (2х300 мл), затем насыщенным раствором NaCl (2х300 мл) и дистиллированной водой (300 мл). Органическую фракцию высушивали над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч, затем осушитель отфильтровывали, упаривали досуха, получали густое масло с вкраплениями порошка, затем дважды переупаривали с диэтиловым эфиром до получения устойчивой пены. Пену измельчали, переносили на стеклянный фильтр и промывали гексаном. Продукт сушили в вакуумном эксикаторе над Na_2SO_4 и парафином. Получали 4.25 г (74 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.61 (А); т. пл. 134-135 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -41.4° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.34 (2 Н, м, CH_2 цепи), 2.69 (Н, м, CH_2 цепи), 2.92 и 3.08 (2 Н, два

дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.61 (3 H, с, -OCH_3), 4.32 (1 H, дд, C^{α}H Leu), 4.61 (1 H, м, C^{α}H Trp), 6.91-7.61 (10 H, м, Ar), 8.02 (1 H, д, NH Trp), 8.35 (1 H, д, NH Leu), 10.91 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 21.81, 23.21, 24.64. 24.94, 28.30, 31.49, 33.84, 37.34, 48.01, 50.76, 52.25, 53.46, 110.55, 111.68, 118.59, 118.98, 121.25, 124.06, 126.22, 127.87, 128.57, 128.66, 136.52, 141.76, 171.66, 172.43, 173.31.

3.2.2.14 Синтез фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OH (46, ГД-118)

***N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцин, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-Leu-OH (46, ГД-118)**. Растворяли 1.10 г (2.32 ммоль) $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OMe (45) в 10 мл метанола, при перемешивании приливали раствор 0.19 г (4.64 ммоль, 100 % избыток) NaOH в 5 мл воды. Перемешивали в течение ~3 ч до выпадения осадка. Реакционную массу охлаждали в холодильнике, разбавляли 100 мл холодной воды, при перемешивании подкисляли 10 % H_2SO_4 до pH 4 - 5, полученному осадку давали выстоять 12 ч в холодильнике при +5°С. Раствор над сформировавшимся твердым продуктом декантировали, продукт растворяли в 100 мл ЭА, экстрагировали дистиллированной водой (2x100 мл), органический слой отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч. Осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством этилацетата, упаривали, затем переупаривали 3 раза с диэтиловым эфиром до получения белой устойчивой пены. Пену измельчали, переносили на стеклянный фильтр и промывали гексаном. Выход составил 0.95 г (91 %). R_f 0.76 (А); т. пл. 91-92 °С; $[\alpha]_D^{28}$ = -19.8° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 2.34 (2 H, м, CH_2 цепи), 2.69 (H, м, CH_2 цепи), 2.92 и 3.08 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.61 (3 H, с, -OCH_3), 4.32 (1 H, дд, C^{α}H Leu), 4.61 (1 H, м, C^{α}H Trp), 6.91-7.61 (10 H, м, Ar), 8.02 (1 H, д, NH Trp), 8.35 (1 H, д, NH Leu), 10.91 (1 H, с, NH индол), 12.63 (1 H, уш. с, OH).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 21.76, 21.89, 23.33, 24.73, 24,93, 28.25, 30.81, 31.46, 33.82, 35.70, 37.37, 48.41, 50.74, 53.49, 110.65, 111.68, 118.58, 119.00, 121.24, 124.09, 126.22, 127.89, 128.55, 128.74, 136.52, 141.76, 171.67, 172.28, 174.20, 174,46.

3.2.2.15 Синтез метиламида *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-$NHCH_3$ (47, ГД-119)

Метиламид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-$NHCH_3$ (47). Растворяли 1.10 г (2.37 ммоль) N-$Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OMe (45) в 23.0 г раствора метиламина в этаноле, содержащего 5.7 г чистого метиламина. Оставили в герметично закрытой посуде на 6 сут при комнатной температуре. Раствор упарили, затем переупарили дважды с диэтиловым эфиром. Получили 1.05 г (96 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.68 (А); т. пл. 201 °С (с разлож.); $[\alpha]_D^{29}$ = -16.6° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.37 (2 Н, т, CH_2CO), 2.57 (3 Н, д, -NHC<u>H</u>$_3$), 2.69 (2Н, т, C<u>H</u>$_2C_6H_5$), 2.91 и 3.11 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.12 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.35 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 и 4.99 (2 Н, два д, -OC<u>H</u>$_2C_6H_5$), 6.91-7.28 (10 Н, м, -OCH_2C_6<u>H</u>$_5$, индол), 7.60 (1 Н, д, NH Trp), 7.85 (1 Н, д, NH Leu), 10.83 (1 Н, с, NH индол).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 22.12, 23, 44, 24.60, 24.93, 26.00, 28.03, 31.48, 33.82, 37.32, 41.48, 48.00, 51.52, 53.92, 110.52, 111.71, 118.65, 118.98, 121.29, 124.04, 126.25, 127.83, 128.56, 128.67, 136.52, 141.72, 171.83, 171.94, 172.59.

3.2.2.16 Синтез амида *N*-фенилацетил-L-триптофанил-L-лейцина, $PhCH_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2 (48, ГД-107)

Амид *N*-фенилацетил-L-триптофанил-L-лейцина, $PhCH_2C(O)$-LTrp-L-Leu-NH_2 (48). К 0.55 г (1.76 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 20 мл ДМФА прибавляли 0.46 г (20 % избыток) $PhCH_2C(O)OSu$ (9). Раствор перемешивали 24 ч. Контроль за ходом реакции вели методом ТСХ (система А). Избыточное количество *N*-оксисукцинимидного эфира гасили добавлением 0.06 мл ДМПДА, перемешивали 0.5 ч. Затем реакционную массу упаривали до состояния подвижного масла, которое растворяли в 100 мл ЭА. Экстрагировали 3 % H_2SO_4 (2х100 мл), 5 % $NaHCO_3$ (2х100мл), и дистиллированной водой (однократно 100 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч. Осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством ЭА, раствор упаривали. Продукт сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином, выход 0.70 г (91 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.55 (А); т. пл. 123-124 °С; $[\alpha]_D^{27}$ = -16° (с = 0.5, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.95 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.39 (2 Н, с, -OC<u>H</u>$_2C_6H_5$), 4.15 (1

H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.62 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.97-7.38 (10 H, м, Ar), 7.07 и 7.58 (2 H, два д, NH_2 амид), 7.77 (1 H, д, NH Leu), 8.28 (1 H, д, NH Trp), 10.81 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 22.08, 23.50, 24.63, 24.94, 25.81, 27.98, 33.83, 41.51, 42.57, 51.43, 53.92, 110.52, 111.70, 118.66, 118.99, 121.28, 124.10, 126.63, 127.83, 128.50, 129.38, 136.55, 136.70, 170.55, 171.79, 174.50.

3.2.2.17 Синтез амида *N*-капроил-L-триптофанил-L-лейцина, $CH_3(CH_2)_4C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2 (49, ГД-108)

Амид *N*-капроил-L-триптофанил-L-лейцина, $CH_3(CH_2)_4C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2 (49, ГД-108). К 0.55г (1.73 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 20 мл ДМФА прибавляли 0.45 г (2.10 ммоль, 20 % избыток) $CH_3(CH_2)_4C(O)Su$ (12). Раствор перемешивали 7 ч. Контроль за ходом реакции вели методом ТСХ в системе А. Избыточное количество *N*-оксисукцинимидного эфира гасили добавлением 0.06 мл ДМПДА, перемешивали еще 0.5 ч. Затем реакционную массу упаривали, получали легко-кристаллизующееся масло, которое растворяли в 70 мл ЭА. Этот раствор экстрагировали 3 % H_2SO_4 (2х70 мл), 5 % $NaHCO_3$ (2х70 мл), затем однократно дистиллированной водой. Органическую фазу отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч. Осушитель отфильтровывали, промывали небольшим количеством ЭА, упаривали. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином, выход 0.545 г (76 %) вещества в виде белого порошка. R_f 0.62 (А); т. пл. 166 °С; $[\alpha]_D^{27}$ = -20° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.82-0.88 (9 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu и CH_3 капроил), 1.32 (2 H, м, C^4H_2 капроил), 1.45 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.62 (4 H, м, $C^2H_2C^3H_2$ капроил), 2.63-2.68 (2 H, т, C^1H_2 капроил), 2.95 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.39 (2 H, с, -$OC\underline{H}_2C_6H_5$), 4.15 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.62 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.97-7.38 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.07 и 7.58 (2 H, два д, NH_2 амид), 7.77 (1 H, д, NH Leu), 8.28 (1 H, д, NH Trp), 10.81 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-*d*$_6$, δ, ppm): 14.25, 22.08, 22.35, 23.52, 24.61, 24.92, 25.31, 25.79, 27.77, 31.17, 33.81, 35.67, 41.56, 47.98, 51.33, 53.78, 110.71, 111.68, 118.59, 118.91, 121.24, 123.93, 127.80, 136.52, 157.10, 171.93, 172.75, 174.45.

3.2.2.18 Синтез амида *N*-фенилпропионил-глицил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-Gly-L-Leu-NH_2 (50, ГД-129)

Амид *N*-фенилпропионил-глицил-L-лейцина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-Gly-L-Leu-NH_2 (50, ГД-129). Растворяли 2.51 г (10.29 ммоль) TFA*H-L-Leu-NH_2 (18) в 30 мл ДМФА с добавлением 2.00 мл (11.31 ммоль, 10 % избыток) ДИПЭА. Реакционную массу перемешивали с амином в течение получаса. Затем при перемешивании прибавляли раствор 3.39 г (11.31 ммоль 10 % избыток) $Ph(CH_2)_2C(O)$-Gly-OSu (13) в 30 мл ДМФА. Перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) упаривали до состояния подвижного масла, разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали маслообразный легко-кристаллизующийся осадок, дополнительной очистки экстракцией не требовалось. Осадку давали выстоять 24 ч в холодильнике при +5 °С, отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и гексаном. Сушили в вакуумированном эксикаторе над Na_2SO_4 и парафином. Выход 1.50 г (46 %) продукта в виде желтоватого порошка. R_f 0.63 (А); т. пл. 162 °С; $[\alpha]_D^{29}$ = -5.2° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.85 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, C^{γ}H Leu), 2.37 (2 Н, т, $C\underline{H}_2CO$), 2.69 (2 Н, т, $C\underline{H}_2C_6H_5$), 3.56 (2 Н, м, CH_2 Gly), 4.22 (1 Н, дд, C^{α}H Leu), 6.99-7.20 (10 Н, м, Ar), 7.33 и 7.60 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 Н, д, NH Leu).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 21.99, 23.53, 24.68, 24.93, 25.79, 31.44, 33.81, 37.81, 41.32, 42.58, 51.20, 126.31, 128.62, 141.79, 169.22, 172.34, 174.56.

3.2.2.19 Синтез амида *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-глицина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-Gly-NH_2 (52, ГД-125)

Амид L-триптофанил-глицина, H-L-Trp-Gly-NH_2 (51). В колбу, содержащую суспензию 0.400 г 10 % Pd/C в 100 мл метанола помещали 2.97 г (7.5 ммоль) Z-L-Trp-Gly-NH_2 (31). Через полученную суспензию пропускали ток водорода из газометра в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. По окончании реакции катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «черная лента», промывали 50 мл метанола, фильтрат упарили. Получали продукт в количестве 2.04 г (99 %) в виде серой пены без четкой температуры плавления, который использовали далее без дополнительной очистки. R_f 0. 12 (А)

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-глицина, $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-Gly-NH_2 (52, ГД-125). Растворяли 4.50 г (14.3 ммоль) H-L-Trp-Gly-NH_2 (51) в 50 мл ДМФА, добавляли 3.86 г (15.6 ммоль, 10 % изб.) *N*-оксисукцинимидного эфира фенилпропионовой кислоты ($Ph(CH_2)_2C(O)Su$) (10), перемешивали 24 ч. Затем добавляли 0.20 мл ДМПДА, для удаления

избытка (10), перемешивали еще 30 мин, затем растворитель упаривали. Полученное масло разбавляли 200 мл дистиллированной воды, получали белый «молочный» осадок. Осадку дали выстоять (сформироваться) 24 ч в холодильнике при температуре +5 °С, затем отфильтровывали. Полученные кристаллы промывали 100 мл дистиллированной воды и 50 мл гексана. Сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$. Выход 4.49 г (70 %) продукта в виде белого порошка. R_f 0.73 (А); т. пл. 118 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -33° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.92 и 3.11 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 2.37 (2 Н, т, $C\underline{H}_2CO$), 2.69 (2 Н, т, $C\underline{H}_2C_6H_5$), 3.40 (2 Н, м, CH_2 Gly), 4.34 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.52-7.77 (10 Н, м, Ar), 7.41 (1 Н, д, NH Trp), 7.41 и 7.10 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.66 (1 Н, д, NH Gly), 10.12 (1 Н, с, NH индол).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 24.83, 25.81, 27.91, 31.20, 33.85, 37.36, 42.60, 48.07, 54.41, 110.64, 111.80, 118.71, 118.90, 121.35, 124.11, 126.29, 127.83, 128.70, 136.61, 141.69, 171.55, 172.36.

3.2.2.20 Синтез амида *N*-фенилпропионил-*L*-лейцил-*L*-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-*L*-Leu-*L*-Trp-NH_2 (57, ГД-136)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофана, Z-L-Trp-NH_2 (53). Растворяли 15.61 г (35.9 ммоль) Z-L-Trp-OSu (7) в 30 мл ДМФА, при перемешивании приливали 70 мл разбавленного в 2 раза раствора водного аммиака и затем 200 мл дистиллированной воды для того, чтоб реакционная масса не загустела. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 0.5 ч, после чего выдерживали еще 3 ч в холодильнике при +5 °С. Осадок отфильтровывали, промывали насыщенным раствором NaCl и дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Сушили на воздухе до постоянной массы. Получали продукт в виде белого порошка, выход 11.0 г (90 %). R_f 0.53 (А); т. пл. 188-189 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -27° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 3.01 и 3.25 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.98 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.97 (2 Н, с, $-OC\underline{H}_2C_6H_5$), 6.73-7.62 (10 Н, м, $-OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 6.89 и 7.19 (2 Н, два с, NH_2 амид), 8.56 (1 Н, д, NH Trp), 10.78 (1 Н, с, NH индол).

Амид L-триптофана, H-L-Trp-NH_2 (54). К раствору 10.80 г (32 ммоль) Z-L-Trp-NH_2 (53) в 150 мл метанола добавляли 1.20 г катализатора Pd/C (смоченного 3 мл воды) и перемешивали 3 ч в атмосфере водорода при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) катализатор отфильтровывали, промывали 100 мл метанола.

Метанольный раствор упаривали. Получали 6.17 г (95 %) продукта в виде оранжевого масла. R_f 0.05 (А); $[\alpha]_D^{26}$ = -25° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 2.88-3.40 (2 Н, уш. с, NH_2), 3.17 и 3.39 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.98 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.96-7.34 (10 Н, м, индол), 6.98 и 7.15 (2 Н, два с, NH_2 амид), 10.86 (1 Н, с, NH индол).

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцил-L-триптофана, Boc-L-Leu-L-Trp-NH_2 (55). К раствору 3.30 г (16.2 ммоль) H-L-Trp-NH_2 (54) в 30 мл ДМФА прибавляли раствор 6.00г (19.4 ммоль, 20 % изб.) Boc-L-Leu-OSu (5) в 30 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.4 мл ДМПДА и перемешивали еще 0.5 ч. Растворитель упаривали, к еще теплому подвижному желтому маслу приливали 300 мл дистиллированной воды до образования маслообразного осадка, воду над осадком декантировали, остаток растворяли в 250 мл ЭА, экстрагировали 5 % $NaHCO_3$ (2х150 мл) и насыщенным раствором NaCl (2х150 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч, осушитель отфильтровывали, раствор упаривали. Полученные после упаривания кристаллы последовательно промывали дистиллированной водой и гексаном, сушили на воздухе до постоянной массы. Получали продукт в виде кремовых пластинчатых кристаллов с выходом 5.18 г (76 %). R_f 0.48 (А); т. пл. 165-166 °С; $[\alpha]_D^{24}$ = -23° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 1.39 (9 Н, с, -OC$(CH_3)_3$ Boc), 4.32 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (5 Н, м, Ar), 6.98 и 7.15 (2 Н, два с, NH_2 амид), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол).

Трифторацетат амида L-лейцил-L-триптофана, TFA*H-L-Leu-L-Trp-NH_2 (56). К суспензии 1.50 г (3.6 ммоль) Boc-L-Leu-L-Trp-NH_2 (55) в 15 мл дихлорметана приливали 4.5 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре 2 ч. По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе Б) реакционную смесь упаривали, после чего еще дважды переупаривали с диэтиловым эфиром, ещё подвижный остаток дважды растирали с охлажденным диэтиловым эфиром с последующей декантацией. Получали 1.49 г (99 %) карамелеобразного продукта без четкой т. пл.; $[\alpha]_D^{26}$ = -25° (с=1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.32 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (5 Н, м, Ar), 6.98 и 7.15 (2 Н, два с, NH_2 амид), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол).

Амид *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-NH_2 (57, ГД-136). К раствору 1.49 г (3.46 ммоль) TFA*H-L-Leu-L-Trp-NH_2 (56) в 10 мл ДМФА прибавляли 0.65 мл ДИПЭА (3.81 ммоль, 10 % изб.), перемешивали в течение 0.5 ч. Затем добавляли этот раствор к раствору 1.07 г $Ph(CH_2)_2C(O)$-OSu (4.32 ммоль, 25 % изб.) (10) в 10 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0,2 мл ДМПДА и перемешивали еще 0.5 ч. Растворитель упаривали, к еще теплому подвижному желтому маслу приливали 200 мл дистиллированной воды, при этом выпадал «молочный» осадок. Раствор с осадком оставляли на 24 ч в холодильнике, затем хорошо сформированный осадок отфильтровывали, промывали раствором 5 % $NaHCO_3$, дистиллированной водой до нейтральной реакции, и затем гексаном, сушили в вакуумированном эксикаторе над Na_2SO_4 и парафином. Получали продукт в виде кремового порошка с выходом 1.02 г (66 %). R_f 0.41 (A); т. пл. 168-169 °C; $[\alpha]_D^{26}$ = -15° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, два дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 2.38 (2 H, т, -$C\underline{H}_2C_6H_5$), 2.69 (2 H, т, CH_2CO), 2.90 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.22 (1 H, дд, C^{α}H Leu), 4.54 (1 H, м, C^{α}H Trp), 6.99-7.20 (10 H, м, Ar), 7.33 и 7.60 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 H, д, NH Leu), 8.08 (1 H, д, NH Trp), 10.78 (1 H, с, NH индол).

Спектр ^{13}C-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 21.92, 23.52, 24.50, 24.94, 25.94, 28.01, 31.55, 33.83, 37.22, 40.90, 48.02, 51.73, 53.56, 110.48, 111.67, 118.67, 118.93, 121.25, 123.88, 126.27, 128.57, 128.75, 136.51, 141.58, 172.09, 172.34, 173.75.

3.2.2.21 Синтез амида *N*-фенилацетил-L-лейцил-L-триптофана $PhCH_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-NH_2 (58, ГД-141)

Амид *N*-фенилацетил-L-лейцил-L-триптофана $PhCH_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-NH_2 (58, ГД-141). К раствору 1.50 г (3.48 ммоль) TFA*H-L-Leu-L-Trp-NH_2 (56) в 10 мл ДМФА прибавляли 0.65 мл ДИПЭА (3.81 ммоль, 10 % изб.), перемешивали в течение 0.5 ч. Затем добавляли этот раствор к раствору 1.01 г $Ph(CH_2)_2C(O)$-OSu (4.36 ммоль, 25 % изб.) (9) в 10 мл ДМФА. Результирующий раствор перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.1 мл ДМПДА, перемешивали еще 0.5 ч. Растворитель упаривали, подвижный маслообразный остаток растворяли в 75 мл ЭА, экстрагировали последовательно раствором 3 % H_2SO_4 (2x75 мл), раствором 5 % $NaHCO_3$ (2x75 мл) и дистиллированной водой (однократно 75 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч, осушитель отфильтровывали, раствор упаривали, сушили в вакуумированном эксикаторе над Na_2SO_4 и

парафином. Получали продукт в виде белого порошка с выходом 1.12 г (74 %). R_f 0.41 (А); т. пл. 219-221 °С; $[\alpha]_D^{23}$ = -20° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.95 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.39 (2 Н, с, -C$\underline{H_2}$C$_6$H$_5$), 4.15 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.62 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.97-7.38 (10 Н, м, -CH$_2$C$_6\underline{H}_5$, индол), 7.07 и 7.58 (2 Н, два д, NH_2 амид), 7.77 (1 Н, д, NH Leu), 8.28 (1 Н, д, NH Trp), 10.81 (1 Н, с, NH индол).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 21.95, 23.7, 24.62, 24.93, 25.80, 28.04, 33.82, 41.00, 42.57, 47.99, 51.82, 53.55, 110.44, 111.67, 118.67, 118.93, 121.96, 123.86, 126.72, 127.91, 128.60, 129.43, 136.49, 136.85, 157.12, 170.72, 172.21, 173.66.

3.2.2.22 Синтез метилового эфира *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана Ph(CH$_2$)$_2$C(O)-L-Leu-L-Trp-OMe (61, ГД-138)

Метиловый эфир *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцил-L-триптофана, Boc-L-Leu-L-Trp-OMe (59). К раствору 2.15 г (8.44 ммоль) HCl*H-L-Trp-OMe в 30 мл ДМФА прибавляли 1.6 мл ДИПЭА (9.28 ммоль, % изб.), перемешивали в течение 0.5 ч. После чего прибавляли раствор 3.15 г (10.12 ммоль, 20 % изб.) Boc-L-Leu-OSu (5) в 30 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.2 мл ДМПДА, перемешивали еще 0.5 ч. Растворитель упаривали, подвижный маслообразный остаток растворяли в 250 мл ЭА, экстрагировали последовательно 3 % H_2SO_4 (2х100 мл), 5 % $NaHCO_3$ (2х100 мл) и дистиллированной водой (однократно 100 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 0.5 ч, осушитель отфильтровывали, раствор упаривали. Полученное после упаривания карамелеобразное масло дважды переупаривали с метанолом, после чего растирали с диэтиловым эфиром, эфир декантировали, твердый остаток отфильтровывали, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Получали продукт в виде кремового порошка с выходом 3.37 г (76 %). R_f 0.48 (А); т. пл. 84-86 °С; $[\alpha]_D^{24}$ = -23° (с = 1, ДМФА) (Лит. данные: т.пл. 68-69˚С [343], $[\alpha]_D^{25}$ = -43.5° (с = 2, MeOH, длина кюветы 2 дм) [344]).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H$ Trp), 1.39 (9 Н, с, -OC(CH$_3$)$_3$ Boc), 3.61 (3 Н, с, -OCH$_3$), 4.32 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (5 Н, м, Ar), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол).

Трифторацетат метилового эфира L-лейцил-L-триптофана, TFA*H-L-Leu-L-Trp-OMe (60). К суспензии 1.50 г (3.6 ммоль) Boc-L-Leu-L-Trp-OMe (59) в 15 мл дихлорметана

приливали 4.5 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. По окончании реакции растворитель упаривали, затем дважды переупаривали в смеси с диэтиловым эфиром для удаления избытка ТФУ, подвижный остаток затирали под диэтиловым эфиром. Получали 1.49 г (99 %) продукта в виде кремового порошка R_f 0.06 (А); т. пл. 188-191 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -25° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.61 (3 Н, с, -OCH_3), 4.32 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (5 Н, м, Ar), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол).

Метиловый эфир *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OMe (61, ГД-138). К раствору 2.27 г (5.09 ммоль) TFA*H-L-Leu-L-Trp-OMe (60) в 10 мл ДМФА прибавляли 0.97 мл ДИПЭА (5.59 ммоль, 10 % изб.), перемешивали в течение 0.5 ч. Затем добавляли этот раствор к раствору 1.58 г $Ph(CH_2)_2C(O)$-OSu (6.37 ммоль, 25 % изб.) (10) в 10 мл ДМФА, перемешивали 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.1 мл ДМПДА, перемешивали еще 0.5 ч. ДМФА упаривали, подвижный маслообразный остаток растворяли в 75 мл ЭА, экстрагировали последовательно 3 % H_2SO_4 (75 мл), 5 % $NaHCO_3$ (75 мл) и дистиллированной водой (75 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали, получали легко кристаллизующееся масло. Его дважды переупаривали с диэтиловым эфиром, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$. Получали продукт в виде кремовой пены с выходом 2.25 г (93 %). R_f 0.75 (А); т. пл. 97-98 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -12° (с = 0.5, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.34 (2 Н, м, CH_2 цепи), 2.69 (Н, м, CH_2 цепи), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.61 (3 Н, с, -OCH_3), 4.32 (1 Н, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 Н, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (10 Н, м, Ar), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол).

3.2.2.23 Синтез *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OH (62, ГД-139)

***N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофан $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OH (62, ГД-139).** Растворяли 1.20 г (2.60 ммоль) $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-OMe (61) в 20 мл метанола, прибавляли при перемешивании раствор 0.21 г (5.20 ммоль, 100 % изб.) NaOH в 5 мл воды. Перемешивали 24 ч. Реакционную массу разбавляли дистиллированной водой до объема 70 мл,

подкисляли 5 % H_2SO_4 до pH 4, после чего переносили в делительную воронку, продукт экстрагировали ЭА (2х70 мл). Органические фракции объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl (2х70 мл), затем однократно 70 мл дистиллированной воды. Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 мин, фильтровали, упаривали, получали легко кристаллизующееся масло, которое затем переупаривали с диэтиловым эфиром (2х30 мл) до состояния устойчивой пены, сушили в вакуумированном эксикаторе над $CaCl_2$ и парафином. Получали продукт с выходом 1.14 г (97 %). R_f 0.70 (А); т. пл. 107-109 °С; $[\alpha]_D^{26}$ = -8° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, C^{γ}H Leu), 2.34 (2 Н, м, CH_2 цепи), 2.69 (Н, м, CH_2 цепи), 2.92 и 3.08 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.61 (3 Н, с, -OCH_3), 4.32 (1 Н, дд, C^{α}H Leu), 4.61 (1 Н, м, C^{α}H Trp), 6.91-7.61 (10 Н, м, Ar), 8.02 (1 Н, д, NH Trp), 8.35 (1 Н, д, NH Leu), 10.91 (1 Н, с, NH индол), 12.63 (1 Н, уш. с, OH).

Спектр ^{13}С-ЯМР (75 MHz, DMSO-d_6, δ, ppm): 22.00, 23.58, 24.48, 24.94, 27.37, 31.60, 33.84, 37.25, 41.25, 51.14, 53.32, 110.14, 111.81, 118.65, 118.83, 121.37, 124.06, 126.26, 127.75, 128.66, 128.74, 136.54, 141.71, 171.74, 17267, 173.66.

3.2.2.24 Синтез метиламида *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-$NHCH_3$ (63, ГД-140).

Метиламид *N*-фенилпропионил-L-лейцил-L-триптофана $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Leu-L-Trp-$NHCH_3$ (63, ГД-140). Растворяли 0.42 г (0.91 ммоль) $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-OMe (61) в 9.0 г раствора метиламина в этаноле, содержащего 2.17 г (91 ммоль) чистого метиламина. Оставили в герметично закрытой колбе на 6 сут при комнатной температуре время от времени встряхивая. Раствор упаривали досуха, после чего дважды переупаривали с 70 мл диэтилового эфира. Сушили на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы. Получали 0.49 г (96 %) продукта в виде желтоватого порошка с R_f 0.43 (А); т. пл. 173-174 °С (с обугливанием); $[\alpha]_D^{26}$ = -15° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 Н, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 Н, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 Н, м, C^{γ}H Leu), 2.37 (2 Н, т, $CH_2C(O)$), 2.57 (3 Н, д, -NHC$\underline{H}_3$), 2.69 (2Н, т, C$\underline{H}_2C_6H_5$), 2.91 и 3.11 (2 Н, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.12 (1 Н, дд, C^{α}H Leu), 4.35 (1 Н, м, C^{α}H Trp), 4.93 и 4.99 (2 Н, два д, C$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.91-7.28 (10 Н, м, $CH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.60 (1 Н, д, NH Trp), 7.85 (1 Н, д, NH Leu), 10.83 (1 Н, с, NH индол).

3.2.3 Оптимизация метода получения наиболее активного лиганда TSPO - дипептида ГД-102 (35) с использованием трёх схем синтеза

3.2.3.1 Синтез дипептида ГД-102 (35) методом активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров (Схема 1)

Синтез описан выше (глава 3.2.2.10): (2) → (5) → (15) → (18) → (33) → (34) → (35).

3.2.3.2 Синтез дипептида ГД-102 (35) методом активированных пентафторфениловых эфиров (Схема 2)

Пентафторфениловый эфир *N-трет*-бутилоксикарбонила-L-лейцина, Boc-L-Leu-OPfp (64). К раствору 2.50 г (10.82 ммоль) Boc-L-Leu-OH (2) в этилацетате при перемешивании добавили 2.32 г (12.65 ммоль, 17 % изб.) пентафторфенола, затем 2.60 г (12.65 ммоль, 17 % изб.) ДЦГК. Наблюдали выпадение осадка ДЦГМ. Реакцию перемешивали 3 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) осадок ДЦГМ отфильтровали. Полученный раствор в этилацетате экстрагировали 5 % водным раствором $NaHCO_3$ (2x100 мл) и 5 % водным раствором NaCl (100 мл). Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 30 мин. Фильтровали, растворитель удаляли в вакууме, получали 4.20 г (97 %) продукта в виде масла. (Лит. данные масло [345]. Дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

Амид *N-трет*-бутилоксикарбонил-L-лейцина, Boc-L-Leu-NH_2 (15). К раствору 4.20 г (10.57 ммоль) Boc-L-Leu-OPfp (64) в 10 мл ДМФА приливали 70 мл разбавленного в 2 раза водного раствора аммиака (исходный раствор 22-25%). Смесь перемешивали в течение 20 мин, после чего оставили для кристаллизации на 24 ч при температуре +5 ^oC. Выпавший кристаллический осадок белого цвета отфильтровали. Получили 1.45 г продукта. Выход 60 % в виде желтоватого порошка, т.пл. 142-143 ^oC, $[\alpha]_D^{26} = -8.7^o$ (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.84 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.22-1.26 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.36 (9 H, с, Boc), 1.57-1.79 (1 H, м, C^{γ}H Leu), 3.86-3.88 (1 H, дд, C^{α}H Leu), 6.72 (1 H, д, NH Leu), 6.89 и 7.19 (2 H, два с, NH_2 амид).

Трифторацетат амида L-лейцина, TFA*H-L-Leu-NH_2 (18). К 1.31 г (5.69 ммоль) Boc-L-Leu-NH_2 (15) в 40 мл дихлорметана при перемешивании добавляли 6.54 мл (85.43 ммоль) ТФУ, реакцию вели 2 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе Б) смесь упаривали,

затем переупаривали с диэтиловым эфиром (3х30 мл), выдерживали под 60 мл диэтилового эфира 24 ч, после чего эфир декантировали. Кристаллический остаток отфильтровывали, высушивали в сушильном шкафу при 45-50 ^{o}C. Выход составил 1.23 г (89 %) в виде белого порошка с т.пл. 135-136 ^{o}C, $[\alpha]_D^{25}$ = +17.5^{o} (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д: 0.83-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 3.69 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 7.52 и 7.93 (2 H, два с, NH_2 амид), 8.12 (3 H, уш. с, $N^{+}H_3$ Leu).

Пентафторфениловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофана, Z-L-Trp-OPfp (65). К 4.00 г (11.83 ммоль) суспензии Z-L-Trp-OH в 150 мл этилацетата. добавляли 2.60 г (14.20 ммоль, 20 % избыток) пентафторфенола и 2.93 г (14.20 ммоль, 20 % избыток) ДЦГК. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Наблюдали выпадение белого осадка ДЦГМ. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) осадок ДЦГМ отфильтровали. Фильтрат экстрагировали однократно по 100 мл 5 % раствором $NaHCO_3$, затем 3 % H_2SO_4 и насыщенным раствором NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 мин. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали в вакууме. Получали продукт в виде вязкого жёлтого масла с крупинками. Выход составил 5.70 г (95 %), дополнительного подтверждения структуры не требовалось.

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33). В 20 мл ДМФА растворили 1.11 г (4.55 ммоль) TFA*H-L-Leu-NH_2 (18), добавили 0.99 мл (5.69 ммоль) ДИПЭА для нейтрализации и оставили при перемешивании на 30 мин. После этого внесли в этот раствор 2.64 г (5.23 ммоль, 20 % изб.) Z-L-Trp-OPfp (**65**). Реакцию вели при комнатной температуре 12 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) добавили 0.114 мл ДМПДА для удаления избытка Z-L-Trp-OPfp и перемешивали в течение 10 мин. ДМФА упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % раствором H_2SO_4, 5 % раствором $NaHCO_3$ и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 мин. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. К еще подвижному теплому маслу добавили 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Выпавшему осадку давали выстоять в холодильнике 12 ч, затем фильтровали, промывали водой, затем гексаном. Получили 1.30 г (65 %) продукта в виде белого порошка с т. пл. 166-169 ^{o}C, R_f 0.58 (А); $[\alpha]^{D}_{26}$ = -31^{o} (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.85 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.17 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.46-1.49 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.90 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.26-4.31 (2 H, м., $C^{\alpha}H$

Leu и $C^{\alpha}H$ Trp), 4.95 (2 H, м, $C\underline{H_2}CO$), 6.69-7.22 (10 H, м, Ar), 7.25 и 7.33 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.62 (1 H, д, NH Leu), 7.97 (1 H, д, NH Trp), 10.82 (1 H, с, NH индол).

Амид L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34). К 2.05 г (4.55 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33) приливали 50 мл метанола, добавляли 0.346 г 10 % Pd/C в качестве катализатора, предварительно смоченного несколькими каплями воды. Через полученную суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 3 ч при интенсивном перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «черная лента», промывали 50 мл метанола. Фильтрат упаривали, получали продукт с выходом 1.40 г (97 %) в виде серой пены без четкой температуры плавления, R_f 0.15 (А); $[\alpha]^{D}_{26} = -25^{o}$ (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.26 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.90 и 3.08 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.50 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.94-7.55 (5 H, м, Ar), 7.05 и 7.41 (2 H, два д, NH_2 амид), 7.60 (1 H, д, NH Leu), 8.05 (1 H, д, NH Trp), 10.85 (1 H, уш. С, NH индол).

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, Ph-$(CH_2)_2$-C(O)-L-Trp-L-Leu-NH_2 (35, ГД-102). К 1.4 г (4.22 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 30 мл ДМФА добавляли 1.6 г (5.07 ммоль, 20 % изб.) $Ph(CH_2)_2C$-(O)-OPfp. Реакционную смесь оставляли на 12 ч с хлоркальциевой трубкой при перемешивании. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) ДМФА упарили, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % H_2SO_4, 5 % $NaHCO_3$ и затем однократно 100 мл дистиллированной воды. Органическую фракцию сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. Получали 1.3 г продукта в виде желтоватого порошка, с т. пл. 168-172 ^{o}C. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл дихлорметан 100 %, 30 мл дихлорметан:метанол 99:1, 30 мл дихлорметан:метанол 90:10, 30 мл дихлорметан:метанол 85:15, 30 мл дихлорметан:метанол 80:20, 30 мл дихлорметан:метанол 70:30. Собирали фракции по 10 мл, состав раствора контролировали методом ТСХ в системе А. Выход продукта 0.78 г (60 %) в виде белого порошка с т. пл. 178-183 ^{o}C, R_f 0.61 (А) ,$[\alpha]^{D}_{24} = -24^{o}$ (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, $2C^{\delta}H_3$ Leu), 1.45 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.37 (2 H, т, $C\underline{H_2}C_6H_5$), 2.69 (2 H, т, $C\underline{H_2}CO$), 2.90 и 3.09 (2 H,

два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.22 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.56 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.99-7.29 (10 H, м, Ar), 7.20 и 7.58 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 H, д, NH Leu), 8.05 (1 H, д, NH Trp), 10.79 (1 H, с, NH индол).

3.2.3.3 Синтез дипептида ГД-102 (35) имидазолидным методом (Схема 3)

Метиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-OMe (43). К 1.00 г (2.96 ммоль) Z-L-Trp-OH, растворенному в 15 мл ТГФ, добавляли 0.479 г (2,96 ммоль) карбонилдиимидазола (CDI). Отдельно растворяли 0.537 г (2.96 ммоль) [L-Leu-OCH_3]×HCl (42) в ТГФ и 0.515 мл ДИПЭА. Оба раствора перемешивали по 30 мин, затем объединяли и перемешивали еще 1 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе В) упаривали до густого желтого масла, разбавляли 50 мл ЭА и экстрагировали 5 % $NaHCO_3$ (2×50 мл) и дист. водой (1×30 мл). Органическую фракцию высушивали над безводным $MgSO_4$ в течение 30 мин, осушитель отфильтровывали и упаривали до состояния аморфной желтой пены, которую затем дважды переупаривали с диэтиловым эфиром. Выход составил 1.26 г (92 %) продукта без четкой т.пл., с R_f 0.78 (В), $[\alpha]_D^{24}$ = -21.6^o (с 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.90 и 3.06 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3.63 (3 H, с, -OCH_3), 4.29 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.41 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.96 и 5.02 (2 H, 2 д, -O$\underline{CH_2}C_6H_5$), 6.98-7.51 (10 H, м, Ar), 7.67 (1 H, д, NH Trp), 8.27 (1 H, д, NH Leu), 10.83 (1 H, с, NH индол).

***N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-Leu-OH (66)**. Растворяли 1.38 г (2.96 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OMe (43) в 10 мл метанола, при перемешивании приливали раствор 0.24 г (5.2 ммоль, 100 % избыток) NaOH в 5 мл воды. Перемешивали в течение 3 ч до полного растворения реакционной массы. После чего разбавляли 100 мл воды, при перемешивании прикапывали 10 % H_2SO_4 до pH 4-5, при этом выпадал молочный осадок, которому давали выстоять 12 ч в холодильнике при +5 ˚С. Затем раствор над осадком аккуратно декантировали, остаток растворяли в 100 мл этилацетата, экстрагировали дистиллированной водой (2х100 мл), органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение получаса. Осушитель отфильтровывали, раствор упаривали, после чего переупаривали 3 раза с диэтиловым эфиром до получения белой устойчивой пены. Пену измельчали, переносили на стеклянный фильтр и промывали гексаном. Выход составил 2.18 г (76 %) продукта с т. пл. 91-92 ^{o}С, R_f 0.48 (А), $[\alpha]_D^{29}$ = -19.8^o (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.83-0.88 (6 H, м, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.35 (2 H, т, $C^{\beta}H_2$ Leu), 1.58 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 2.34 (2 H, м, CH_2 Leu), 2.92 и 3.08 (2 H, два дд, $C^{\beta}H$ Trp), 3.61 (3 H, с, -OCH_3), 4.32 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.61 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 6.91-7.61 (10 H, м, Ar), 8.02 (1 H, д, NH Trp), 8.35 (1 H, д, NH Leu), 10.91 (1 H, с, NH индол), 12.63 (1 H, уш. с, OH).

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33). К 2.00 г (4.43 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-OH (66) в растворе 15 мл ТГФ добавляли 0.79 г (4.87 ммоль, 10 % изб.) CDI, перемешивали полчаса, затем добавляли смесь 50 мл ДМФА и 10 мл водного аммиака, получили ярко-желтый раствор. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) упаривали растворители в вакууме, разбавляли 50 мл ЭА, экстрагировали дистиллированной водой (2×30 мл), органическую фазу сушили над Na_2SO_4 в течение 30 минут, затем осушитель отфильтровывали и упаривали. Выход составил 1.32 г (66 %) продукта в виде белого порошка с т.пл. 180-182 °C, R_f 0.62 (А), $[\alpha]^D_{23}$ = -25.9° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.08-1.22 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.96 и 3.12 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.28-4.91 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Leu), 4.38 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.93 (2 H, 2 д, -OC$\underline{H}_2C_6H_5$), 6.94-7.30 (10 H, м, -$OCH_2C_6\underline{H}_5$, индол), 7.14 и 7.30 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.62 (1 H, д, NH Trp), 7.97 (1 H, д, NH Leu), 10.81 (1 H, с, NH индол).

Амид L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34). В колбу, содержащую суспензию из 1.26 г (3.72 ммоль) Z-L-Trp-L-Leu-NH_2 (33) в 100 мл метанола добавили 500 мг 10 % Pd/C смоченного 1 мл дистиллированной воды. Через полученную смесь пропускали водород в течение 3 ч при интенсивном перемешивании (ТСХ контроль в системе А). Катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, проложив фильтрующее дно бумагой маркировки «черная лента», промывали метанолом. Фильтрат упаривали, получали 4.15 г (99 %) продукта в виде кремовой аморфной пены. R_f 0.25, без четкой т.пл., $[\alpha]_D^{26}$ = -28.6° (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.09-1.26 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1,45 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.75 и 3.11 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 3,50 (1 H, м, $C^{\alpha}H$ Trp), 4.14 (1 H, дд, $C^{\alpha}H$ Leu), 6.94-7.55 (5 H, м, индол), 7.05 и 7.41 (2 H, 2 д, NH_2 амид), 7.95 (1 H, д, NH Leu), 10.85 (2 H, уш с, NH_2 Trp).

Амид *N*-фенилпропионил-L-триптофанил-L-лейцина, N-Ph$(CH_2)_2$C(O)-L-Trp-L-Leu-NH_2 (35, ГД-102). Растворяли 2.04 г (13.61 ммоль) фенилпропионовой кислоты в 30 мл ДМФА, добавляли 2.20 г (13.61 ммоль) CDI, перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем к этому раствору прибавили 4.10 г (12.37 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 20 мл ДМФА,

перемешивали еще 5 ч при комнатной температуре. Растворитель упаривали, остаток растворили в 100 мл этилацетата. Экстрагировали двукратно по 100 мл 3 % водным раствором H_2SO_4, 5 % раствором $NaHCO_3$, и затем однократно 100 мл насыщенного раствора NaCl. Органическую фракцию отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 в течение 30 минут. Осушитель отфильтровывали, этилацетат упаривали. К образовавшемуся подвижному маслу добавляли 5 мл ДМФА и 200 мл дистиллированной воды для кристаллизации. Получали желтое карамелеобразное масло, которое выдерживали в холодильнике до кристаллизации (48 ч). Выход составил 1.95 г (34 %) порошка кремового цвета с т.пл. 178-180 ˚С. Продукт дополнительно очищали на колонке с силикагелем для повышения показателей чистоты. Набивали колонку силикагелем 60 Å в соотношении 1:15 к массе очищаемого вещества. Прогоняли системы: 100 мл дихлорметан 100 %, 30 мл дихлорметан:метанол 99:1, 30 мл дихлорметан:метанол 90:10, 30 мл дихлорметан:метанол 85:15, 30 мл дихлорметан:метанол 80:20, 30 мл дихлорметан:метанол 70:30. Выход 1.61 г (82 %) продукта в виде белого порошка с т. пл.185-190 ^oC, R_f 0.63 (А), $[\alpha]^D_{24}$ = -23.6^o (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.82-0.88 (6 Н, 2 дд, 2 $C^\delta H_3$ Leu), 1.45 (2 Н, т, $C^\beta H_2$ Leu), 1.56-1.73 (1 Н, м, C^γH Leu), 2.38 (2 Н, т, $C\underline{H_2}C_6H_5$), 2.69 (2 Н, т, $C\underline{H_2}CO$), 2.90 и 3.09 (2 Н, два дд, $C^\beta H_2$ Trp), 4.22 (1 Н, дд, C^αH Leu), 4.54 (1 Н, м, C^αH Trp), 6.99-7.20 (10 Н, м, Ar), 7.33 и 7.60 (2 Н, два с, NH_2 амид), 7.93 (1 Н, д, NH Leu), 8.08 (1 Н, д, NH Trp), 10.78 (1 Н, с, NH индол).

3.2.4 Синтез амида L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Phe-L-Trp-L-Leu-NH_2 (70, ГД-186)

***N*-бензилоксикарбонил-фенилаланин, Z-L-Phe-OH (67).** Суспендировали 5.00 г (30.27 ммоль) H-L-Phe-OH в 25 мл дистиллированной воды, при перемешивании приливали раствор 1.00 г NaOH в 50 мл дистиллированной воды до полного растворения фенилаланина. Одномоментно приливали раствор 8.21 г (33.30 ммоль, 10 % изб.) Z-OSu в 25 мл ацетона. Реакцию вели при комнатной температуре в течение 3 ч (контроль по ТСХ в системе (Г)). Реакционную массу подкисляли 7 % H_2SO_4 до выпадения осадка, осадку давали выстоять в холодильнике в течение 12 ч, затем фильтровали, промывали дистиллированной водой. Сушили на воздухе в чашке Петри до постоянной массы. Выход составил 8.78 г (97 %) продукта в виде белых игольчатых кристаллов с т.пл. 120 ˚С, R_f 0.52 (Г), $[\alpha]_D^{22}$ = -34° (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}Н-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.:, 2.79-2.83 и 3.05-3.11 (2 Н, два м, C^βH Phe), 4.12-4.16 (1 Н, м, C^αH Phe), 4.96 (2 Н, с, -O$C\underline{H_2}C_6H_5$), 7.19-7.34 (10 Н, м, Ar), 7.51 (1 Н, д, NH Phe).

***N*-оксисукцинимидный эфир *N*-бензилоксикарбонил-фенилаланина, Z-L-Phe-OSu (68).** Получали из 4.00 г (13.4 ммоль) Z-L-Phe-OH в ЭА, перекристаллизовали из диэтилового эфира. Выход составил 5.22 г (98 % в виде кремового порошка с т. пл. 137-140 ˚C; R_f 0.86 (A); $[\alpha]^{25}_D$ = -17.4˚ (c = 1, ДМФА). (Лит данные: т. пл. 140 ˚C перекристаллизован из системы хлороформ-петролейный эфир; $[\alpha]^{25}_D$ = -17.3˚ (c = 1, диоксан) [287]).

Спектр ^{1}H-ЯМР (ДМСО-d_6) δ, м.д.: 2.82 (4 H, м, OSu), 2.99-3.02 и 3.18-3.20 (2 H, 2 м $C^{\beta}H_2$ Phe), 4.87-4.88 (2 H, м, $C^{\alpha}H$ Phe), 5.01 (2 H, м, $C\underline{H_2}CO$), 7.31-7.41 (10 H, м, Ar), 7.64 (1 H, д, NH Phe).

Далее синтез вели согласно синтетической цепочке из главы 3.2.2.10: (2) → (5) → (15) → (18) → (33) → (34)

Амид *N*-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, Z-L-Phe-L-Trp-L-Leu-NH_2 (69). Растворяли 7.53 г (23.80 ммоль) H-L-Trp-L-Leu-NH_2 (34) в 50 мл ДМФА, к этому раствору при перемешивании прибавляли раствор 8.34 г (28.56 ммоль, 20 % избыток) Z-L-Phe-OSu (68) в 30 мл ДМФА, реакцию вели 12 ч. Затем добавили 0.8 мл ДМПДА для нейтрализации избытка сукцинимидного эфира, перемешивали еще 1 ч, затем растворитель упаривали. Полученное густое светло-кремовое масло сильно разбавляли 500 мл насыщенного водного раствора NaCl, наблюдалось выпадение осадка. Этот раствор с осадком выдерживали 12 ч в холодильнике при +5 ˚C. Хорошо сформировавшийся осадок отфильтровывали, промыли на фильтре 3 % H_2SO_4, 5 % $NaHCO_3$, дистиллированной водой, затем гексаном и диэтиловым эфиром, высушивали в вакуумированном эксикаторе над Na_2SO_4 и парафином. Получали продукт в виде желтоватого порошка массой 10.80 г (76 %), с т.пл. 205-209 ^{o}C, R_f 0.50 (A); $[\alpha]^D_{23}$ = -23.2^o (c = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-d_6) δ, м.д.: 0.85-0.88 (6 H, 2 дд, 2 $C^{\delta}H_3$ Leu), 1.06-1.23 (1 H, м, $C^{\gamma}H$ Leu), 1.47-1.61 (2 H, м, $C^{\beta}H_2$ Leu), 2.91 и 3.09 (2 H, два дд, $C^{\beta}H_2$ Trp), 4.27-4.60 (3 H, 3 м, $C^{\alpha}H$ Leu и $C^{\alpha}H$ Trp и $C^{\alpha}H$ Phe), 4.90 (2 H, м, $C\underline{H_2}CO$), 6.99-7.25 (15 H, м, Ar), 7.25 и 7.33 (2 H, два с, NH_2 амид), 7.62 (1 H, д, NH Leu), 7.95 (1 H, д, NH Trp), 8.19 (1 H, д, NH Phe), 10.82 (1 H, с, NH индол).

Амид L-фенилаланил-L-триптофанил-L-лейцина, H-L-Phe-L-Trp-L-Leu-NH_2 (70, ГД-186). В колбу помещали 8.40 г (14 ммоль) Z-L-Phe-L-Trp-L-Leu-NH_2 (69), 100 мл метанола и суспензию 1.5 г 10 % Pd/C в 3 мл воды. При интенсивном перемешивании на магнитной мешалке из реакционной смеси откачивали воздух при помощи водоструйного насоса и

заполняли водородом из газометра, процедуру повторяли трижды. Затем перемешивали реакционную смесь в течение 12 ч. По окончании реакции (ТСХ контроль в системе А) катализатор отфильтровывали через мелкопористый стеклянный фильтр, подложив на дно фильтра бумагу маркировки «черная лента», промывали метанолом, фильтрат упаривали. Получали продукт в количестве 6.36 г (98 %) в виде сероватого порошка, который затем очищали от остатков угля фильтрацией через слой силикагеля (примерно 5-6 см). Для этого 10 г силикагеля отдельно взвешивали в круглодонную колбу, смачивали хлористым метиленом, откачивали воздух с помощью крана на водоструйном насосе до прекращения вспенивания. Переносили дегазированный силикагель в стеклянный фильтр с высокими стенками. Растворяли продукт в смеси дихлорметан-метанол 99:1, фильтровали через силикагель, промывали смесью дихлорметан –метанол 1:1. Растворители упаривали, получали продукт в количестве 5.50 г. Дополнительно продукт очищали на колонке с силикагелем. Для этого 40 г силикагеля отдельно взвешивали в круглодонную колбу, смачивали хлористым метиленом, откачивали воздух с помощью крана на водоструйном насосе до прекращения вспенивания. Переносили дегазированный силикагель на колонку (L = 45 см, d = 2.5 см). Растворяли продукт в минимальном количестве смеси дихлорметан-метанол 99:1, с помощью пипетки наносили на поверхность силикагеля. Прогоняли следующие системы: 100 мл дихлорметан:метанол 99:1; 100 мл дихлорметан:метанол 95:5; 100 мл дихлорметан:метанол 93:7; 100 мл дихлорметан:метанол 90:10; 50 мл дихлорметан:метанол 85:15; 50 мл дихлорметан:метанол 80:20.

Собирали фракции по 10 мл. По результатам ТСХ-контроля объединяли фракции, содержащие целевое соединение (R_f 0.30 (А)), упаривали. Выход чистого продукта составил 2.30 г в виде белого порошка с т.пл. 192-197 ^{o}C, $[\alpha]^{D}_{24}$ = -27.4^{o} (с = 1, ДМФА).

Спектр ^{1}H-ЯМР (DMSO-*d*$_6$) δ, м.д.: 0.68-0.98 (6Н, 2 дд, 2 C$^{\delta}$H$_3$ Leu), 1.31-1.52 (2Н, м, C$^{\beta}$H$_2$ Leu), 1.52-1.62 (1Н, м, C$^{\gamma}$H Leu), 1.62-1.88 (2Н, ушир с, NH$_2$ Phe), 2.36-2.56 и 2.76-2.94 (2Н, 2дд, C$^{\beta}$H$_2$ Phe), 2.94-3.24 (2Н, м, C$^{\beta}$H$_2$ Trp), 3.39 (1 Н, м, C$^{\alpha}$H Phe), 4.27 (1Н, м, C$^{\alpha}$H Leu), 4.62 (1Н, м, C$^{\alpha}$H Trp), 6.96 - 7.90 (12Н, м, Ar, NH$_2$амид), 7.62 (1Н, д, NH Leu), 8.03 (1Н, д, NH Trp), 10.89 (1 Н, с, NH индол).

^{13}C-NMR (DMSO-*d*$_6$) δ, ppm: 22.12 и 23.50 (2С, 2C$^{\delta}$H$_3$ Leu), 24.67 (1С, C$^{\gamma}$H$_2$ Leu), 28.30 (1С, C$^{\beta}$H$_2$ Trp), 40.96 (1С, C$^{\beta}$H$_2$ Leu), 41.50 (1С, C$^{\beta}$H$_2$ Phe), 51.34 (1С, C$^{\alpha}$H Leu), 53.42 (1С, C$^{\alpha}$H Trp), 56.44 (1С, C$^{\alpha}$H Phe), 110.13 (1С, C^{9} Trp), 111.69 (1С, C^{15} Trp), 118.66 (1С, C^{14} Trp), 119.05 (1С, C^{12} Trp), 121.27 (1С, C^{13} Trp), 124.17 (1С, C^{10} Trp), 126.57 (1С, C^{23} Phe), 127.98 (1С, C^{11} Trp), 128.56 (1С, C^{22} Phe), 129.75 (1С, C^{21} Phe), 136.51(1С, C^{16} Trp), 139.03 (1С, C^{20} Phe), 171.50 (1С, C=O Trp), 174.51 (2С, C=O Leu и C=O Phe).

При ионизации методом электроспрея (H-ESI) в результате сканирования в режиме регистрации общего ионного тока (режим Q1) был определен молекулярный ион ГД-186 – $[M+H]^+$ = 464.4 m/z, регистрация положительных ионов. Сканирование в режиме ионов-продуктов (Q3) (регистрация положительных ионов, предшественник – 464.4 m/z) выявило основные пути фрагментации исследуемой молекулы и специфический ион-продукт: 334.1 m/z (447.3 m/z – потеря 17 Да – NH_3).

3.3 Методы молекулярного моделирования

3.3.1 Стратегия конструирования дипептидных лигандов транслокаторного белка TSPO с использованием оригинального подхода Drug-Based Peptide Design

Применяли основные этапы стратегии создания дипептидных препаратов «от лекарства — к пептиду» как описано в [36]:

1) выбор базовой структуры непептидного лекарства (Алпидема) на основе фармакологических признаков пептидергического механизма действия;

2) выявление «пептидных» элементов структуры этого лекарства;

3) конструирование простейшего пептидного аналога на основе выявленных элементов;

3.3.2. Молекулярный докинг

Молекулярную стыковку проводили в активный центр белка TSPO в комплексе с лигандом PK-11195, взятым из базы данных PDB (PDB ID: 2MGY). Подготовку белка выполняли в Schrödinger Suite Release 2025-3 (Maestro 14.5.131, MMshare 7.1.131; Platform: Linux-x86_64) с использованием модуля Protein Preparation Wizard по стандартному протоколу. Конформации лигандов генерировали в LigPrep. Расчётную сетку (x = 5.36; y = 5.14; z = 5.27; размер 20 Å) центрировали по лиганду; параметры сетки оптимизировали для пептидного докинга. Стыковку выполняли в модуле Glide (Schrödinger Release 2025-3) по стандартному протоколу с настройками SP [307]. Полученные позы визуализировали и анализировали в Maestro 14.5.131.

Подготовка соединений осуществлялась с помощью инструмента LigPrep в среде Maestro 13.5 согласно протоколу [284, 285]. Структура комплекса TPSO с соединением ГД-186 была получена в AutoDock Vina 1.1.2 [311]. Моделирование молекулярной динамики проводилось, с использованием силового поля CHARMM36/CGenFF 4.4 [313, 314] в программном обеспечении GROMACS 2021.2 [315]. Для анализа и визуализации результатов

использовалось программное обеспечение CPPTRAJ 5.1.0 [346] из пакета Amber-Tools 21 [347] и программное обеспечение UCSF Chimera 1.16 [348].

3.4 Изучение биологических эффектов потенциальных лигандов TSPO

3.4.1 Изучение анксиолитической активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO.

При планировании и проведении экспериментов соблюдены национальные (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание), ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание)) и международные (Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 N 33 «Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований») рекомендации по уходу и использованию экспериментальных животных. Дизайн эксперимента *in vivo* разработан в соответствии с принципами 3R [349]. Заявка на проведение исследований с использованием лабораторных животных направляется в комиссию по биоэтике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» сразу после утверждения протокола эксперимента. Перед экспериментом лабораторных животных выдерживали в экспериментальной комнате в «домашних» клетках в течение 24 час.

При проведении экспериментов на животных были приняты меры, позволяющие избежать излишних физических страданий или повреждений. Эксперименты осуществлялись высококвалифицированными специалистами.

3.4.1.1 Тест «Открытое поле» со световой вспышкой

В работе применена методика освещенного «Открытого поля», при котором перенос животного из темноты на ярко подсвеченную арену создает дополнительный стрессирующий фактор [293].

В исследовании использованы мыши-самцы инбредной линии BALB/c массой 19-25 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН), характеризующейся реакцией замирания. Животные содержались в условиях лабораторного вивария в контролируемых условиях окружающей среды (20-22 °C и 30-70 % относительная влажность, 12-часовой цикл

освещения, десятикратная кратная смена объема воздуха комнаты в час), в пластмассовых клетках с верхней крышкой из нержавеющей стали с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки, по 20 мышей в каждой клетке, при постоянном доступе к гранулированному корму и питьевой воде. Животные распределялись по группам рандомизированно, по критерию массы тела, с отклонением от среднего значения не более чем на ±10%. Перед опытом животных выдерживали в экспериментальной комнате в «домашних» клетках в течение 24 ч.

Мышам вводили суспензию соединений с 1 % Tween-80 (ICN Biomedical Inc. США) в дистиллированной воде однократно внутрибрюшинной инъекцией. Через 30 мин после внутрибрюшинного введения животное сначала помещали на 1 мин в темную камеру, а затем – на один из периферических квадратов установки "Открытое поле", которая представляет из себя белую круглую арену диаметром 1 м с белыми бортами высотой 50 см. Арена равномерно освещена четырьмя бестеневыми лампами по 75 Вт каждая, расположенными на высоте 1 м над поверхностью поля. Все пространство арены равномерно разделено 4-мя концентрическими окружностями и разбиты радиусами на сектора так, что периферическое кольцо состоит из 16 одинаковых криволинейных квадратов. Наблюдение за животным производили в течение 3 мин, раздельно фиксировали число пересеченных квадратов на периферии (ПА), в центральных областях (ЦА), число заходов в центр (Ц), а также число вертикальных стоек (ВА). Суммарное число пересеченных квадратов вместе с числом вертикальных стоек обозначали как общую активность (ОДА). Перед каждым тестированием установку протирали спиртом, мыльным раствором и водой для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса) и непараметрический анализ для независимых переменных (U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Критический уровень значимости $p<0.05$.

3.4.1.2 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Для дополнительной оценки анксиолитического действия веществ, а также для подтверждения механизма действия был использован приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) и методика оценки поведения животных согласно [350]. Использовали базовую конфигурацию ПКЛ (НПК Открытая Наука, Россия): 4 рукава (30 см в длину и 5 см в ширину; высота стенок закрытых рукавов составляла 15 см) и центральной площадки (площадью 5х5 см). ПКЛ был приподнят над полом на 40 см. Пол и стенки каждого из рукавов были

выполнены из серого непрозрачного ПВХ. Тест проводили при слабой освещенности (11-15 люкс в открытых рукавах и около 2-5 люкс в закрытых).

В эксперименте использовались мыши-самцы линии CD-1 массой 20–25 г, полученных из питомника НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН». Вещества растворяли в 1 % растворе Tween-80 в дистиллированной воде и вводили однократной в/б инъекцией. Через 30 мин после введения соединений животное помещали на центральную площадку мордочкой к открытому рукаву для дополнительного стресса. Регистрировали время, проведенное животным в открытых, закрытых рукавах и на центральной площадке, а также число заходов в открытые и закрытые рукава. Время регистрации - 4 мин. Показатели «время в открытых рукавах» и «число выходов в открытые рукава», сравнивали, помимо абсолютных значений, в относительных единицах (в %), которые рассчитывали по формуле, согласно работе [297]:

относительное время в открытых рукавах, % = (время в открытых рукавах в с / 300 с)*100%;

относительное число заходов в открытые рукава, % = (число заходов в открытые рукава/общее число заходов в открытые и закрытые рукава)*100%.

Для статистического анализа полученных в ходе эксперимента результатов использовалась программа GraphPad Prism 9.

С целью изучения зависимости эффекта дипептида ГД-23 от взаимодействия с сайтом TSPO проводили эксперимент с антагонистом PK-11195 (Sigma-Aldrich, USA). Эксперимент выполнялся по следующей схеме: беспородные мыши-самцы CD-1 массой 19-25 г были разделены на 4 группы по 8 особей в каждой.

Группа 1 – контрольная; мышам внутрибрюшинно вводилась дистиллированная вода из расчета 0.1 мл на 10 г веса, через 30 мин проводилась повторная аналогичная инъекция и через 30 мин поведение животных оценивали в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Мышам группы 2 вводилась суспензия PK-11195 в дозе 10.0 мг/кг в/б, через 30 мин - дистиллированная вода и через 30 мин поведение животных оценивали в тесте ПКЛ.

Мышам группы 3 вводилась дистиллированная вода, через 30 мин суспензия ГД-23 в дозе 0,5 мг/кг в/б и через 30 мин поведение животных оценивали в тесте ПКЛ.

Мышам группы 4 вводилась суспензия PK-11195 в дозе 10.0 мг/кг в/б, через 30 мин суспензия ГД-23 в дозе 0.5 мг/кг в/б и через 30 мин поведение животных оценивали в тесте ПКЛ

С целью изучения зависимости эффекта дипептида ГД-23 нейростероидогенеза проводили эксперимент с ингибиторами энзимов биосинтеза нейростероидов трилостаном (Sigma-Aldrich, USA) и финастеридом (Sigma-Aldrich, USA). Эксперимент проводился на мышах CD-1 массой 19-25 г, разделенных на группы по 8 мышей в каждой. В каждом исследовании животные

получали одинаковое количество инъекций, для этого дополнительно вводили инъекцию дистиллированной воды.

В эксперименте использовались следующие группы:

Группа 1 - контрольная, вместо исследуемых веществ мыши получали дистиллированную воду.

Группа 2 – мыши получали ГД-23 в дозе 0.5 мг/кг в/б.

Группа 3 - мыши получали диазепам 1 мг/кг в/б.

Группа 4 - мыши получали трилостан 10 мг/кг подкожно.

Группа 5 - мыши получали трилостан 10 мг/кг подкожно + ГД-23 0.5 мг/кг в/б.

Группа 6 - мыши получали трилостан 10 мг/кг подкожно + диазепам 1 мг/кг в/б.

Группа 7 - мыши получали финастерид 10 мг/кг подкожно.

Группа 8 – финастерид 10 мг/кг подкожно + ГД-23 0.5 мг/кг в/б.

Группа 9 - финастерид 10 мг/кг подкожно + диазепам 1 мг/кг.

ГД-23 и диазепам вводились за 30 минут до тестирования. Трилостан и финастерид вводились за 30 минут до ГД-23 или диазепама, то есть за 60 минут до тестирования. *Статистическую обработку* полученных результатов проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса) и непараметрический анализ для независимых переменных (U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Критический уровень значимости $p<0.05$.

3.4.2 Изучение антидепрессивной активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO

3.4.2.1. Тест вынужденного плавания по Порсолту

Антидепрессивную активность оценивали в тесте вынужденного плавания по Порсолту [302, 303]. В эксперименте использовались мыши-самцы линии BALB/c весом 18-22 г. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. В работе использовали методику с двумя посадками в модификации Angoa-Pérez с соавторами [304]. В первый день мышей помещали в цилиндры (высота 30 см, диаметр 10 см), наполненные на 2/3 водой температурой 22 ºС на 10 мин. На следующий день (через 22 ч после первой посадки) животных снова помещали в сосуды с водой в те же условия и на протяжении 5-минутного тестового периода регистрировали время сохранения животным характерной позы иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения). Уменьшение длительности

времени иммобильноси мышей расценивали как свидетельство наличия антидепрессивной активности тестируемого вещества.

Соединение ГД-102 растворяли в 1 % растворе Tween-80 (ICN Biomedical Inc. США) в дистиллированной воде и вводили в/б через 60 мин после первой посадки в цилиндры. В качестве положительного контроля использовали классический антидепрессант Амитриптилин (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), который вводили за 1 ч до тестовой посадки в дозе 10 мг/кг в/б. Группам «Контроль (вода)» и «Контроль (твин)» вводили в/б соответственно дистиллированную воду или дистиллированную воду с Tween-80 из расчета 5 мл/кг.

Экспериментальные группы:

1. «Контроль (вода)» (n=10)
2. «Контроль (твин)» (n=10)
3. «ГД-102 (0.01 мг/кг)» (n=10)
4. «ГД-102 (0.05 мг/кг)» (n=10)
5. «Амитриптилин (10 мг/кг)» (n=10)

Для выявления *статистических различий* между экспериментальными группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса) с последующим тестом Данета. Достоверными считали значения при $p< 0.05$.

3.4.3 Изучение ноотропной активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO

3.4.3.1. Тест распознавания нового объекта

Изучение ноотропной активности потенциальных дипептидных лигандов TSPO проводили с использованием теста «Распознавание нового объекта» в условиях скополаминовой амнезии [299]. Данный тест основан на естественном для животных предпочтении новизны и позволяет оценить рабочую память [299]. Амнезия, вызванная блокатором центральных м-холинорецепторов скополамином, используется в качестве модели для выявления ноотропных свойств фармакологических соединений [351].

Эксперименты были выполнены на беспородных крысах-самцах массой 350–480 г, полученных в филиале «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства. Тест проводили в клетках модели Т4, идентичных домашним клеткам, в которых содержали животных на протяжении исследования. В ходе теста в клетки помещали объекты трех разных типов, которые отличались друг от друга цветом, формой и материалом и были близки по размеру - герметичные черные жестяные банки

цилиндрической формы с жидкостью (высота 12 см, диаметр 6.5 см), бутылочки из бесцветного прозрачного стекла вытянутой формы с оранжевой жидкостью (высота 16.5 см, диметр 6 см в нижней части), емкости с водой в форме прямоугольного параллелепипеда из прозрачного бесцветного полипропилена с синей этикеткой (высота 18 см, основание 5х6 см). Крысу помещали в пустую клетку с опилками на 4 мин для адаптации. Фаза ознакомления: в два ближайших угла клетки помещали два одинаковых объекта. Через 4 мин объекты убирали. Тест: в те же углы клетки помещали новую пару объектов, в которой один объект был идентичен объектам, предъявлявшимся в фазе ознакомления, а второй был незнакомым. В течение 4 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Перерыв между фазой ознакомления и тестом – 3 мин, в это время животное оставляли в клетке, где проводился тест.

Для исключения влияния предпочтения животными какого-либо из объектов, разным крысам предъявляли разный тип объектов в качестве знакомых и незнакомых. Позиции знакомого и нового объектов (правый и левый угол) меняли от животного к животному. Перед каждым тестом объекты протирали спиртом, мыльным раствором и водой для уничтожения меток, оставленных предыдущим животным.

В эксперименте по изучению антагонизма с блокатором TSPO соединение РК-11195 вводили через 30 мин после изучаемого дипептида. Через 30 мин после инъекции скополамина проводили тест распознавания нового объекта**.** Дипептид ГД-23 вводили за 1 ч до скополамина. Через 30 мин после введения скополамина проводили тест распознавания нового объекта.

Экспериментальные группы:

Группа "контроль" (n=8): вода с твином в/б – 30 мин – вода с твином в/б – 30 мин – физраствор п/к – 30 мин - тест

Группа "скополамин" (n=9): вода с твином в/б – 30 мин – вода с твином в/б – 30 мин – скополамин п/к – 30 мин - тест

Группа "ГД-23 + скополамин" (n=10): ГД-23 в/б – 30 мин – вода с твином в/б – 30 мин – скополамин п/к – 30 мин - тест

Группа "РК-11195 + ГД-23 + скополамин" (n=9): ГД-23 в/б – 30 мин – РК-11195 в/б – 30 мин – скополамин п/к – 30 мин - тест

Группа "РК-11195 + скополамин" (n=7): вода с твином в/б – 30 мин – РК-11195 в/б – 30 мин – скополамин п/к – 30 мин - тест

Группа "РК-11195" (n=6): вода с твином в/б – 30 мин – РК-11195 в/б – 30 мин – физраствор п/к – 30 мин - тест

Обработку видеоданных осуществляли с помощью программы RealTimer (ООО "НПК Открытая Наука", Россия). Регистрировали время исследования животными каждого из

объектов. Исследованием считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта.

В качестве критерия памяти использовали коэффициент дискриминации (КД), который рассчитывали по формуле: Кд =(а-б)/(а+б), где а – время исследования нового объекта (с), б – знакомого объекта (с). Значения Кд > 0 означают, что животное помнит объект, предъявлявшийся в фазу ознакомления.

Вещества:

Скополамин (scopolamine hydrobromide trihydrate, Acros Organics, Бельгия) – 0.2 мг/кг, п/к, разводили в физиологическом растворе (ОАО НПК Эском, Россия) из расчета 1 мл/кг.

ГД-23 – 0.1 мг/кг, в/б; растирали с Tween-80 (ICN Biomedical Inc. США) и разводили дистиллированной водой из расчета 2 мл/кг.

РК-11195 – 3 мг/кг, в/б; растирали с Tween-80 и разводили дистиллированной водой из расчета 2 мл/кг.

Статистическая обработка данных:

Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса с последующими множественными сравнениями с использованием теста Данна. Достоверными считали значения при $p< 0.05$.

3.4.4 Изучение нейропротективной активности потенциального трипептидного эндогенного лиганда TSPO, ГД-186

Культивирование и рассеивание клеток

Исследование проводили с использованием иммортализованных клеток гиппокаппа мыши линии HT-22. Для эксперимента клетки рассеивали на 96-луночные культуральные планшеты, обработанные поли-D-лизином (Corning, США) с плотностью 3,5 тыс. на лунку и инкубировали в среде DMEM (HyClone, США), содержащей 2 мМ L-глутамина (MP Bioscience, США) и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, ThermoFisher, США) при температуре 37°С в атмосфере, содержащей 5% CO_2 до образования монослоя.

Модель окислительного стресса

Модель окислительного стресса в культуре гиппокампальных нейронов линии HT-22 [316] воспроизводили путем добавления в культуральную среду H_2O_2 (ООО ПФК «Обновление», Россия) в конечной концентрации 1,5 мМ в течение 30 мин при 37° С. Далее культуральную среду, содержащую H_2O_2, заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста.

МТТ-тест.

По окончании эксперимента среду культивирования заменяли раствором МТТ (0,5 мг/мл) (Applechem, Германия) и инкубировали 30 мин при температуре 37°С [317]. Затем отбирали раствор МТТ из лунок и добавляли для растворения формазана DMSO (диметилсульфооксид). Через 15 мин измеряли светопоглощение на спектрофотометре “Multiscan” (Thermo) при длине волны 600 нм.

Внесение ГД-186

ГД-186 растворяли в ДМСО. Далее готовили серию последовательных разведений в деионизированной воде. В контроль добавляли 2% раствор ДМСО.

ГД-186 вносили за 24 ч и сразу после повреждения клеток в конечных концентрациях от 10^{-5} до 10^{-8}М.

Обработка данных МТТ-теста

Статистическую обработку данных производили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием оригинальной стратегии пептидного дизайна (Drug-Based Peptide Design) и молекулярного докинга была получена новая группа фармакологически активных лигандов TSPO, представляющих собой замещенные триптофансодержащие дипептиды. Среди синтезированных соединений наиболее активными были дипептиды Z-L-Trp-L-Ile-NH_2 (ГД-23) и $Ph(CH_2)_2C(O)$-L-Trp-L-Leu-NH_2 (ГД-102), они обладали выраженной анксиолитической активностью в тестах ОП и ПКЛ на мышах при системном введении, включая пероральное, а также проявляли антидепрессивную и ноотропную активности. Дипептид ГД-102 обнаруживал активность в дозах 0.01-0.5 мг/кг в/б, а ГД-23 - в дозах 0.05 – 5.0 мг/кг в/б, п/о. Методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием специфического антагониста TSPO, соединения PK-11195, и ингибиторов нейростероидогенеза трилостана и финастерида, доказано, что фармакологические эффекты ГД-23 и ГД-102 зависят от взаимодействия с TSPO и от биосинтеза нейростероидов. Изучение связи структуры и анксиолитической активности в ряду аналогов ГД-23 и ГД-102, отличающихся природой замещения по С- и N- концам, конфигурацией аминокислотных остатков, делетированным боковым радикалом а.о. и последовательностью а. о. (26 целевых соединений), позволило предположить активную трипептидную последовательность -Phe-Trp-Leu-, которая может быть фрагментом эндогенного пептидного лиганда TSPO. Методом докинга и молекулярной динамики показано, что трипептид H-Phe-Trp-Leu-NH_2 хорошо встраивается в активный сайт TSPO и проявляет *in vivo* анксиолитическую и антидепрессивную активности и *in vitro* нейропротекторную.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы оригинальные дипептидные лиганды транслокаторного белка TSPO – амид N-карбобензокси-L-триптофанил-изолейцина (ГД-23) и амид N-фенилпропионил-L-триптофанил-лейцина (ГД-102) как топологические аналоги непептидного лиганда Алпидема. Лигандные свойства ГД-23 и ГД-102 были верифицированы методом молекулярного докинга.
2. Сконструированные дипептиды синтезированы методом классического пептидного синтеза в растворе. Для полученных дипептидов ГД-23 и ГД-102 выявлена анксиолитическая активность у мышей в тесте открытого поля при остром внутрибрюшинном введении в интервале доз 0.05-1.0 мг/кг и 0.01-0.5 мг/кг соответственно. Для ГД-23 активность была показана также и при пероральном введении в интервале доз 0.1-5.0 мг/кг. Анксиолитическая активность для обоих дипептидов подтверждена в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у мышей в дозах 0.1-0.5 мг/кг (ГД-23) и 0.1-1.0 мг/кг (ГД-102).
3. Синтезирован ряд аналогов для ГД-23 и ГД-102, отличающихся природой замещения по С- и N- концам, конфигурацией аминокислотных остатков, делетированным боковым радикалом а.о. и последовательностью а. о. В ряду синтезированных 26-ти соединений изучена связь «структура-анксиолитическая активность». Для наиболее активного дипептида ГД-102 разработана оптимальная схема синтеза, которая может лечь в основу разработки лабораторного регламента.
4. Изучение связи «структура - анксиолитическая активность» в ряду аналогов ГД-23 и ГД-102 показало необходимость L-конфигурации обоих аминокислотных остатков, оптимальность NH_2-группы при С-конце и фенилалканоильной группы при N-конце дипептида на расстоянии равном 7 σ-связей от фенильного радикала до индольного радикала триптофана, а также важность Trp-Leu последовательности. Предложена структура трипептидной последовательности (-Phe-Trp-Leu-), возможного эндогенного пептидного лиганда TSPO.
5. Методом фармакологического ингибиторного анализа с использованием специфического антагониста TSPO, соединения PK-11195, показано, что фармакологические свойства лидерных дипептидов ГД-23 и ГД-102 обусловлены взаимодействием с TSPO.
6. На примере дипептида ГД-23 доказан стероидогенезный механизм анксиолитического действия в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах с использованием ингибиторов энзимов биосинтеза нейростероидов, трилостана и финастерида.

7. Дополнительно, для ГД-23 выявлена ноотропная активность в тесте распознавания нового объекта в условиях скополаминовой амнезии у крыс в дозах 0.05 – 0.5 мг/кг, а для ГД-102 выявлена антидепрессивная активность у мышей в тесте вынужденного плавания по Порсолту в дозах 0.01 и 0.05 мг/кг. Показано, что ноотропный эффект, как и в случае анксиолитического, блокируется специфическим антагонистом TSPO, соединением PK-11195. Оба дипептида являются малотоксичными, LD_{50} >1000 мг/кг у мышей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется расширенное изучение фармакологических эффектов дипептидных лигандов TSPO, как потенциальных нейропсихотропных препаратов с нейростероидогенезным механизмом действия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3α-HSD - 3α-гидроксистероиддегидрогеназа

3β-HSD - 3β-гидроксистероиддегидрогеназа

АДФ – аденозиндифосфат

а.о. – аминокислотный остаток

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК - активные формы кислорода

ВА - вертикальная активность

в/б - внутрибрюшинное введение

ВГД - внутриглазное давление

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ/МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

ГАМК - γ-аминомасляная кислота

$ГАМК_А$ - рецептор γ-аминомасляной кислоты подтипа А

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер

ДИПЭА - N, N-диизопропилэтиламин

ДМПДА - N, N-диметиламинопропиламин

ДМФА - диметилформамид

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК - инфракрасная спектроскопия

ИМАО – ингибиторы моноаминоксидазы

КД - коэффициент дискриминации

КИ - клиническое исследование

КССВ - константа спин-спинового взаимодействия

ЛПС – липополисахарид

МАМ – митохондрально-ассоциированные мембраны

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

НАДФ-Н - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОДА - общая двигательная активность

ОП - открытое поле

ОФ ВЭЖХ - обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОРВИ - острая респираторная вирусная инфекция

ПА - периферическая активность

ПБР - периферический бензодиазепиновый рецептор

п/о - пероральное введение

п/к – подкожное введение

ПКЛ - приподнятый крестообразный лабиринт

ПРД - послеродовая депрессия

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография

ТГФ - тетрагидрофуран

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовый

Ц - количество заходов в центр

ЦА - центральная активность

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЦБР - центральный бензодиазепиновый рецептор

ЦНС - центральная нервная система

ЧМТ - черепно-мозговая травма

ЭА - этилацетат

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ACBD1 - acyl-CoA-binding domain-containing protein 1; белок 1, содержащий домен связывания ацил-КоА; другое название - DBI

ACBD3 - acyl-CoA-binding domain-containing protein 3; белок 3, содержащий домен связывания ацил-КоА; другое название - PAP7, белок, ассоциированный с TSPO

ALLO – аллопрегнанолон

AMPA - рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

Apaf-1 - apoptotic protease activating factor 1; фактор-1, активирующий апоптотические протеазы

ATAD3A - ATPase family AAA domain-containing protein 3A; AAA+-АТФаза, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальных мембран

Boc - *трет*-бутилоксикарбонил

CCK4 - тетрапептид холецистокинина

COSY - гомоядерная корреляционная спектроскопия

CRAC-домен - cholesterol recognition amino acid consensus; аминокислотный участок, распознающий холестерин

CYP11A1 - цитохром P450scc

Cyt c - цитохром с, митохондриальный белок-переносчик электронов дыхательной цепи

DBI - diazepam binding inhibitor; ингибитор связывания диазепама

DBPD - drug-based peptide design; оригинальная стратегия дизайна пептидов, топологических аналогов непептидных лекарственных средств

DCC - N, N'-дициклогексилкарбодиимид

DCU - N, N'-дициклогексилмочевина

DHEA - дегидроэпиандростерон

DIDS - диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота

DMSO (ДМСО) - диметилсульфоксид

DMSO-*d6* - дейтерированный диметилсульфоксид

DS - docking score; скоринг-функция, характеризующая энергию взаимодействия 'лиганд-рецептор'

ESI-MS - масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

FCA - Freund's Complete Adjuvant; полный адъювант Фрейнда, смесь, которую добавляют к антигену, чтобы усилить иммунный ответ

FDA - Food and Drug Administration; Управление по контролю над продуктами и лекарствами США

G1/S – переход из пресинтетической фазы G1 клеточного цикла в синтетическую фазу S (фазу репликации ДНК)

HMBC - CH-корреляция по дальним константам в ЯМР-спектроскопии

HRMS - масс-спектрометрия высокого разрешения

HSQC - гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

IC_{50} - полумаксимальная ингибирующая концентрация

ID - идентификатор

K_d - константа диссоциации

K_i - константа ингибирования

LD_{50} - полулетальная доза

LED - light-emitting diode; светоизлучающий диод

LLOMe - L-leucyl-L-leucine methyl ester; лизосомный дестабилизатор, активирующий воспалительные каскады

LogP - коэффициент распределения в системе октанол/вода

m/z - отношение массы к заряду

mChol –митохондриальный холестерин

mPTP - mitochondrial permeability transition pore; митохондриальная пора переходной проницаемости

NMDA - N-метил-D-аспартатный рецептор

Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ядерный фактор 2, родственный эритроидному фактору 2

ODN - octadecaneuropeptide; октадеканейропептид

OPfp - пентафторфениловый эфир

OSu - N-оксисукцинимидный эфир

PAP7 - PBR-associated protein 7; белок, ассоциированный с периферическим бензодиазепиновым рецептором

PDB - Protein Data Bank; банк данных пространственных структур белков и нуклеиновых кислот

Pd/C - палладий на активированном угле

PKA - цАМФ-зависимая протеинкиназа А

PKA-RIα - регуляторная субъединица Iα цАМФ-зависимой протеинкиназы А

PpIX - протопорфирин IX

PREG – прегненолон

QA – хинолиновая кислота

REMS - Risk Evaluation and Mitigation Strategy; стратегия оценки и смягчения рисков

RMSD - среднеквадратичное отклонение положений атомов

SAR – structure-activity relationship, изучение связи «структура-активность»

StAR - steroidogenic acute regulatory protein; стероидогенный острый регуляторный белок

TFA - трифторуксусная кислота

THDOC - тетрагидродезоксикортикостерон

TSPO - транслокаторный белок массой 18 кДа

TTN - triakontatetraneuropeptide; триаконтатетраневропептид

VDAC - voltage-dependent anion channel; вольт-зависимый анионный канал

Z - бензилоксикарбонил

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения: сайт - URL: https://www.who.int/ru/news/item/13-04-2016-investing-in-treatment-for-depression-and-anxiety-leads-to-fourfold-return (дата обращения: 20.02.2026).
2. Garakani. A. Pharmacotherapy of anxiety disorders: current and emerging treatment options / Garakani, A., Murrough, J. W., Freire, R. C., Thom, R. P., Larkin, K., Buono, F. D., & Iosifescu, D. V. // Frontiers in psychiatry. – 2020. – V. 11. – P. 595584.
3. Verleye, M. Effects of etifoxine on ligand binding to GABAA receptors in rodents / Verleye, M., Pansart, Y., Gillardin, J. M. //Neuroscience research. – 2002. – V. 44. – №. 2. – P. 167-172.
4. Do-Rego, J. L. The non-benzodiazepine anxiolytic drug etifoxine causes a rapid, receptor-independent stimulation of neurosteroid biosynthesis / Do-Rego J. L., Vaudry D., Vaudry H. // PLoS One. – 2015. – V. 10. – №. 3. – P. e0120473.
5. Середенин, С. Б. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола / С.Б. Середенин, М.В. Воронин // Эксп. и клин. Фармакология. – 2009. – Т. 72. – № 1. – С. 3–11.
6. Незнамов, Г.Г. Новый анксиолитик афобазол: результаты сравнительного клинического исследования с диазепамом при генерализованном тревожном расстройстве / Г.Г. Незнамов, С.А. Сюняков, Д.В. Чумаков, Е.С. Телешова, И.А. Давыдова, С.А. Гришин, Л.Э. Маметова, Т.С. Сюняков // Журн. Психиатрия и психофармакотерапия (экстравыпуск). – 2006. – С. 17–23.
7. Медведев В.Э. Психические расстройства при сердечно-сосудистых заболеваниях / Врач. — 2006. — № 14. — С. 19–22.
8. Силкина, И.В. ГАМК-ергический механизм цереброваскулярного и нейропротекторного эффектов афобазола и пикамилона / И.В. Силкина, Т.С. Ганьшина, С.Б. Середенин, Р.С. Мирзоян // Эксп. клин. фармакол. — 2005. — № 1. — С. 20–24.
9. Voronin, M.V. Pharmacological Analysis of GABAA-Receptor and Sigma1R Chaperone Interaction: Research Report I — Investigation of the Anxiolytic, Anticonvulsant and Hypnotic Effects of Allosteric GABAA-Receptors' Ligands / M.V. Voronin, S.V. Shangin, S.A. Litvinova, E.V. Abramova, R.D. Kurbanov, I.V. Rybina, Y.V. Vakhitova, S.B. Seredenin // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24.– № 11. – P. 9580
10. Соловьева, И.К. «Анксиолитики: вчера, сегодня, завтра» / Русский медицинский журнал. – 2006. – № 5.– С. 385-388.
11. Клинические рекомендации Российской Федерации по диагностике и лечению психических и поведенических расстройств: сайт - URL: https://psychiatr.ru/news/1198 (дата обращения 05.05.2026)
12. Bandelow, B. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for treatment of anxiety, obsessive-compulsive and posttraumatic stress disorders – Version 3. Part I: Anxiety disorders / Bandelow, B., Allgulander, C., Baldwin, D. S., Costa, D. L. D. C., Denys, D., Dilbaz, N., Domschke, K., Hollander, E., Kasper, S., Möller, H.-J., Eriksson, E., Fineberg, N. A., Hättenschwiler, J., Kaiya, H.,

Karavaeva, T., Katzman, M. A., Kim, Y.-K., Inoue, T., Lim, L., Masdrakis, V., Menchón, J. M., Miguel, E. C., Nardi, A. E., Pallanti, S., Perna, G., Rujescu, D., Starcevic, V., Stein, D. J., Tsai, S.-J., Van Ameringen, M., Vasileva, A., Wang, Z., Zohar, J. // The World Journal of Biological Psychiatry. – 2023. – V. 24. – №. 2. – P. 79-117

13. Saraceno, B. The World Health Organization's Mental Health and Substance Abuse Programme / Int Psychiatry. – 2004. – V. 1.– № 4. – P. 19-21
14. Аведисова, А.С. К вопросу о зависимости к бензодиазепинам // Психиатрия и психофармакотерапия. – 1999. – № 1. – С. 78–84.
15. Stein, D. J. Serotonin and anxiety: current models / Stein, D. J., Stahl, S // International Clinical Psychopharmacology. – 2000. – V. 15. – P. S1-S6.
16. Gillman, P. K. Monoamine oxidase inhibitors, opioid analgesics and serotonin toxicity //British journal of anaesthesia. – 2005. – V. 95. – №. 4. – P. 434-441.
17. Costa, B. 18-kDa translocator protein association complexes in the brain: From structure to function / B. Costa, E. Da Pozzo, C. Martini // Biochem Pharmacol. – 2020. – V. 177. – P. 114015.
18. Papadopoulos, V. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function / V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.J. Lacapère, P. Lindemann, M.D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.R. Zhang, M. Gavish // Trends Pharmacol Sci. – 2006. – V. 27. – № 8. – P. 402-409
19. Braestrup, C. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding / C. Braestrup, R.F. Squires. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1977. – V. 74. – № 9. – P. 3805-3809
20. Anholt, R.R. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats / R.R. Anholt, E.B. De Souza, M.L. Oster-Granite, S.H. Snyder. // J Pharmacol Exp Ther. – 1985. – V. 233. – № 2. – P. 517-526
21. Da Pozzo, E. Targeting the 18-kDa translocator protein: recent perspectives for neuroprotection / E. Da Pozzo, C. Giacomelli, E. Barresi, B. Costa, S. Taliani, F. da S Passetti, C. Martini // Biochem Soc Trans. – 2015. – V. 43. – № 4. – P. 559-565
22. Rupprecht, R. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders / R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T.C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher // Nat Rev Drug Discov.– 2010. – V. 9. – № 12. – P. 971-988
23. Jaremko, L. Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand / L. Jaremko, M. Jaremko, K. Giller, S. Becker, M. Zweckstetter // Science. – 2014. – V. 343. – № 6177. – P. 1363-1366.
24. Schüle, C. Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? / C. Schüle, D. Eser, T.C. Baghai, C. Nothdurfter, J.S. Kessler, R. Rupprecht // Neuroscience. – 2011. – № 191. – P. 55-77.

25. Mellon, S.H. Endogenous and synthetic neurosteroids in treatment of Niemann-Pick Type C disease / S.H. Mellon, W. Gong, M.D. Schonemann. // Brain Res Rev. – 2008. – V. 57. – № 2. – P. 410-420.
26. Kim, T. Translocator protein (TSPO) ligands for the diagnosis or treatment of neurodegenerative diseases: a patent review (2010-2015; part 1) / T. Kim, A.N. Pae // Expert Opin Ther Pat. – 2016. – V. 26. – № 11. – P. 1325-1351.
27. Kim, T. Translocator protein (TSPO) ligands for the diagnosis or treatment of neurodegenerative diseases: a patent review (2010 - 2015; part 2) / T. Kim, A.N. Pae // Expert Opin Ther Pat. – 2016. – V. 26. – № 11. – P. 1353-1366.
28. Serra, M. 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats / M. Serra, P. Madau, M.F. Chessa, M. Caddeo, E. Sanna, G. Trapani, M. Franco // British Journal of Pharmacology. – 1999. – V. 127. – № 1. – P. 177-187.
29. Guillon, J. Synthesis and preliminary behavioural evaluation in mice of new 3-aryl-3-pyrrol-1-ylpropanamides, analogues of FGIN-1-27 and FGIN-1-43 / J. Guillon, M. Boulouard, V. Lelong, P. Dallemagne, S. Rault, C. Jarry // J Pharm Pharmacol. – 2001. – V. 53. – № 11. – P. 1561-1568.
30. Zhang, L.M. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) / L.M. Zhang, N. Zhao, W.Z. Guo, Z.L. Jin, Z.K. Qiu, H.X. Chen, R. Xue, Y.Z. Zhang, R.F. Yang, Y.F. Li. // Neuropharmacology. – 2014 – V. 81. – P. 116-125.
31. Mokrov, G.V. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamides / G.V. Mokrov, O.A. Deeva, T.A. Gudasheva, S.A. Yarkov, M.A. Yarkova, S.B. Seredenin // Bioorg Med Chem. – 2015. – V. 23. – № 13. – P. 3368-3378.
32. Giatti, S. Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18 kDa (Ro5-4864) in experimental diabetic neuropathy / S. Giatti, M. Pesaresi, G. Cavaletti, R. Bianchi, V. Carozzi, R. Lombardi, O. Maschi, G. Lauria, L.M. Garcia-Segura, D. Caruso, R.C. Melcangi // Neuroscience. – 2009. – V. 164. – № 2. – P. 520-529.
33. Le Fur, G. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies / G. Le Fur, M.L. Perrier, N. Vaucher, F. Imbault, A. Flamier, J. Benavides, A. Uzan, C. Renault, M.C. Dubroeucq, C. Guérémy // Life Sci. – 1983. – V. 32. – № 16. – P. 1839-1847.
34. Spanier B. Proton coupled oligopeptide transporter 1 (PepT1) function, regulation, and influence on the intestinal homeostasis / B. Spanie, F. Rohm // Comprehensive physiology. – 2018. – V. 8. – №. 2. – P. 843-869.
35. Gudasheva, T.A. Design of N-acylprolyltyrosine "tripeptoid" analogues of neurotensin as potential atypical antipsychotic agents / T.A. Gudasheva, T.A. Voronina, R.U. Ostrovskaya, N.I. Zaitseva, N.A. Bondarenko,

V.K. Briling, L.S. Asmakova, G.G. Rozantsev, S.B. Seredenin // J Med Chem. – 1998. – V. 41. – № 3. – P. 284-290.

36. Гудашева, Т. А. Теоретические основы и технологии создания дипептидных лекарств / Известия Академии наук. Серия химическая. – 2015. – №. 9. – С. 2012-2012.
37. Garnier, M. The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. / M. Garnier, N. Boujrad, S.O. Ogwuegbu, J.R.Jr. Hudson, V. Papadopoulos // J Biol Chem. – 1994. – V. 269. – № 35. – P. 22105-22112.
38. Yeliseev, A.A. TspO of *Rhodobacter sphaeroides*. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor / A.A. Yeliseev, S. Kaplan // J Biol Chem. – 2000. – V. 275. – № 8. – P. 5657-5667.
39. Комитет по номенклатуре генов HUGO: сайт – URL https://www.genenames.org/tools/search/#!/?query=TSPO (дата обращения 23.02.2026).
40. Lacapère, J.J. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis / J.J. Lacapère, V. Papadopoulos // Steroids. – 2003. – V. 68. – № 7-8. – P. 569-585.
41. Anholt, R.R. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves / R.R. Anholt, K.M. Murphy, G.E. Mack, S.H. Snyder // J Neurosci. – 1984. – V. 4. – № 2. – P. 593-603.
42. Fan, J. Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa) / J. Fan, P. Lindemann, M.G. Feuilloley, V. Papadopoulos // Curr Mol Med. – 2012. – V. 12. – № 4. – P. 369-386.
43. Li, F. Translocator Protein 18 kDa (TSPO): An Old Protein with New Functions? / F. Li, J. Liu, N. Liu, L.A. Kuhn, R.M. Garavito, S. Ferguson-Miller // Biochemistry. – 2016. – V. 55. – № 20. – P. 2821-2831.
44. Jaremko, Ł. Conformational Flexibility in the Transmembrane Protein TSPO / Ł. Jaremko, M. Jaremko, K. Giller, S. Becker, M. Zweckstetter // Chemistry. – 2015. – V. 21. – № 46. – P. 16555-16563.
45. Guo, Y. Protein structure. Structure and activity of tryptophan-rich TSPO proteins / Y. Guo, R.C. Kalathur, Q. Liu, B. Kloss, R. Bruni, C. Ginter, E. Kloppmann, B. Rost, W.A. Hendrickson. // Science. – 2015. – V. 347. – № 6221. – P. 551-555.
46. Li, F. Crystal structures of translocator protein (TSPO) and mutant mimic of a human polymorphism / F. Li, J. Liu, Y. Zheng, R.M. Garavito, S. Ferguson-Miller // Science. – 2015. – V. 347. – № 6221. – P. 555-558.
47. Liu, J. New TSPO Crystal Structures of Mutant and Heme-Bound Forms with Altered Flexibility, Ligand Binding, and Porphyrin Degradation Activity / J. Liu, C. Hiser, F. Li, R. Hall, R.M. Garavito, S. Ferguson-Miller // Biochemistry. – 2023. – V. 62. – № 7. – P. 1262-1273.
48. Delavoie, F. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding / F. Delavoie, H. Li, M. Hardwick, J.C. Robert, C.

Giatzakis, G. Péranzi, Z.X. Yao, J. Maccario, J.J. Lacapère, V. Papadopoulos // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – № 15. – P. 4506-4519.

49. Austin, C.J. The translocator protein (TSPO): a novel target for cancer chemotherapy / C.J. Austin, J. Kahlert, M. Kassiou, L.M. Rendina // Int J Biochem Cell Biol. – 2013. – V. 45. – № 7. – P. 1212-1216.
50. Rivière, G. Membrane-embedded TSPO: an NMR view / G. Rivière, G. Jaipuria, L.B. Andreas, A. Leonov, K. Giller, S. Becker, M. Zweckstetter // Eur Biophys J. – 2021. – V. 50. – № 2. – P. 173-180.
51. Jaipuria, G. Cholesterol-mediated allosteric regulation of the mitochondrial translocator protein structure / G. Jaipuria, A. Leonov, K. Giller, S.K. Vasa, Ł. Jaremko, M. Jaremko, R. Linser, S. Becker, M. Zweckstetter // Nat Commun. – 2017. – V. 8. – P. 14893.
52. Sandiego, C.M. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET / C.M. Sandiego, J.D. Gallezot, B. Pittman, N. Nabulsi, K. Lim, S.F. Lin, D. Matuskey, J.Y. Lee, K.C. O'Connor, Y. Huang, R.E. Carson, J. Hannestad, K.P. Cosgrove // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – V. 112. – № 40. – P. 12468-12473.
53. Austin, C.J. The translocator protein (TSPO): a novel target for cancer chemotherapy / C.J. Austin, J. Kahlert, M. Kassiou, L.M. Rendina // Int J Biochem Cell Biol. – 2013. – V. 45. – № 7. – P. 1212-1216.
54. Carayon, P. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage / P. Carayon, M. Portier, D. Dussossoy, A. Bord, G. Petitprêtre, X. Canat, G. Le Fur, P. Casellas // Blood. – 1996. – V. 87. – № 8. – P. 3170-3178.
55. Li, F. Characterization and modeling of the oligomeric state and ligand binding behavior of purified translocator protein 18 kDa from *Rhodobacter sphaeroides* / F. Li, Y. Xia, J. Meiler, S. Ferguson-Miller // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – № 34. – P. 5884-5899.
56. Papadopoulos, V. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis / V. Papadopoulos, Y. Aghazadeh, J. Fan, E. Campioli, B. Zirkin, A. Midzak // Mol Cell Endocrinol. – 2015. – V. 408. – P. 90-98.
57. Lambeth, J.D. Adrenodoxin reductase and adrenodoxin. Mechanisms of reduction of ferricyanide and cytochrome c / J.D. Lambeth, H. Kamin // J Biol Chem. – 1977. – V. 252. – № 9. – P. 2908-2917.
58. Hanukoglu, I. Mitochondrial cytochrome P-450scc. Mechanism of electron transport by adrenodoxin / I. Hanukoglu, C.R. Jefcoate // J Biol Chem. – 1980. – V. 255. – № 7. – P. 3057-3061.
59. Li, H. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern / H. Li, V. Papadopoulos // Endocrinology. – 1998. – V. 139. – № 12. – P. 4991-4997.
60. Jamin, N. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor / N. Jamin, J.M. Neumann, M.A. Ostuni, T.K. Vu, Z.X. Yao, S. Murail, J.C. Robert, C. Giatzakis, V. Papadopoulos, J.J. Lacapère // Mol Endocrinol. – 2005. – V. 19. – № 3. – P. 588-594.

61. James, M.L. Development of ligands for the peripheral benzodiazepine receptor / M.L. James, S. Selleri, M. Kassiou // Curr Med Chem. – 2006. – V. 13. – № 17. – P. 1991-2001.
62. Midzak, A. Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria / A. Midzak, M. Rone, Y. Aghazadeh, M. Culty, V. Papadopoulos // Mol Cell Endocrinol. – 2011. – V. 336. – № 1-2. – P. 70-79.
63. Rone, M.B. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones / M.B. Rone, A.S. Midzak, L. Issop, G. Rammouz, S. Jagannathan, J. Fan, X. Ye, J. Blonder, T. Veenstra, V. Papadopoulos // Mol Endocrinol. – 2012. – V. 26. – № 11. – P. 1868-1882.
64. Cheng, B. Utilization of intramitochondrial membrane cholesterol by cytochrome P-450-dependent cholesterol side-chain cleavage reaction in bovine adrenocortical mitochondria: steroidogenic and non-steroidogenic pools of cholesterol in the mitochondrial inner membranes / B. Cheng, D.K. Hsu, T. Kimura // Mol Cell Endocrinol. – 1985. – V. 40. – № 2-3. – P. 233-243.
65. Miller, W.L. Steroid hormone synthesis in mitochondria / Mol Cell Endocrinol. – 2013. – V. 379. – № 1-2. – P. 62-73.
66. Rennert, H., Cheng, Y.J., Strauss, III J.F. Intracellular cholesterol dynamics in steroidogenic cells: a contemporary view. In: E.Y. Adashi, P.C.K Leung eds. The Ovary. New York, NY: Raven Press. – 1993. – P. 147-164.
67. Clark, B.J. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) / B.J. Clark, J. Wells, S.R. King, D.M. Stocco // J Biol Chem. – 1994. – V. 269. – № 45. – P. 28314-28322.
68. Stocco, D.M. Steroidogenic acute regulatory protein / Vitam Horm. – 1999. – V. 55. – P. 399-441.
69. Bose, H.S. StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein / H.S. Bose, R.M. Whittal, Y. Ran, M. Bose, B.Y. Baker, W.L. Miller. // Biochemistry. – 2008. – V. 47. – № 8. – P. 2277-2288.
70. Bose, H.S. The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane / H.S. Bose, V.R. Lingappa, W.L. Miller // Endocr Res. – 2002. – V. 28. – № 4. – P. 295-308.
71. Rone, M.B. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states / M.B. Rone, J. Fan, V. Papadopoulos // Biochim Biophys Acta. – 2009. – V. 1791. – № 7. – P. 646-658.
72. Lim, J.H. The Steroidogenic Acute Regulatory (STAR) Gene Anatomy, Expression, and Roles / J.H. Lim, Y.P. Cheon // Dev Reprod. – 2025. – V. 29. – № 3. – P. 63-80.

73. Caron, K.M. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia / K.M. Caron, S.C. Soo, W.C. Wetsel, D.M. Stocco, B.J. Clark, K.L. Parker // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – V. 94. – № 21. – P. 11540-11545.
74. Issop, L. Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis / L. Issop, M.B. Rone, V. Papadopoulos // Mol Cell Endocrinol. – 2013. – V. 371. – № 1-2. – P. 34-46.
75. Pfanner, N. Assembling the mitochondrial outer membrane / N. Pfanner, N. Wiedemann, C. Meisinger, T. Lithgow // Nat Struct Mol Biol. – 2004. – V. 11. – №1. – P. 1044-8.
76. Young, J.C. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70 / N. Pfanner, N. Wiedemann, C. Meisinger, T. Lithgow // Cell. – 2003. – V. 112. – № 1. – P. 41-50.
77. Selvaraj, V. Minireview: translocator protein (TSPO) and steroidogenesis: a reappraisal / V. Selvaraj, D.M. Stocco, L.N. Tu // Mol Endocrinol. – 2015. – V. 29. – № 4. – P. 490-501.
78. Barron, A.M. Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male / A.M. Barron, B. Ji, S. Kito, T. Suhara, M. Higuchi // Biochem J. – 2018. – V. 475. – № 1. – P. 75-85.
79. Tu, L.N. Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis / L.N. Tu, K. Morohaku, P.R. Manna, S.H. Pelton, W.R. Butler, D.M. Stocco, V. Selvaraj // J Biol Chem. – 2014. – V. 289. – № 40. – P. 27444-27454.
80. Wang, H. Global Deletion of TSPO Does Not Affect the Viability and Gene Expression Profile / H. Wang, K. Zhai, Y. Xue, J. Yang, Q. Yang, Y. Fu, Y. Hu, F. Liu, W. Wang, L. Cui, H. Chen, J. Zhang, W. He // PLoS One. – 2016. – V. 11. – № 12. – P. e0167307.
81. Fan, J. Conditional steroidogenic cell-targeted deletion of TSPO unveils a crucial role in viability and hormone-dependent steroid formation / J. Fan, E. Campioli, A. Midzak, M. Culty, V. Papadopoulos // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – V. 112. – № 23. – P. 7261-7266.
82. Selvaraj, V. Reported for TSPO in Viability and Steroidogenesis is a Misconception. Commentary: Conditional Steroidogenic Cell-Targeted Deletion of TSPO Unveils a Crucial Role in Viability and Hormone-Dependent Steroid Formation / V. Selvaraj, L.N. Tu, D.M. Stocco // Front Endocrinol (Lausanne). – 2016. – V. 7. – P. 91.
83. Owen, D.R. TSPO mutations in rats and a human polymorphism impair the rate of steroid synthesis / D.R. Owen, J. Fan, E. Campioli, S. Venugopal, A. Midzak, E. Daly, A. Harlay, L. Issop, V. Libri, D. Kalogiannopoulou, E. Oliver, E. Gallego-Colon, A. Colasanti, L. Huson, E.A. Rabiner, P. Suppiah, C. Essagian, P.M. Matthews, V. Papadopoulos // Biochem. – 2017. – V. 474. – № 23. – P. 3985-3999.
84. Wang, H. Global Deletion of TSPO Does Not Affect the Viability and Gene Expression Profile / H. Wang, K. Zhai, Y. Xue, J. Yang, Q. Yang, Y. Fu, Y. Hu, F. Liu, W. Wang, L. Cui, H. Chen, J. Zhang, W. He // PLoS One. – 2016. – V. 11. – № 12. – P. e0167307.

85. Miller, W.L. Thirty years of StAR gazing. Expanding the universe of the steroidogenic acute regulatory protein / J Endocrinol. – 2025. – V. 264. – № 3. – P. e240310.
86. Papadopoulos, V. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders / V. Papadopoulos, L. Lecanu, R.C. Brown, Z. Han, Z.X. Yao // Neuroscience. – 2006. – V. 138. – № 3. – P. 749-756.
87. Versijpt, J. Microglial imaging with positron emission tomography and atrophy measurements with magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: a correlative study / J. Versijpt, J.C. Debruyne, K.J. Van Laere, F. De Vos, J. Keppens, K. Strijckmans, E. Achten, G. Slegers, R.A. Dierckx, J. Korf, J.L. De Reuck // Mult Scler. – 2005. – V. 11. – № 2. – P. 127-134.
88. Gerhard, A. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK-11195 PET in idiopathic Parkinson's disease / A. Gerhard, N. Pavese, G. Hotton, F. Turkheimer, M. Es, A. Hammers, K. Eggert, W. Oertel, R.B. Banati, D.J. Brooks // Neurobiol Dis. – 2006. – V. 21. – № 2. – P. 404-412.
89. Ji, B. Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies / B. Ji, J. Maeda, M. Sawada, M. Ono, T. Okauchi, M. Inaji, M.R. Zhang, K. Suzuki, K. Ando, M. Staufenbiel, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, M. Higuchi, T. Suhara // J Neurosci. – 2008. – V. 28. – № 47. – P. 12255-12267.
90. Zinnhardt, B. Molecular Imaging of Immune Cell Dynamics During De- and Remyelination in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis by [^{18}F]DPA-714 PET and MRI / B. Zinnhardt, M. Belloy, I.B. Fricke, J. Orije, C. Guglielmetti, S. Hermann, S. Wagner, M. Schäfers, A. Van der Linden, A.H. Jacobs // Theranostics. – 2019. – V. 9. – № 6. – P. 1523-1537.
91. Chen, M.K. Peripheral benzodiazepine receptor imaging in CNS demyelination: functional implications of anatomical and cellular localization / M.K. Chen, K. Baidoo, T. Verina, T.R. Guilarte // Brain. – 2004. – V. 127. – № 6. – P. 1379-1392.
92. Weizman, A. Platelet peripheral-type benzodiazepine receptor in major depression / A. Weizman, R. Burgin, Y. Harel, L. Karp, M. Gavish // J Affect Disord. – 1995. – V. 33. – № 4. – P. 257-261.
93. Soreni, N. Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in adolescent inpatients with repeated suicide attempts / N. Soreni, A. Apter, A. Weizman, O. Don-Tufeled, S. Leschiner, L. Karp, M. Gavish // Biol Psychiatry. – 1999. – V. 46. – № 4. – P. 484-488.
94. Costa, B. The spontaneous Ala147Thr amino acid substitution within the translocator protein influences pregnenolone production in lymphomonocytes of healthy individuals / B. Costa, S. Pini, P. Gabelloni, E. Da Pozzo, M. Abelli, L. Lari, M. Preve, A. Lucacchini, G.B. Cassano, C. Martini // Endocrinology. – 2009. – V. 150. – № 12. – P. 5438-5445.
95. Ritsner, M. Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in persistently violent schizophrenia patients / M. Ritsner, I. Modai, A. Gibel, S. Leschiner, H. Silver, G. Tsinovoy, A. Weizman, M. Gavish // J Psychiatr Res. – 2003. – V. 37. – № 6. – P. 549-556.

96. Rocca, P. Peripheral benzodiazepine receptor messenger RNA is decreased in lymphocytes of generalized anxiety disorder patients / P. Rocca, A.M. Beoni, C. Eva, P. Ferrero, E. Zanalda, L. Ravizza // Biol Psychiatry. – 1998. – V. 43. – № 10. – P. 767-773.
97. Johnson, M.R. Abnormal peripheral benzodiazepine receptor density associated with generalized social phobia / M.R. Johnson, D. Marazziti, O. Brawman-Mintzer, N.P. Emmanuel, M.R. Ware, W.A. Morton, A. Rossi, G.B. Cassano, R.B. Lydiard // Biol Psychiatry. – 1998. – V. 43. – № 4. – P. 306-309.
98. Zhang, X.Y. The 18 kDa Translocator Protein (TSPO) Overexpression in Hippocampal Dentate Gyrus Elicits Anxiolytic-Like Effects in a Mouse Model of Post-traumatic Stress Disorder / X.Y. Zhang, W. Wei, Y.Z. Zhang, Q. Fu, W.D. Mi, L.M. Zhang, Y.F. Li // Front Pharmacol. – 2018. – V. 9. – P. 1364.
99. Nakamura, K. Evidence that variation in the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) gene influences susceptibility to panic disorder / K. Nakamura, K. Yamada, Y. Iwayama, T. Toyota, A. Furukawa, T. Takimoto, H. Terayama, K. Iwahashi, N. Takei, Y. Minabe, Y. Sekine, K. Suzuki, Y. Iwata, A. Pillai, Y. Nakamoto, K. Ikeda, M. Yoshii, I. Fukunishi, T. Yoshikawa, N.Mori // Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. – 2006. – V. 141B. – № 3. – P. 222-226.
100. Takano, A. Peripheral benzodiazepine receptors in patients with chronic schizophrenia: a PET study with [11C]DAA1106 / A. Takano, R. Arakawa, H. Ito, A. Tateno, H. Takahashi, R. Matsumoto, Y. Okubo, T. Suhara // Int J Neuropsychopharmacol. – 2010. – V. 13. – № 7. – P. 943-950.
101. Rupprecht, R. Translocator protein (18kDa) TSPO: a new diagnostic or therapeutic target for stress-related disorders? / R. Rupprecht, C.H. Wetzel, M. Dorostkar, J. Herms, N.L. Albert, J. Schwarzbach, M. Schumacher, I.D. Neumann // Mol Psychiatry. – 2022. – V. 27. – № 7. – P. 2918-2926.
102. Liu, G.J. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation / G.J. Liu, R.J. Middleton, C.R. Hatty, W.W. Kam, R. Chan, T. Pham, M. Harrison-Brown, E. Dodson, K. Veale, R.B. Banati // Brain Pathol. – 2014. – V. 24. – № 6. – P. 631-653.
103. Abelli, M. Reductions in platelet 18-kDa translocator protein density are associated with adult separation anxiety in patients with bipolar disorder / M. Abelli, B. Chelli, B. Costa, L. Lari, A. Cardini, C. Gesi, M. Muti, A. Lucacchini, C. Martini, G.B. Cassano, S. Pini // Neuropsychobiology. – 2010. – V. 62. – № 2. – P. 98-103.
104. Nguyen, N. Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice / N. Nguyen, E. Fakra, V. Pradel, E. Jouve, C. Alquier, M.E. Le Guern, J. Micallef, O. Blin // Hum Psychopharmacol. – 2006. – V. 21. – № 3. – P. 139-149.
105. Rupprecht, R. Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects / Rupprecht, G. Rammes, D. Eser, T.C. Baghai, C. Schüle, C. Nothdurfter, T. Troxler, C. Gentsch, H.O. Kalkman, F. Chaperon, V. Uzunov, K.H. McAllister, V. Bertaina-Anglade, La C.D. Rochelle, D.

Tuerck, A. Floesser, B. Kiese, M. Schumacher, R. Landgraf, F. Holsboer, K. Kucher Science. – 2009. – V. 325. – № 5939. – P. 490-493.

106. K. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair / M.K. Chen, T.R. Guilarte // Pharmacol Ther. – 2008. – V. 118. – № 1. – P. 1-17.

107. Kreutzberg, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS / Trends Neurosci. – 1996. – V. 19. – № 8. – P. 312-318.

108. Benavides, J. Peripheral type benzodiazepine binding sites as a tool for the detection and quantification of CNS injury / J. Benavides, A. Dubois, B. Scatton // Curr Protoc Neurosci. 2001. – Chapter 7. – Unit7.16.

109. Prinz, M. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease / M. Prinz, J.Priller // Nat Rev Neurosci. – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 300-312.

110. Liu, M.C. Involvement of microglia activation in the lead induced long-term potentiation impairment / M.C. Liu, X.Q. Liu, W. Wang, X.F. Shen, H.L. Che, Y.Y. Guo, M.G. Zhao, J.Y. Chen, W.J. Luo // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 8. – P. e43924.

111. Cai, W. STAT6/Arg1 promotes microglia/macrophage efferocytosis and inflammation resolution in stroke mice / W. Cai, X. Dai, J. Chen, J. Zhao, M. Xu, L. Zhang, B. Yang, W. Zhang, M. Rocha, T. Nakao, J. Kofler, Y. Shi, R.A. Stetler, X. Hu, J. Chen // JCI Insight. – 2019. – V. 4. – № 20. – P. e131355.

112. Berghoff, S.A. Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis / S.A. Berghoff, L. Spieth, T. Sun, L. Hosang, L. Schlaphoff, C. Depp, T. Düking, J. Winchenbach, J. Neuber, D. Ewers, P. Scholz, F. van der Meer, L. Cantuti-Castelvetri, A.O. Sasmita, M. Meschkat, T. Ruhwedel, W. Möbius, R. Sankowski, M. Prinz, I. Huitinga, M.W. Sereda, F. Odoardi, T. Ischebeck, M. Simons, C. Stadelmann-Nessler, J.M. Edgar, K.A. Nave, G.Saher // Nat Neurosci. – 2021. – V. 24. – № 1. – P. 47-60.

113. Zhang, H. TSPO deficiency accelerates amyloid pathology and neuroinflammation by impairing microglial phagocytosis / H. Zhang, H. Wang, F. Gao, J. Yang, Y. Xu, Y. Fu, M. Cai, X. Zhang, Q. Yang, K. Tong, Y. Hu, H. Chen, C. Ma, W. He, J. Zhang // Neurobiol Aging. – 2021. – V. 106. – P. 292-303.

114. Yao, R. Translocator Protein 18 kDa (TSPO) Deficiency Inhibits Microglial Activation and Impairs Mitochondrial Function / R. Yao, R. Pan, C. Shang, X. Li, J. Cheng, J. Xu, Y. Li // Front Pharmacol. – 2020. – V. 11. – P. 986.

115. Fairley, L.H. Mitochondrial control of microglial phagocytosis by the translocator protein and hexokinase 2 in Alzheimer's disease / L.H. Fairley, K.O. Lai, J.H. Wong, W.J. Chong, A.S. Vincent, G. D'Agostino, X. Wu, R.R. Naik, A. Jayaraman, S.R. Langley, C. Ruedl, A.M. Barron // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2023. – V. 120. – № 8. – P. e2209177120.

116. Venneti, S. The high affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand DAA1106 binds specifically to microglia in a rat model of traumatic brain injury: implications for PET imaging / S. Venneti, A.K. Wagner, G. Wang, S.L. Slagel, X. Chen, B.J. Lopresti, C.A. Mathis, C.A. Wiley // Exp Neurol. – 2007. – V. 207. – № 1. – P. 118-127.

117. Karchewski, L.A. Axonal injury-dependent induction of the peripheral benzodiazepine receptor in small-diameter adult rat primary sensory neurons / L.A. Karchewski, S. Bloechlinger, C.J. Woolf // Eur J Neurosci. – 2004. – V. 20. – № 3. – P. 671-683.

118. Mills, C.D. Role of the peripheral benzodiazepine receptor in sensory neuron regeneration / C.D. Mills, J.L. Bitler, C.J. Woolf // Mol Cell Neurosci. – 2005. – V. 30. – № 2. – P. 228-237.

119. Giatti, S. Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update / S. Giatti, S. Romano, M. Pesaresi, G. Cermenati, N. Mitro, D. Caruso, M.J. Tetel, L.M. Garcia-Segura, R.C. Melcangi // Steroids. – 2015. – V. 103. – P. 23-30.

120. Lacor, P. Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis / P. Lacor, P. Gandolfo, M.C. Tonon, E. Brault, I. Dalibert, M. Schumacher, J. Benavides, B. Ferzaz // Brain Res. – 1999. – V. 815. – № 1. – P. 70-80.

121. Wang, H. Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases / H. Wang, H. Sun, K. Della Penna, R.J. Benz, J. Xu, D.L. Gerhold, D.J. Holder, KS. Koblan // Neuroscience. – 2002. – V. 114. – № 3. – P. 529-546.

122. Xiao, H.S. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain / H.S. Xiao, Q.H. Huang, F.X. Zhang, L. Bao, Y.J. Lu, C. Guo, L. Yang, W.J. Huang, G. Fu, S.H. Xu, X.P. Cheng, Q. Yan, Z.D. Zhu, X. Zhang, Z. Chen, Z.G. Han, Zhang X. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V. 99. – № 12. – P. 8360-8365.

123. Ma, B. Translocator protein agonist Ro5-4864 alleviates neuropathic pain and promotes remyelination in the sciatic nerve / B. Ma, X. Liu, X. Huang, Y. Ji, T. Jin, K. Ma // Mol Pain. – 2018. – V. 14. – P. 1744806917748019.

124. Green, D.R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // Science. – 1998. – V. 281. – № 5381. – P. 1309-1312.

125. Tait, S.W. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond / S.W. Tait, D.R. Green // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2010. – V. 11. – № 9. – P. 621-632.

126. Wongso, H. Translocator Protein 18 kDa (TSPO): A Promising Molecular Target for Image-Guided Surgery of Solid Cancers / H. Wongso, A. Kurniawan, Y. Setiadi, C.E. Kusumaningrum, E.M. Widyasari, T.H.A. Wibawa, I. Mahendra, M.B. Febrian, M.E. Sriyani, I. Halimah, I. Daruwati, R. Gunawan, A. Achmad, D.H. Nugraha, R. Lesmana, A.S. Nugraha // Adv Pharm Bull. – 2024. – V. 14. – № 1. – P. 86-104.

127. Cai, L. Glioblastoma Exhibits Inter-Individual Heterogeneity of TSPO and LAT1 Expression in Neoplastic and Parenchymal Cells / L. Cai, S.V. Kirchleitner, D. Zhao, M. Li, J.C. Tonn, R. Glass, RE. Kälin // Int J Mol Sci. – 2020. – V. 21. – № 2. – P. 612.

128. Mendonça-Torres, M.C. The translocator protein (TSPO) ligand PK-11195 induces apoptosis and cell cycle arrest and sensitizes to chemotherapy treatment in pre- and post-relapse neuroblastoma cell lines / M.C. Mendonça-Torres, S.S. Roberts // Cancer Biol Ther. – 2013. – V. 14. – № 4. – P. 319-326.

129. Santidrián, A.F. The potential anticancer agent PK-11195 induces apoptosis irrespective of p53 and ATM status in chronic lymphocytic leukemia cells / A.F. Santidrián, A.M. Cosialls, L. Coll-Mulet, D. Iglesias-Serret, M. de Frias, D.M. González-Gironès, C. Campàs, A. Domingo, G. Pons, J. Gil // Haematologica. – 2007. – V. 92. – № 12. – P. 1631-1638.

130. Chelli, B. Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells / B. Chelli, A. Lena, R. Vanacore, E. Da Pozzo, B. Costa, L. Rossi, A. Salvetti, F. Scatena, S. Ceruti, M.P. Abbracchio, V. Gremigni, C. Martini // Biochem Pharmacol. – 2004. – V. 68. – № 1. – P. 125-134.

131. Veenman, L. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis / L. Veenman, Y. Shandalov, M. Gavish // J Bioenerg Biomembr. – 2008. – V. 40. – № 3. – P. 199-205.

132. Paradies, G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects / G. Paradies, V. Paradies, F.M. Ruggiero, G. Petrosillo // Cells. – 2019. – V. 8. – № 7. – P. 728.

133. Ott, M. Mitochondria, oxidative stress and cell death / M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky // Apoptosis. – 2007. – V. 12. – № 5. – P. 913-922.

134. Roncaroli, F. TSPO expression in brain tumours: is TSPO a target for brain tumour imaging? / F. Roncaroli, Z. Su, K Herholz, A. Gerhard, F.E. Turkheimer. // Clin Transl Imaging. – 2016. – V. 4. – P. 145-156.

135. Winkeler, A. The translocator protein ligand [^{18}F]DPA-714 images glioma and activated microglia in vivo / A. Winkeler, R. Boisgard, A.R. Awde, A. Dubois, B. Thézé, J. Zheng, L. Ciobanu, F. Dollé, T. Viel, A.H. Jacobs, B. Tavitian // Eur J Nucl Med Mol Imaging. – 2012. – V. 39. – № 5. – P. 811-823.

136. Albert, N.L. TSPO PET for glioma imaging using the novel ligand ^{18}F-GE-180: first results in patients with glioblastoma / N.L. Albert, M. Unterrainer, D.F. Fleischmann, S. Lindner, F. Vettermann, A. Brunegraf, L. Vomacka, M. Brendel, V. Wenter, C. Wetzel, R. Rupprecht, J.C. Tonn, C. Belka, P. Bartenstein, M. Niyazi // Eur J Nucl Med Mol Imaging. – 2017. – V. 44. – № 13. – P. 2230-2238.

137. Zeng, Z. Translocator protein 18 kDa regulates retinal neuron apoptosis and pyroptosis in glaucoma / Z. Zeng, M. You, R. Rong, C. Fan, M. Chen, H. Li, D. Ji, X. Xia. // Translocator Redox Biol. – 2023. – V. 63. – P. 102713.

138. Chen, Y. PET imaging of retinal inflammation in mice exposed to blue light using [^{18}F]-DPA-714 / Y. Chen, Y. Zhou, X. Zhu, G. Yan, D. Pan, L. Wang, M. Yang, K. Wang // Mol Vis. – 2022. – V. 28. – P. 507-515.

139. Rashid, K. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligands activate Nrf2 signaling and attenuate inflammatory responses and oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells / K. Rashid, M. Verhoyen, M. Taiwo, T. Langmann // Biochem Biophys Res Commun. – 2020. – V. 528. – № 2. – P. 261-268.

140. Bordet, T. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis / T. Bordet, B. Buisson, M. Michaud, C. Drouot, P. Galéa, P. Delaage, N.P. Akentieva, A.S. Evers, D.F. Covey, M.A. Ostuni, J.J. Lacapère, C. Massaad, M. Schumacher, E.M. Steidl, D. Maux, M. Delaage, C.E. Henderson, R.M. Pruss // J Pharmacol Exp Ther. – 2007. – V. 322. – № 2. – P. 709-720.

141. Azarashvili, T. Effect of the CRAC Peptide, VLNYYVW, on mPTP Opening in Rat Brain and Liver Mitochondria / T. Azarashvili, O. Krestinina, Y. Baburina, I. Odinokova, V. Akatov, I. Beletsky, J. Lemasters, V. Papadopoulos // Int J Mol Sci. – 2016. – V. 17. – № 12. – P. 2096.

142. Verma, A. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor / A. Verma, J.S. Nye, S.H. Snyder // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1987. – V. 84. – № 8. – P. 2256-2260.

143. Guo, Y. Protein structure. Structure and activity of tryptophan-rich TSPO proteins / Y. Guo, R.C. Kalathur, Q. Liu, B. Kloss, R. Bruni, C. Ginter, E. Kloppmann, B. Rost, W.A. Hendrickson. // Science. – 2015. – V. 347. – № 6221. – P. 551-555.

144. Guidotti, A. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors / A. Guidotti, C.M. Forchetti, M.G. Corda, D. Konkel, C.D. Bennett, E. Costa // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1983. – V. 80. – № 11. – P. 3531-3535.

145. Van Aalten, D.M. Binding site differences revealed by crystal structures of Plasmodium falciparum and bovine acyl-CoA binding protein / D.M. Van Aalten, K.G. Milne, J.Y. Zou, G.J. Kleywegt, T. Bergfors, M.A. Ferguson, J. Knudsen, T.A. Jones // J Mol Biol. – 2001. – V. 309. – № 1. – P. 181-192.

146. Costa, E. Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions / E. Costa, A. Guidotti // Life Sci. – 1991. – V. 49. – № 5. – P. 325-344.

147. Papadopoulos, V. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors / V. Papadopoulos, A. Berkovich, K.E. Krueger, E. Costa, A. Guidotti // Endocrinology. – 1991. – V. 129. – № 3. – P. 1481-1488.

148. Korneyev, A. Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands in vivo / A. Korneyev, B.S. Pan, A. Polo, E. Romeo, A. Guidotti, E. Costa // J Neurochem. – 1993. – V. 61. – № 4. – P. 1515-1524.

149. Slobodyansky, E. Isolation and characterization of a rat brain triakontatetraneuropeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site / E.

Slobodyansky, A. Guidotti, C. Wambebe, A. Berkovich, E. Costa // J Neurochem. – 1989. – V. 53. – № 4. – P. 1276-1284.

150. Tokay, T. Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors / T. Tokay, R. Hachem, O. Masmoudi-Kouki, P. Gandolfo, L. Desrues, J. Leprince, H. Castel, M. Diallo, M. Amri, H. Vaudry, M.C. Tonon // Glia. – 2008. – V. 56. – № 13. – P. 1380-1389.

151. Li, H. Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein / H. Li, B. Degenhardt, D. Tobin, Z.X. Yao, K. Tasken, V. Papadopoulos // Mol Endocrinol. – 2001. – V. 15. – № 12. – P. 2211-2228.

152. Liu, J. PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis / J. Liu, H. Li, V. Papadopoulos // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2003. – V. 85. – № 2-5. – P. 275-283.

153. Liu, J. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis / J. Liu, M.B. Rone, V. Papadopoulos // J Biol Chem. – 2006. – V. 281. – № 50. – P. 38879-38893.

154. Okazaki, Y. Protoporphyrin IX regulates peripheral benzodiazepine receptor associated protein 7 (PAP7) and divalent metal transporter 1 (DMT1) in K562 cells / Y. Okazaki, J. Glass // Biochem Biophys Rep. – 2017. – V. 10. – P. 26-31.

155. Fan, J. Acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): an emerging signaling molecule / J. Fan, J. Liu, M. Culty, V. Papadopoulos // Prog Lipid Res. – 2010. – V. 49. – № 3. – P. 218-234.

156. Alquier, T. From benzodiazepines to fatty acids and beyond: revisiting the role of ACBP/DBI / T. Alquier, C.A. Christian-Hinman, J. Alfonso, N.J. Færgeman // Trends Endocrinol Metab. – 2021. – V. 32. – № 11. – P. 890-903.

157. Islinger, M. The diversity of ACBD proteins - From lipid binding to protein modulators and organelle tethers / M. Islinger, J.L. Costello, S. Kors, E. Soupene, T.P. Levine, F.A. Kuypers, M. Schrader // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2020. – V. 1867. – № 5. – P. 118675.

158. Chen, M.K. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair / M.K. Chen, T.R. Guilarte // Pharmacol Ther. – 2008. – V. 118. – № 1. – P. 1-17.

159. Barron, A.M. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease / A.M. Barron, L.M. Garcia-Segura, D. Caruso, A. Jayaraman, J.W. Lee, R.C. Melcangi, C.J. Pike // J Neurosci. – 2013. – V. 33. – № 20. – P. 8891-8897.

160. Mills, C. Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats / C. Mills, M. Makwana, A. Wallace, S. Benn, H. Schmidt, I. Tegeder, M. Costigan, R.H.Jr. Brown, G. Raivich, C.J. Woolf // Eur J Neurosci. – 2008. – V. 27. – № 4. – P. 937-946.

161. Fairley, L.H. Neuroprotective effect of mitochondrial translocator protein ligand in a mouse model of tauopathy / L.H. Fairley, N. Sahara, I. Aoki, B. Ji, T. Suhara, M. Higuchi, A.M. Barron // J Neuroinflammation. – 2021. – V. 18. – № 1. – P. 76.

162. Campiani, G. Synthesis, biological activity, and SARs of pyrrolobenzoxazepine derivatives, a new class of specific "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligands / G. Campiani, V. Nacci, I. Fiorini, M.P. De Filippis, A. Garofalo, S.M. Ciani, G. Greco, E. Novellino, D.C. Williams, D.M. Zisterer, M.J. Woods, C. Mihai, C. Manzoni, T. Mennini // J Med Chem. – 1996. – V. 39. – № 18. – P. 3435-3450.

163. Nacci, V. IX-Synthesis of 6-p-methoxyphenylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepines and evaluation of their affinities for BDZ and GABA receptor subtypes / V. Nacci, I. Fiorini, A. Garofalo, A. Cagnotto // Farmaco. – 1990. – V. 45. – № 5. – P. 545-558.

164. Fiorini, I. Novel ligands specific for mitochondrial benzodiazepine receptors: 6-arylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepine derivatives. Synthesis, structure-activity relationships, and molecular modeling studies / I. Fiorini, V. Nacci, S.M. Ciani, A. Garofalo, G. Campiani, L. Savini, E. Novellino, G. Greco, P. Bernasconi, T. Mennini // J Med Chem. – 1994. – V. 37. – № 10. – P. 1427-1438.

165. Le Fur, G. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]Ro5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies / G. Le Fur, N. Vaucher, M.L. Perrier, A. Flamier, J. Benavides, C. Renault, M.C. Dubroeucq, C. Guérémy, A. Uzan // Life Sci. – 1983. – V. 33. – № 5. – P. 449-457.

166. Kozikowski, A.P. Chemistry, binding affinities, and behavioral properties of a new class of "antineophobic" mitochondrial DBI receptor complex (mDRC) ligands / A.P. Kozikowski, D. Ma, J. Brewer, S. Sun, E. Costa, E. Romeo, A. Guidotti // J Med Chem. – 1993. – V. 36. – № 20. – P. 2908-2920.

167. Holmes, P.V. Differential effects of anxiogenic central and peripheral benzodiazepine receptor ligands in tests of learning and memory / P.V. Holmes, R.C. Drugan // Psychopharmacology (Berl). – 1991. – V. 104. – № 2. – P. 249-254.

168. Bénavidès, J. Histidine modification with diethylpyrocarbonate induces a decrease in the binding of an antagonist, PK 11195, but not of an agonist, Ro5-4864, of the peripheral benzodiazepine receptors / J. Bénavidès, F. Begassat, T. Phan, C. Tur, A. Uzan, C. Renault, M.C. Dubroeucq, C. Guérémy, G. Le Fur // Life Sci. – 1984. – V. 35. – № 12. – P. 1249-1256.

169. Mizoule, J. Opposite effects of two ligands for peripheral type benzodiazepine binding sites, PK 11195 and Ro5-4864, in a conflict situation in the rat / J. Mizoule, A. Gauthier, A. Uzan, C. Renault, M.C. Dubroeucq, C. Guérémy, G. Le Fur // Life Sci. – 1985. – V. 36. – № 11. – P. 1059-1068.

170. Selleri, S. 2-Arylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands / S. Selleri, F. Bruni, C. Costagli, A. Costanzo, G. Guerrini, G. Ciciani, B. Costa, C. Martini // Bioorg Med Chem. – 2001. – V. 9. – № 10. – P. 2661-2671.

171. Lan, N. The TSPO-specific Ligand PK-11195 Protects Against LPS-Induced Cognitive Dysfunction by Inhibiting Cellular Autophagy / N. Lan, Y. Liu, Z. Juan, R. Zhang, B. Ma, K. Xie, L. Sun, H. Feng, M. Sun, J. Liu // Front Pharmacol. – 2021. – V. 11. – P. 615543.

172. Anzini, M. Mapping and fitting the peripheral benzodiazepine receptor binding site by carboxamide derivatives. Comparison of different approaches to quantitative ligand-receptor interaction modeling / M. Anzini, A. Cappelli, S. Vomero, M. Seeber, M.C. Menziani, T. Langer, B. Hagen, C. Manzoni, J.J. Bourguignon // J Med Chem. – 2001. – V. 44. – № 8. – P. 1134-1150.

173. Blair, A. A novel ^{18}F-labelled high affinity agent for PET imaging of the translocator protein / A. Blair, F. Zmuda, G. Malviya, A.A.S. Tavares, G.D. Tamagnan, A.J. Chalmers, D. Dewar, S.L. Pimlott, A. Sutherland // Chem Sci. – 2015. – V. 6. – № 8. – P. 4772-4777.

174. Belloli, S. Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration / S. Belloli, R.M. Moresco, M. Matarrese, G. Biella, F. Sanvito, P. Simonelli, E. Turolla, S. Olivieri, A. Cappelli, S. Vomero, M. Galli-Kienle, F. Fazio // Neurochem Int. – 2004. – V. 4. – № 6. – P. 433-440.

175. Chauveau, F. Have (R)-[^{11}C]PK-11195 challengers fulfilled the promise? A scoping review of clinical TSPO PET studies / F. Chauveau, G. Becker, H. Boutin // Eur J Nucl Med Mol Imaging. – 2021. – V. 49. – № 1. – P. 201-220.

176. Venneti, S. Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain / S. Venneti, B.J. Lopresti, C.A. Wiley // Glia. – 2013. – V. 61. – № 1. – P. 10-23.

177. Salerno, S. TSPO Radioligands for Neuroinflammation: An Overview / S. Salerno, M. Viviano, E. Baglini, V. Poggetti, D. Giorgini, J. Castagnoli, E. Barresi, S. Castellano, F. Da Settimo, S. Taliani // Molecules. – 2024. – V. 29. – № 17. – P. 4212.

178. Bartels, A.L. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK-11195 PET / A.L. Bartels, K.L. Leenders // Mov Disord. – 2007. – V. 22. – № 13. – P. 1852-1856.

179. Bartels, A.L. [11C]-PK-11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? / A.L. Bartels, A.T. Willemsen, J. Doorduin, E.F. de Vries, R.A. Dierckx, K.L. Leenders // Parkinsonism Relat Disord. – 2010. – V. 16. – № 1. – P. 57-59.

180. Benavides, J. Un domaine spécifique (site omega 1) du récepteur GABA(A) pourrait être impliqué dans les effets hypnotiques du zolpidem [A specific domain (the omega 1 site) of the GABA(A) receptor may be implicated in the hypnotic effects of zolpidem] / J. Benavides, H. Depoortere, D. Sanger, G. Perrault, S. Arbilla, S.Z. Langer, B. Zivkovic, B. Scatton // Encephale. – 1990. – V. 16. – № 1. – P. 13-22.

181. Kaplan, J-P. Imidazo[1,2-a] pyridine derivatives and their application as pharmaceuticals / J-P. Kaplan, P. George // Патент США № 4382938 A (дата приоритета 21.10.1981): сайт – URL https://patents.google.com/patent/US4382938A/ru (дата обращения 20.02.2026).

182. Baty, V. Hépatite imputable à l'alpidem (Ananxyl). Quatre cas dont un mortel [Hepatitis induced by alpidem (Ananxyl). Four cases, one of them fatal] / V. Baty, B. Denis, C. Goudot, V. Bas, P. Renkes, M.A. Bigard, P. Boissel, P. Gaucher // Gastroenterol Clin Biol. – 1994. – V. 18. – № 12. – P. 1129-1131.

183. Berson, A. Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation / A. Berson, V. Descatoire, A. Sutton, D. Fau, B. Maulny, N. Vadrot, G. Feldmann, B. Berthon, T. Tordjmann, D. Pessayre // J Pharmacol Exp Ther. – 2001. – V. 299. – № 2. – P. 793-800.

184. Durand, A. Comparative pharmacokinetic profile of two imidazopyridine drugs: zolpidem and alpidem / A. Durand, J.P. Thénot, G. Bianchetti, P.L. Morselli // Drug Metab Rev. – 1992. – V. 24. – № 2. – P. 239-266.

185. Trapani, G. Structure-activity relationships and effects on neuroactive steroid synthesis in a series of 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide peripheral benzodiazepine receptors ligands / G. Trapani, V. Laquintana, N. Denora, A. Trapani, A. Lopedota, A. Latrofa, M. Franco, M. Serra, M.G. Pisu, I. Floris, E. Sanna, G. Biggio, G. Liso // J Med Chem. – 2005. – V. 48. – № 1. – P. 292-305.

186. Okubo, T. Design, synthesis and structure-affinity relationships of aryloxyanilide derivatives as novel peripheral benzodiazepine receptor ligands / T. Okubo, R. Yoshikawa, S. Chaki, S. Okuyama, A. Nakazato // Bioorg Med Chem. – 2004. – V. 12. – № 2. – P. 423-438.

187. Okuyama, S. Neuropharmacological profile of peripheral benzodiazepine receptor agonists, DAA1097 and DAA1106 / S. Okuyama, S. Chaki, R. Yoshikawa, S. Ogawa, Y. Suzuki, T. Okubo, A. Nakazato, M. Nagamine, K. Tomisawa // Life Sci. – 1999. – V. 64. – № 16. – P. 1455-1464.

188. Chaki, S. Binding characteristics of [3H]DAA1106, a novel and selective ligand for peripheral benzodiazepine receptors / S. Chaki, T. Funakoshi, R. Yoshikawa, S. Okuyama, T. Okubo, A. Nakazato, M. Nagamine, K. Tomisawa // Eur J Pharmacol. – 1999. – V. 371. – № 2-3. – P. 197-204.

189. Romeo, E. 2-Aryl-3-indoleacetamides (FGIN-1): a new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor (MDR) / E. Romeo, J. Auta, A.P. Kozikowski, D. Ma, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti // J Pharmacol Exp Ther. – 1992. – V. 262. – № 3. – P. 971-978.

190. Romeo, E. Stimulation of brain steroidogenesis by 2-aryl-indole-3-acetamide derivatives acting at the mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex / E. Romeo, S. Cavallaro, A. Korneyev, A.P. Kozikowski, D. Ma, A. Polo, E. Costa, A. Guidotti // J Pharmacol Exp Ther. – 1993. – V. 267. – № 1. – P. 462-471.

191. Chen, F. Acute effects of the translocator protein drug ligand FGIN-1-27 on serum testosterone and luteinizing hormone levels in male Sprague-Dawley rats / F. Chen, H. Lu, P. Chen, X. Zhao, X. Guan, Q. Liang, B.R. Zirkin, L. Ye, H. Chen // Biol Reprod. – 2019. – V. 100. – № 3. – P. 824-832.

192. Pike, V.W. Evaluation of novel N1-methyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides as a new chemotype of 18 kDa translocator protein-selective ligand suitable for the development of positron emission tomography

radioligands / V.W. Pike, S. Taliani, T.G. Lohith, D.R. Owen, I. Pugliesi, E. Da Pozzo, J. Hong, S.S. Zoghbi, R.N. Gunn, C.A. Parker, E.A. Rabiner, M. Fujita, R.B. Innis, C. Martini, F. Da Settimo // J Med Chem. – 2011. – V. 54. – № 1. – P. 366-373.

193. Costa, B. Anxiolytic properties of a 2-phenylindolglyoxylamide TSPO ligand: Stimulation of in vitro neurosteroid production affecting GABAA receptor activity / B. Costa, E. Da Pozzo, B. Chelli, N. Simola, M. Morelli, M. Luisi, M. Maccheroni, S. Taliani, F. Simorini, F. Da Settimo, C. Martini // Psychoneuroendocrinology. – 2011. – V. 36. – № 4. – P. 463-472.

194. Wang, D.S. Anxiolytic-like effects of translocator protein (TSPO) ligand ZBD-2 in an animal model of chronic pain / D.S. Wang, Z. Tian, Y.Y. Guo, H.L. Guo, W.B. Kang, S. Li, Y.T. Den, X.B. Li, B. Feng, D. Feng, J.N. Zhao, G. Liu, M.G. Zhao // Mol Pain. 2015. – V. 11. P. 16.

195. Li, X.B. Antidepressant-like effects of translocator protein (18 kDa) ligand ZBD-2 in mouse models of postpartum depression / X.B. Li, A. Liu, L. Yang, K. Zhang, Y.M. Wu, M.G. Zhao, S.B. Liu // Mol Brain. – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 12.

196. Midzak, A. Structure-activity relationship (SAR) analysis of a family of steroids acutely controlling steroidogenesis / A. Midzak, G. Rammouz, V. Papadopoulos // Steroids. – 2012. – V. 77. – № 13. – P. 1327-1334.

197. Li, Y. The mitochondrial TSPO ligand Atriol mitigates metabolic-associated steatohepatitis by downregulating CXCL1 / Y. Li, L. Chen, C. Sottas, M.C. Raul, N.D. Patel, J.R. Bijja, S.K. Ahmed, A. Kapelanski-Lamoureux, A. Lazaris, P. Metrakos, A. Zambidis, S. Chopra, M. Li, G. Sugahara, T. Saito, V. Papadopoulos // Metabolism. – 2024. – V. 159. – P. 155942.

198. Kuch, H. 2-amino-4,4-di-substituted-4h-3,1-benzoxazines / H. Kuch, K. Schmitt, G. Seidl, I. Hoffmann // Патент США № 3725404 A (дата приоритета 09.06.1971): сайт – URL https://patents.google.com/patent/US3725404A (дата обращения 20.02.2026).

199. Besnier, N. Étifoxine: études cliniques récentes / N. Besnier, O. Blin // L'Encéphale. – 2008. – V. 34. – № 1. – P. S9-14.

200. Hamon, A. The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit / A. Hamon, A. Morel, B. Hue, M. Verleye, J.M. Gillardin // Neuropharmacology. – 2003. – V. 45. – № 3. – P. 293-303.

201. Verleye, M. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain / M. Verleye, Y. Akwa, P. Liere, N. Ladurelle, A. Pianos, B. Eychenne, M. Schumacher, J.M. Gillardin // Pharmacol Biochem Behav. – 2005. – V. 82. – № 4. – P. 712-720.

202. Choi, Y.M. Etifoxine for pain patients with anxiety / Y.M. Choi, K.H. Kim // Korean J Pain. – 2015. – V. 28. – № 1. – P. 4-10.

203. Европейское медицинское агентство: сайт – URL https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/etifoxine-containing-medicinal-products (дата обращения 20.02.2026).

204. Cottin, J. Safety profile of etifoxine: A French pharmacovigilance survey / J. Cottin, A. Gouraud, M.J. Jean-Pastor, A.D. Dautriche, C. Boulay, H. Geniaux, M. Auffret, N. Bernard, J. Descotes, T. Vial // Fundam Clin Pharmacol. – 2016. – V. 30. – № 2. – P. 147-152.

205. Ferzaz, B. SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair / B. Ferzaz, E. Brault, G. Bourliaud, J.P. Robert, G. Poughon, Y. Claustre, F. Marguet, P. Liere, M. Schumacher, J.P. Nowicki, J. Fournier, B. Marabout, M. Sevrin, P. George, P. Soubrie, J. Benavides, B. Scatton // J Pharmacol Exp Ther. – 2002. – V. 301. – № 3. – P. 1067-1078.

206. Dose-effect of SSR180575 in Diabetic Neuropathy ClinicalTrials.gov identifier: NCT00502515(Clinical trials ID NCT00502515): сайт – URL https://clinicaltrials.gov/study/NCT00502515 (дата обращения 20.02.2026).

207. Kita, A. Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand / A. Kita, H. Kohayakawa, T. Kinoshita, Y. Ochi, K. Nakamichi, S. Kurumiya, K. Furukawa, M. Oka // Br J Pharmacol. – 2004. – V. 142. – № 7. – P. 1059-1072.

208. Kita, A. Lack of tolerance to anxiolysis and withdrawal symptoms in mice repeatedly treated with AC-5216, a selective TSPO ligand / A. Kita, T. Kinoshita, H. Kohayakawa, K. Furukawa, A. Akaike // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2009. – V. 33. – № 6. – P. 1040-1045.

209. Maintenance Chemotherapy or Observation Following Induction Chemotherapy and Radiation Therapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Ependymoma (Clinical trials ID NCT01096368): сайт – URL https://clinicaltrials.gov/study/NCT01096368 (дата обращения 20.02.2026).

210. Holzschneider, K. Neuroimaging in anxiety disorders / K. Holzschneider, C. Mulert // Dialogues Clin Neurosci. – 2011. – V. 13. – № 4. – P. 453-461.

211. Sokias, R. Determination and reduction of translocator protein (TSPO) ligand rs6971 discrimination / R. Sokias, E.L. Werry, S.W. Chua, T.A. Reekie, L. Munoz, E.C.N. Wong, L.M. Ittner, M. Kassiou // Medchemcomm. – 2016. – V. 8. – № 1. – P. 202-210.

212. Baulieu, E.E. Neurosteroids: beginning of the story / E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher // Int Rev Neurobiol. – 2001. – V. 46. – P. 1-32.

213. Churchill, P.F. Topological studies of cytochromes P-450scc and P-45011 beta in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. Effects of controlled tryptic digestion / P.F. Churchill, T. Kimura // J Biol Chem. – 1979. – V. 254. – № 20. – P. 10443-10448.

214. Maguire, J. Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress / J. Maguire, I. Mody // J Neurosci. – 2007. – V. 27. – № 9. – P. 2155-2162.

215. Paul, S.M. Allopregnanolone: From molecular pathophysiology to therapeutics. A historical perspective / S.M. Paul, G. Pinna, A. Guidotti // Neurobiol Stress. – 2020. – V. 12. – P. 100215.

216. Lloyd-Evans, E. Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease / E. Lloyd-Evans, H. Waller-Evans // Essays Biochem. – 2020. – V. 64. – № 3. – P. 591-606.

217. Riebel, M. Neurosteroids and translocator protein 18 kDa (TSPO) ligands as novel treatment options in depression / M. Riebel, L.M. Brunner, C. Nothdurfter, S. Wein, J. Schwarzbach, P. Liere, M. Schumacher, R. Rupprecht // Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. – 2025. – V. 275. – № 6. – P. 1581-1591.

218. Frye, C.A. Neurosteroids' effects and mechanisms for social, cognitive, emotional, and physical functions / Psychoneuroendocrinology. – 2009. – V. 34. – № (Suppl 1). – P. 143-161.

219. Girdler, S.S. Neurosteroids in the context of stress: implications for depressive disorders / S.S. Girdler, R. Klatzkin // Pharmacol Ther. – 2007. – V. 116. – № 1. – P. 125-139.

220. Ratner, M.H. Neurosteroid Actions in Memory and Neurologic/Neuropsychiatric Disorders / M.H. Ratner, V. Kumaresan, D.H. Farb // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – V. 10. – P. 169.

221. Reddy, D.S. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders / D.S. Reddy, W.A. Estes // Trends Pharmacol Sci. – 2016. – V. 37. – № 7. – P. 543-561.

222. Maguire, J.L. Neurosteroids: mechanistic considerations and clinical prospects / J.L. Maguire, S. Mennerick // Neuropsychopharmacology. – 2024. – V. 49. – № 1. – P. 73-82.

223. Lloyd-Evans, E. Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease / E. Lloyd-Evans, H. Waller-Evans // Essays Biochem. – 2020. – V. 64. – № 3. – P. 591-606.

224. Borowicz, K.K. Neuroprotective actions of neurosteroids / K.K. Borowicz, B. Piskorska, M. Banach, S.J. Czuczwar // Front Endocrinol (Lausanne). – 2011. – V. 2. – P. 50.

225. Diviccaro, S. Allopregnanolone: An overview on its synthesis and effects / S. Diviccaro, L. Cioffi, E. Falvo, S. Giatti, R.C. Melcangi // J Neuroendocrinol. – 2022. – V. 34. – № 2. – P. e12996.

226. Zamora-Sánchez, C.J. Allopregnanolone: Metabolism, Mechanisms of Action, and Its Role in Cancer / C.J. Zamora-Sánchez, I. Camacho-Arroyo // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 24. – № 1. – P. 560.

227. Irwin, R.W. Frontiers in therapeutic development of allopregnanolone for Alzheimer's disease and other neurological disorders / R.W. Irwin, C.M. Solinsky, R.D. Brinton // Front Cell Neurosci. – 2014. – V. 8. – P. 203.

228. Bitran, D. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors / D. Bitran, M. Shiekh, M. McLeod // J Neuroendocrinol. – 1995. – V. 7. – № 3. – P. 171-177.

229. Akwa, Y. The amygdala mediates the anxiolytic-like effect of the neurosteroid allopregnanolone in rat / Y. Akwa, R.H. Purdy, G.F. Koob, K.T. Britton // Behav Brain Res. – 1999. – V. 106. – № 1-2. – P. 119-125.

230. Pinna, G. In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine / G. Pinna, E. Dong, K. Matsumoto, E. Costa, A.Guidotti // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100. – № 4. – P. 2035-2040.

231. Frye, C.A. The neurosteroid 3 alpha, 5 apha-THP has antiseizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy / Brain Res. – 1995. – V. 696. – № 1-2. – P. 113-120.

232. Kavaliers, M. Analgesic effects of the progesterone metabolite, 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one, and possible modes of action in mice / M. Kavaliers, J.P. Wiebe // Brain Res. – 1987. – V. 415. – № 2. – P. 393-398.

233. Girdler, S.S. Neurosteroids in the context of stress: implications for depressive disorders / S.S. Girdler, R. Klatzkin // Pharmacol Ther. – 2007. – V. 116. – № 1. – P. 125-139.

234. Smith, G.B. Functional domains of GABAA receptors / G.B. Smith, RW. Olsen // Trends Pharmacol Sci. – 1995. – V. 16. – № 5. – P. 162-168.

235. Olsen, R.W. GABAA-benzodiazepine receptors: demonstration of pharmacological subtypes in the brain / R.W. Olsen, M. Bureau, S. Endo, G. Smith, L. Deng, D. Sapp, A.J. Tobin // Adv Exp Med Biol. – 1991. – V. 287. – P. 355-364.

236. Wohlfarth, K.M. Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit / K.M. Wohlfarth, M.T. Bianchi, R.L. Macdonald // J Neurosci. – 2002. – V. 22. – № 5. – P. 1541-1549.

237. Reddy, D.S. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials / Prog Brain Res. – 2010. – V. 186. – P. 113-137.

238. Meltzer-Brody, S. Brexanolone injection in post-partum depression: two multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials / S. Meltzer-Brody, H. Colquhoun, R. Riesenberg, C.N. Epperson, K.M. Deligiannidis, D.R. Rubinow, H. Li, A.J. Sankoh, C. Clemson, A. Schacterle, J. Jonas, S. Kanes // Lancet. – 2018. – V. 392. – № 10152. – P. 1058-1070.

239. Стратегия оценки и смягчения рисков, REMS: сайт - URL: https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/risk-evaluation-and-mitigation-strategies-rems (дата обращения 20.02 2026).

240. Clayton, A.H. Zuranolone for the Treatment of Adults With Major Depressive Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Phase 3 Trial / A.H. Clayton, R. Lasser, S.V. Parikh, D.V. Iosifescu, J. Jung, M. Kotecha, F. Forrestal, J. Jonas, S.J. Kanes, J. Doherty // Am J Psychiatry. – 2023. – V. 180. – № 9. – P. 676-684.

241. Всемирная организация здравоохранения. International Classification of Diseases 11th Revision (ICD-11): сайт -. URL: https://icd.who.int/ (дата обращения: 20.02.2026).

242. Maj, M. The clinical characterization of the adult patient with depression aimed at personalization of management / M. Maj, D.J. Stein, G. Parker, M. Zimmerman, G.A. Fava, M. De Hert, K. Demyttenaere, R.S. McIntyre, T. Widiger, H.U. Wittchen // World Psychiatry. – 2020. – V. 19. – № 3. – P. 269-293.

243. Gunduz-Bruce, H. SAGE-217 in major depressive disorder: A multicenter, randomized, double-blind, Phase 2 placebo-controlled trial / H. Gunduz-Bruce, C. Silber, A. Rothschild, R. Riesenberg, A. Sankoh, H. Li, E. Li, C. Zorumski, D. Rubinow, S. Paul, J. Jonas, J. Doherty, S. Kanes // European Neuropsychopharmacology. 2019. – V. 29. – № 1. – P. S59-60.

244. Althaus, A.L. Preclinical characterization of zuranolone (SAGE-217), a selective neuroactive steroid $GABA_A$ receptor positive allosteric modulator / A.L. Althaus, M.A. Ackley, G.M. Belfort, S.M. Gee, J. Dai, D.P. Nguyen, T.M. Kazdoba, A. Modgil, P.A. Davies, S.J. Moss, F.G. Salituro, E. Hoffmann, R.S. Hammond, A.J. Robichaud, M.C. Quirk, J.J. Doherty // Neuropharmacology. – 2020. – V. 181. – P. 108333.

245. Управление по контролю за продуктами и лекарствами США, FDA: сайт - URL: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-oral-treatment-postpartum-depression (дата обращения 20.02 2026).

246. Европейское медицинское агентство: сайт - URL: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zurzuvae (дата обращения 20.02.2026).

247. Study of Adjunctive Ganaxolone Treatment in Children and Young Adults With CDKL5 Deficiency Disorder (Marigold) (Clinical trials ID NCT03572933): сайт – URL https://clinicaltrials.gov/study/NCT03572933 (дата обращения 20.02.2026).

248. Knight, E.M.P. Marigold Trial Group. Safety and efficacy of ganaxolone in patients with CDKL5 deficiency disorder: results from the double-blind phase of a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / E.M.P. Knight, S. Amin, N. Bahi-Buisson, T.A. Benke, J.H. Cross, S.T. Demarest, H.E. Olson, N. Specchio, T.R. Fleming, A.A. Aimetti, M. Gasior, O. Devinsky // Lancet Neurol. – 2022. – V. 21. – № 5. – P. 417-427.

249. Nohria, V. Ganaxolone / V. Nohria, E. Giller // Neurotherapeutics. – 2007. – V. 4. – № 1. – P. 102-105.

250. Yasmen, N. Ganaxolone for management of seizures associated with CDKL5 deficiency disorder / N. Yasmen, M.N. Sluter, Y. Yu, J. Jiang // Trends Pharmacol Sci. – 2023. – V. 44. – № 2. – P. 128-129.

251. Gasior, M. Intravenous Ganaxolone: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety, and Tolerability in Healthy Adults / M. Gasior, A. Husain, M.E. Barra, S.M. Raja, D. MacLeod, J.T. Guptill, H. Vaitkevicius, E. Rybak // Clin Pharmacol Drug Dev. – 2024. – V. 13. – № 3. – P. 248-258.

252. Список федерально контролируемых препаратов в США (Список V): сайт – URL https://www.deadiversion.usdoj.gov/schedules/schedules.html (дата обращения 20.02.2026).

253. Whittem, T. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of alfaxalone in cats after single and multiple intravenous administration of Alfaxan at clinical and supraclinical doses / T. Whittem, K.S. Pasloske, M.C. Heit, M.G. Ranasinghe // J Vet Pharmacol Ther. – 2008. – V. 31. – № 6. – P. 571-579.

254. Warne, L.N. A review of the pharmacology and clinical application of alfaxalone in cats / L.N. Warne, T. Beths, T. Whittem, J.E. Carter, S.H. Bauquier // Vet J. – 2015. – V. 203. – № 2. – P. 141-148.

255. Harrison, N.L. A steroid anesthetic prolongs inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons / N.L. Harrison, S. Vicini, J.L. Barker // J Neurosci. – 1987. – V. 7. – № 2. – P. 604-609.

256. Seo, J.I. Cardiopulmonary and anesthetic effects of the combination of butorphanol, midazolam and alfaxalone in Beagle dogs / J.I. Seo, S.H. Han, R. Choi, J. Han, L. Lee, C. Hyun // Vet Anaesth Analg. – 2015. – V. 42. – № 3. – P. 304-308.

257. Muir, W. The cardiorespiratory and anesthetic effects of clinical and supraclinical doses of alfaxalone in cats / W. Muir, P. Lerche, A. Wiese, L. Nelson, K. Pasloske, T. Whittem // Vet Anaesth Analg. – 2009. – V. 36. – № 1. – P. 42-54.

258. Arenillas, M. Anaesthetic effects of alfaxalone administered intraperitoneally alone or combined with dexmedetomidine and fentanyl in the rat / M. Arenillas, I.A. Gomez de Segura // Lab Anim. – 2018. – V. 52. – № 6. – P. 588-598.

259. Lancel, M. Allopregnanolone affects sleep in a benzodiazepine-like fashion / M. Lancel, J. Faulhaber, T. Schiffelholz, E. Romeo, F. Di Michele, F. Holsboer, R. Rupprecht // J Pharmacol Exp Ther. – 1997. – V. 282. – № 3. – P. 1213-1218.

260. Chakrabarty, R.P. Beyond ATP, new roles of mitochondria / R.P. Chakrabarty, N.S. Chandel // Biochem (Lond). – 2022. – V. 44. – № 4. – P. 2-8.

261. Nath, S. Integration of demand and supply sides in the ATP energy economics of cells / Biophys Chem. – 2019. – V. 252. – P. 106208.

262. Ballinger, S.W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease / Free Radic Biol Med. – 2005. – V. 38. – № 10. – P. 1278-95.

263. Fernández, A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity / A. Fernández, L. Llacuna, J.C. Fernández-Checa, A. Colell // J Neurosci. – 2009. – V. 29. – № 20. – P. 6394-6405.

264. Nunnari, J. Mitochondria: in sickness and in health / J. Nunnari, A. Suomalainen //Cell. – 2012. – V. 148. – № 6. – P. 1145-1159.

265. Scarf, A.M. The translocator protein (18 kDa): central nervous system disease and drug design / A.M. Scarf, L.M. Ittner, M. Kassiou // J Med Chem. – 2009. – V. 52. – № 3. – P. 581-592.

266. Gatliff, J. A role for TSPO in mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and redox stress signaling / J. Gatliff, D.A. East, A. Singh, M.S. Alvarez, M. Frison, I. Matic, C. Ferraina, N. Sampson, F. Turkheimer, M. Campanella // Cell Death Dis. – 2017. – V. 8. – № 6. – P. e2896.

267. Šileikytė, J. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)) / J. Šileikytė, E. Blachly-Dyson, R. Sewell, A. Carpi, R. Menabò, F. Di Lisa, F. Ricchelli, P. Bernardi, M. Forte // J Biol Chem. – 2014. – V. 289. – № 20. – P. 13769-13781.

268. Tabata Fukushima, C. Reactive oxygen species generation by reverse electron transfer at mitochondrial complex I under simulated early reperfusion conditions / C. Tabata Fukushima, I.S. Dancil, H. Clary, N. Shah, S.M. Nadtochiy, P.S. Brookes // Redox Biol. – 2024. – V. 70. – P. 103047.

269. Seidlmayer, L.K. PK-11195 Protects From Cell Death Only When Applied During Reperfusion: Succinate-Mediated Mechanism of Action / L.K. Seidlmayer, B.J. Hanson, P.N. Thai, S. Schaefer, D.M. Bers, E.N. Dedkova // Front Physiol. – 2021. – V. 12. – P. 628508.

270. Maaser, K. Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells / K. Maaser, M. Höpfner, A. Jansen, G. Weisinger, M. Gavish, A.P. Kozikowski, A. Weizman, P. Carayon, E.O. Riecken, M. Zeitz, H. Scherübl // Br J Cancer. – 2001. – V. 85. – № 11. – P. 1771-1780.

271. Tanimoto, Y. Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential / Y. Tanimoto, Y. Onishi, Y. Sato, H. Kizaki // Jpn J Pharmacol. – 1999. – V. 79. – № 2. – P. 177-183.

272. Azarashvili, T. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca^{2+}-induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria / T. Azarashvili, D. Grachev, O. Krestinina, Y. Evtodienko, I. Yurkov, V. Papadopoulos, G. Reiser // Cell Calcium. – 2007. – V. 42. – № 1. – P. 27-39.

273. Yousefi, O.S. The 1,4-benzodiazepine Ro5-4864 (4-chlorodiazepam) suppresses multiple pro-inflammatory mast cell effector functions / O.S. Yousefi, T. Wilhelm, K. Maschke-Neuß, M. Kuhny, C. Martin, G.J. Molderings, F. Kratz, B. Hildenbrand, M. Huber // Cell Commun Signal. – 2013. – V. 11. – № 1. – P. 13.

274. Biswas, L. TSPO Ligands Promote Cholesterol Efflux and Suppress Oxidative Stress and Inflammation in Choroidal Endothelial Cells / L. Biswas, F. Farhan, J. Reilly, C. Bartholomew, X.Shu // Int J Mol Sci. – 2018. – V. 19. – № 12. – P. 3740.

275. Li, M. A TSPO ligand attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage / M. Li, H. Ren, K.N. Sheth, F.D. Shi, Q. Liu // FASEB J. – 2017. – V. 31. – № 8. – P. 3278-3287.

276. Palzur, E. Etifoxine Restores Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Improves Cognitive Recovery Following Traumatic Brain Injury / E. Palzur, D. Edelman, R. Sakas, J.F. Soustiel // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22. – № 23. – P. 12881.

277. Girard, P. Preventive and curative effects of etifoxine in a rat model of brain oedema / P Girard, Y Pansart, JM.Gillardin // Clin Exp Pharmacol Physiol. – 2009. – V. 36. – № 7. – P. 655-661.

278. Zhang, S. FGIN-1-27 Mitigates Radiation-induced Mitochondrial Hyperfunction and Cellular Hyperactivation in Cultured Astrocytes / S. Zhang, Z. Deng, Y. Qiu, G. Lu, J. Wu, H. Huang // Neuroscience. – 2023. – V. 535. – P. 23-35.

279. Yeh, P.S. Structural Insights into the Binding and Degradation Mechanisms of Protoporphyrin IX by the Translocator Protein TSPO / P.S. Yeh, C.C. Li, Y.S. Lu, Y.W. Chiang // JACS Au. – 2023. – V. 3. – № 10. – P. 2918-2929.

280. Zhao, A.H. Mitochondrial Translocator Protein (TSPO) Function Is Not Essential for Heme Biosynthesis / A.H. Zhao, L.N. Tu, C. Mukai, M.P. Sirivelu, V.V. Pillai, K. Morohaku, R. Cohen, V. Selvaraj // J Biol Chem. – 2016. – V. 291. – № 4. – P. 1591-1603.

281. Langer, S.Z. Zolpidem and alpidem: two imidazopyridines with selectivity for omega 1- and omega 3-receptor subtypes / S.Z. Langer, S. Arbilla, J. Benavides, B. Scatton // Adv Biochem Psychopharmacol. – 1990. – V. 46. – P. 61-72.

282. Morton. S. Studies with alpidem in normal volunteers and anxious patients / S. Morton, M. Lader // Pharmacopsychiatry. – 1990. – V. 23. – №. 3. – P. 120-123.

283. Morselli, P.L. On the therapeutic action of alpidem in anxiety disorders: an overview of the European data /Pharmacopsychiatry. – 1990. – V. 23. – №. 3. – P. 129-134.

284. Bhachoo, J. Investigating Protein–Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite / J. Bhachoo, T. Beuming // In Modeling Peptide-Protein Interactions. Eds. O. Schueler-Furman, N. London. NY, USA: Humana Press. – 2017. – P. 235–254.

285. Sastry, G.M. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments / G.M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman // Journal of Computer-Aided Molecular Design. – 2013. – V. 27. – P. 221–234.

286. Service at the European Bioinformatics Institute web-server. Available online: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html дата обращения 14.05 2020.

287. Anderson, G.W. The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis / G.W. Anderson, J.E. Zimmerman // Journal of the American Chemical Society. – 1964. – – V. 86. – № 9. – P.1839-1842.

288. Позднев В.Ф. Применение ди-трет-бутилпирокарбоната для получения N-трет-бутилоксикарбонильных производных аминокислот / Химия природных соединений. – 1974. – Т. 10. – № 6. – С. 764-767.

289. Belzung, C. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review / C. Belzung, G. Griebel // Behav Brain Res. – 2001. – V. 125. – № 1-2. – P. 141-149.

290. Arabo, A. Temporal analysis of free exploration of an elevated plus-maze in mice / A. Arabo, C. Potier, G. Ollivier, T. Lorivel, V. Roy // J Exp Psychol Anim Learn Cogn. – 214. – V. 40. – № 4. – P. 457-466.

291. Himanshu. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects / Himanshu, Dharmila, D. Sarkar, Nutan. // Clin Psychopharmacol Neurosci. – 2020. – V. 18. – № 3. – P. 341-351.

292. Borodin, P.M. Problemy genetiki stressa. Soobshchenie I. Geneticheskiĭ analiz povedeniia mysheĭ v stressiruiushcheĭ situatsii [Problems in the genetics of stress. I. Genetic analysis of the behavior of mice in a stressful situation] / P.M. Borodin, L. Shiuler, D.K. Beliaev //Genetika. – 1976. – V. 12. – № 12. – P. 62-71.

293. Середенин, С.Б. Влияние психотропных препаратов на поведение инбредных мышей в условиях открытого поля / С.Б.Середенин, А.А. Ведерников. // Бюлл. Эксп.Биол. Мед. – 1979. – Т. 88. – №. 7. – С. 38-40.

294. Calabrese, E.J. Peptides and hormesis / E.J. Calabrese, L.A. Baldwin // Critical reviews in toxicology. – 2003. – V. 33. – №. 3-4. – P. 355-405.

295. Calabrese, E.J. Hormesis: the dose-response revolution / E.J. Calabrese, L.A. Baldwin //Annual review of pharmacology and toxicology. – 2003. – V. 43. – №. 1. – P. 175-197.

296. Hascoët, M. Anticonflict effect of alpidem as compared with the benzodiazepine alprazolam in rats/ M. Hascoët, M. Bourin // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1997. – V. 56. – №. 2. – P. 317-324.

297. File, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse / Behav Brain Res. – 2001. – V. 125. – № 1-2. – P. 151-157.

298. Kita A. Involvement of neurosteroids in the anxiolytic-like effects of AC-5216 in mice/ A. Kita, K. Furukawa // Pharmacol Biochem Behav. – 2008. – V. 89. – № 2. – P. 171-178.

299. Ennaceur, A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data / A. Ennaceur, J. Delacour // Behav Brain Res. – 1988. – V. 31. – № 1. – P. 47-59.

300. Дорофейкова, М.В. Экспериментальные модели когнитивных нарушений при нейродегенеративных и органических расстройствах / М.В. Дорофейкова, Н.Н. Петрова, А.Ю. Егоров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2020. – Т. 106. – №. 2. – С. 157-175.

301. Verloes, R. Effects of nootropic drugs in a scopolamine-induced amnesia model in mice / R. Verloes, A.M. Scotto, J. Gobert, E. Wülfert // Psychopharmacology (Berl). – 1988. – V. 95. – № 2. – P. 226-230.

302. Porsolt, R.D. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants / R.D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre // Archives Internationales de pharmacodynamie et de therapie. 1977. – V. 229. – № 2. – P. 327-336.

303. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre. // Nature. – 1977. – V. 266. – № 5604. – P. 730-732.

304. Angoa-Pérez, M. Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype / M. Angoa-Pérez, M.J. Kane, D.I. Briggs, N. Herrera-Mundo, C.E. Sykes, D.M. Francescutti, D.M. Kuhn // ACS Chem Neurosci. – 2014. – V. 5. – № 10. – P. 908-919.

305. Lucki, I. Behavioral Despair. In: Stolerman, I.P. (eds) Encyclopedia of Psychopharmacology / Springer, Berlin, Heidelberg. − 2010.

306. Сидоров, К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / Токсикология новых промышленных химических веществ: сб. науч. тр. − М.: [изд-во]. − 1973. — Вып. 13. — С. 47.

307. Schrodinger: сайт – URL: https://www.schrodinger.com/life-science/learn/white papers/docking and scoring (дата обращения 18.02.2020).

308. Wu, Y. 3rd. Flexible CDOCKER: Hybrid Searching Algorithm and Scoring Function with Side Chain Conformational Entropy / Y. Wu, C.L. Brooks // J Chem Inf Model. – 2021. – V. 61. – № 11. – P. 5535-5549.

309. Friesner, R.A. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes / R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz // J Med Chem. – 2006. – V. 49. – № 21. – P. 6177-6196.

310. Zamyatnin, A.A. The EROP-Moscow oligopeptide database / A.A. Zamyatnin, A.S. Borchikov, M.G. Vladimirov, O.L. Voronina // Nucleic acids research. – 2006. – V. 34. – № 1. – P. 261-266.

311. Trott O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / Trott O., Olson A. J. //Journal of computational chemistry. – 2010. – V. 31. – №. 2. – P. 455-461.

312. Zefirov, N.A. Podophyllotoxin esters with alicyclic residues: an insight into the origin of microtubule-curling effect in cancer cells / N.A. Zefirov, A. Glaßl, E.V. Radchenko, A.N. Borovyk, V.V. Stanishevsky, E.R. Milaeva, S.A. Kuznetsov, O.N. Zefirova // Mendeleev Communications. – 2022. – V. 32. – № 2. – P. 173-175.

313. Huang, J. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data / J. Huang, A.D. MacKerell // Journal of Computational Chemistry. – 2013. – V. 34. – № 25. – P. 2135-2145.

314. Vanommeslaeghe, K. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields / K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A.D.Jr. Mackerell // J Comput Chem. – 2010. – V. 31. – № 4. – P. 671-690.

315. Abraham, M.N. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M.N. Abraham. T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. M. Smith, B. Hess, E. Lindahl // SoftwareX. – 2015. – V. 1-2. – P. 19-25.

316. Jackson, G.R. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells / G.R. Jackson, K. Werrbach-Perez, E.L. Ezell, J.F. Post, J.R. Perez-Polo // Brain Res. – 1992. – V. 592. – № 1-2. – P. 239-248.

317. Ueda, Y. A colorimetric assay method for the evaluation of neurotrophic activity in vitro / Y. Ueda, E. Walsh, H. Nakanishi, K. Yoshida // Neurosci Lett. – 1994. – V. 165. – № 1-2. – P. 203-207.

318. Anderson, G.W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent / G.W. Anderson, R.Paul // J. Am. Chem. Soc. – 1960. – V. 82. – № 17. – P. 4596-4600.

319. Geurts, M. N-(benzyloxycarbonyl) glycine esters and amides as new anticonvulsants / M. Geurts, J.H. Poupaert, G.K. Scriba, D.M. Lambert // J Med Chem. – 1998. – V. 41. – №. 1. – P. 24-30.

320. Беккер, Г. Органикум: Практикум по органической химии / Г. Беккер, В. Бергер, Г. Домшке // - М.: МИР. − 1979. – С. 176.

321. Титце, Л. Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории / Л. Титце, Т. Айхер // - М.: МИР. − 1999.

322. Sudipta R. The role of terminal tyrosine residues in the formation of tripeptide nanotubes: a crystallographic insight/ R. Sudipta, G.B.D. Michael, K.D. Apurba, B. Arindam // Tetrahedron. – 2006. – V. 62. – №. 31. – P. 7274-7283

323. Reddy, Ch.M. Towards the total synthesis of halolitoralin-C/ Ch.M. Reddy, V.N.S Murthy, K. Mukkanti, PVR. Acharyulu // Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. – 2007. – V. 46B. – №. 7. – P. 1137-1142.

324. Evans, D.A. Asymmetric, anti-selective scandium-catalyzed Sakurai additions to glyoxyamide. Applications to the syntheses of N-boc D-alloisoleucine and D-isoleucine / D.A. Evans, Y. Aye, J. Wu // Org Lett. – 2006. – V. 8. – № 10. – P. 2071-2073.

325. Mroczkiewicz, M. A new and general method for the synthesis of tripeptide aldehydes based on the multi-component Ugi reaction / Tetrahedron. – 2009. – V. 65. – № 20. – P. 4025-4034.

326. Frankel, M. The preparation of alkyloxycarbonyl amino acids and their N-hydroxysuccinimide esters / M. Frankel, D. Ladkany, C. Gilon, Y. Wolman // Tetrahedron Letters. – 1966. – V. 7. – № 39. – P. 4765-4768.

327. Hassani, M. Novel lavendamycin analogues as antitumor agents: synthesis, in vitro cytotoxicity, structure-metabolism, and computational molecular modeling studies with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 / M. Hassani, W. Cai, D.C. Holley, J.P. Lineswala, B.R. Maharjan, G.R. Ebrahimian, H. Seradj, M.G. Stocksdale, F. Mohammadi, C.C. Marvin, J.M. Gerdes, H.D. Beall, M. Behforouz // J Med Chem. – 2005. – V. 48. – № 24. – P. 7733-7749.

328. Sawayama, T. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: synthesis and biological activity of N-substituted tripeptide inhibitors / T. Sawayama, M. Tsukamoto, T. Sasagawa, K. Nishimura, T. Deguchi, K. Takeyama, K. Hosoki // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 1990. – V. 38. – № 1. – P. 110-115.

329. Yasui, A. Novel C-terminal gastrin antagonists. Synthesis and biological activity / A. Yasui, A.J. Douglas, B. Walker, D.F. Magee, R.F. Murphy // Int J Pept Protein Res. – 1990. – V. 35. – № 4. – P. 301-305.

330. PaQuet, A. Further studies on the use of the thallium salt of N-hydroxysuccinimide for the preparation of succinimidyl esters // Canadian Journal of Chemistry. – 1979. – V. 57. – № 20. – P. 2775-2778.

331. Toumi, M. Total synthesis of the cyclopeptide alkaloid paliurine E. insights into macrocyclization by ene--enamide RCM / M. Toumi, F. Couty, G. Evano // J Org Chem. – 2008. – V. 73. – № 4. – P. 1270-1281.

332. Somlai, C. Efficient, racemization-free amidation of protected amino acids / C. Somlai, G. Szokan, L. Balaspiri // Synthesis. – 1992. – № 3. – P. 285 – 287.

333. Bruno, P. Total synthesis of aeruginazole A / P. Bruno, S. Peña, X. Just-Baringo, F. Albericio, M. Álvarez // Org Lett. – 2011. – V. 13. – № 17. – P. 4648-4651.

334. Chen, S.T. A simple method for amide formation from protected amino acids and peptides / S.T. Chen, S.H. Wu, K.T. Wang // Synthesis. – 1989. – № 1. – P. 37-38.

335. Weina, C. Effect of synthetic oligopeptides on osteoporosis / C. Weina, W. Chao, Z. Ming, P. Shiqi // Prep Biochem Biotechnol. – 2003. – V. 33. – № 3. – P. 217-231.

336. Zeng, B.T. Microwave assisted one-pot synthesis of novel molecular clefts with only one chiral arm based on deoxycholic acid / B.T. Zeng, Z.G. Zhao, X.L. Liu, Y. Shi // Chinese Chemical Letters. – 2008. – V. 19. – № 1. – P. 33-36.

337. Bodanszky, M. Synthesis and some pharmacological properties of [8-L-tryptophan]oxytocin / M. Bodanszky, J.C. Tolle, J. Seto, W.H. Sawyer // J. Med. Chem. – 1980. – V. 23. – № 11. – P. 1259 – 1261.

338. Celik I. Convenient synthesis of C-terminal di- and tri-peptide amides from N-protected dipeptidoylbenzotriazoles / I. Celik, A. Abdel-Fattah // Tetrahedron. – 2009. – V. 65. – № 25.– P. 4923-4929.

339. Mancilla, T. Synthesis and characterization of piperazine-2, 6-diones / T. Mancilla, L. Canillo, L. S. Zamudio-Rivera, H.I. Beltran, N. Farán // Organic preparations and procedures international. – 2002. – V. 34. – № 1. – P. 87-94.

340. Zhou, Z. Asymmetric Reduction of Prochiral Ketones with N- Sulfonylated Amino Alcohols as Catalysts / Z. Zhou, Y.Guo // Synthetic Communications. – 2008. – V. 38. – № 5.– P. 684-696.

341. Bhardwaj, I. Urea-cored peptides for anion binding and vesicle formation / I. Bhardwaj, R. Sapra, V. Haridas. // Arkivoc. – 2016. – № 6.– P. 184-197.

342. Haridas, V. Synthetic minimalistic tryptophan zippers as a chiroptical switch / V. Haridas, S. Sadanandan, S. Dhawan, R. Mishra, I. Jain, G. Goel, Y. Hu, S. Patel // Org Biomol Chem. – 2017. – V. 15. – № 7. – P. 1661-1669.

343. Bereznak, J.F. Preparation of 2, 4-Bis (Methylsulfonyl)-1-naphthyl (BMSN) Active Esters and their Potential Utility in Peptide Bond Formation / J.F. Bereznak, M.M. Joullié // Synthetic Communications. – 1989. – V. 19. – №. 20. – P. 3573-3578.

344. Russell, W.M.S. The principles of humane experimental technique / Russell W.M.S., Burch R.L., Hume C.W. // Methuen London. – 1959.

345. Ramapanicker, R. One‐pot protection and activation of amino acids using pentafluorophenyl carbonates / R. Ramapanicker, N.B.R. Baig, K. De, S. Chandrasekaran. // Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society. – 2009. – V. 15. – №. 12. – P. 849-855

346. Roe, D. R. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data / D.R. Roe, T.E. Cheatham III //Journal of chemical theory and computation. – 2013. – V. 9. – №. 7. – P. 3084-3095.

347. Case, D. A. AmberTools / D. A. Case, H. M. Aktulga, K. Belfon, D. S. Cerutti, G. A. Cisneros, V. W. D. Cruzeiro, N. Forouzesh, T. J. Giese, A. W. Götz, H. Gohlke, S. Izadi, K. Kasavajhala, M. C. Kaymak, E. King, T. Kurtzman, T. S. Lee, P. Li, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Manathunga, M. R. Machado, H. M. Nguyen, K. A. O'Hearn, A. V. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, A. Risheh, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Swails, J. Wang, H. Wei, X. Wu, Y. Wu, S. Zhang, S. Zhao, Q. Zhu, T. E. Cheatham III, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Simmerling, D. M. York, M. C. Nagan, K. M. Merz Jr// Journal of chemical information and modeling. – 2023. – V. 63. – №. 20. – P. 6183-6191.

348. Pettersen, E. F. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin // Journal of computational chemistry. – 2004. – V. 25. – №. 13. – P. 1605-1612.

349. Russell, W.M.S. The principles of humane experimental technique / W.M.S. Russell., R.L. Burch., C.Ц. Hume // Methuen London. – 1959.

350. Pellow, S. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley // J Neurosci Methods. – 1985. – V. 14. – № 3. – P. 149-167.

351. Горелов, П.И. Оценка прокогнитивного эффекта дилепта и его основного метаболита, ГЗР-125, в тесте распознавания объектов у крыс / П.И. Горелов, Р.У. Островская, Н.М. Сазонова // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2013. – Т. 76. – № 7. – С. 3–5.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность научному руководителю член-корреспонденту РАН доктору биологических наук профессору **Гудашевой Татьяне Александровне** за неоценимую помощь в выборе направления исследования, идеи, постоянную поддержку, ценные рекомендации, помощь в подготовке публикаций, терпение и внимание к работе на всех этапах её выполнения.

Выражаю искреннюю благодарность академику РАН **Середенину С.Б**. за организацию фармакологических исследований. Благодарю д.м.н. профессора РАН **Яркову М.А**., к.б.н. в.н.с. **Поварнину П.Ю**., н.с. **Никифорова Д.М**., к.б.н. с.н.с. **Котельникову С.О.** за проведение фармакологических поведенческих экспериментов на животных; с.н.с. к.б.н. **Алексееву С.В.** с сотрудниками за проведение исследований острой токсичности; в.н.с. к.б.н. **Антипову Т.А.** и н.с. **Николаева С.В.** за проведение экспериментов *in vitro*; н.с. **Ребеко А.Г.** за регистрацию и помощь в интерпретации ЯМР спектров; н.с. **Пантилеева А.С.** и к.х.н. асс. кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова **Зефирова Н.А.** за проведение молекулярной динамики и помощь в интерпретации результатов.

Благодарю и.о. генерального директора Центра д.фарм.н. профессора **Дорофеева В.Л.** за заинтересованность и внимание к работе.

Благодарю коллег, сотрудников лаборатории пептидных биорегуляторов, к.б.н. с.н.с. **Колясникову К.Н.**, к.б.н. с.н.с. **Григоркевич О.С.**, к.х.н. с.н.с. **Тарасюка А.В.** за ценные рекомендации по проведению экспериментов и всестороннюю поддержку.