

Транслокаторный белок TSPO 18 кДа и его лиганды: перспективный подход к созданию новых нейропсихотропных средств

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

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. В 2018 году исполняется 41 год с момента открытия Браэстрап и Сквирес транслокаторного белка TSPO 18 кДа, известного до 2006 года под названием «периферический бензодиазепиновый рецептор» (PBR). За это время были подробно исследованы функции этого рецептора, который является важнейшим компонентом наружной мембраны митохондрий. Одной из ключевых функций TSPO является перенос холестерина от внешней к внутренней мембране митохондрий, что является лимитирующей стадией в синтезе нейростероидов. Кроме того, TSPO задействован в транспорте порфиринов, митохондриальном дыхании, открытии митохондриальных пор, апоптозе и пролиферации клеток. Настоящий обзор посвящён рассмотрению современных представлений о структуре TSPO, механизме его участия в нейростероидогенезе и эндогенных и синтетических лигандах TSPO. Особый акцент сделан на анализе подходов к дизайну синтетических лигандов и их нейропсихотропной активности *in vitro* и *in vivo*. Представленный обзор демонстрирует перспективность конструирования новых нейропсихотропных средств в ряду лигандов TSPO.

Ключевые слова: транслокаторный белок TSPO 18 кДа; лиганды TSPO; нейропсихотропная активность; дизайн новых лекарственных средств; нейростероиды

Для цитирования:

Мокров Г.В., Деева О.А., Яркова М.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Транслокаторный белок TSPO 18 кДа и его лиганды: перспективный подход к созданию новых нейропсихотропных средств // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 4. – С. 3–27. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10026.

Translocator protein TSPO 18 kDa and its ligands: a promising approach to the creation of new neuropsychotropic drug

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

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. It is 41 years in 2018 since Braestrup and Squires opened translocator protein 18 kDa TSPO, known until 2006 as the peripheral benzodiazepine receptor (PBR). The functions of this receptor, which is one of the most important component of the outer mitochondrial membrane, have been studied in detail during this time. One of the key functions of TSPO is the transfer of cholesterol from the outer to the inner membrane of mitochondria, which is the limiting step in the synthesis of neurosteroids. In addition, TSPO is involved in porphyrin transport, mitochondrial respiration, the opening of mitochondrial pores, apoptosis and cell proliferation. This review presents the modern views on the structure of TSPO, the mechanism of its participation in neurosteroidogenesis and the endogenous and synthetic ligands of TSPO. Particular emphasis is placed on the analysis of approaches to the design of synthetic ligands and their neuropsychotropic activity *in vitro* and *in vivo*. This review demonstrates the prospects of new neuropsychotropic drugs design among TSPO ligands.

Keywords: Translocator protein TSPO 18 kDa; TSPO ligands; neuropsychotropic activity; design of new drugs; neurosteroids

For citations:

Mokrov GV, Deeva OA, Yarkova MA, Gudasheva TA, Seredenin SB. Translocator protein TSPO 18 kDa and its ligands: a promising approach to the creation of new neuropsychotropic drugs. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;4:3–27. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10026.

Строение и функции 18 кДа транслокаторного белка (TSPO)

Структура TSPO

Транслокаторный белок (18 кДа) (TSPO) — это трансмембранный полипептид, состоящий в зависимости от вида из 153–169 аминокислот, образующих пять спиральных субъединиц (TM-1 — TM-5). TSPO локализуется преимущественно на наружной мембране митохондрий стероидпродуцирующих тканей центральной и периферической нервной системы (рис. 1) [1, 2].

В течение почти трёх десятилетий после открытия TSPO был известен как периферический бензодиазепиновый рецептор (peripheral benzodiazepine receptor, PBR), но в 2006 году в свете понимания его функций, а также изучения его строения был назван транслокаторным белком TSPO [1]. Белок TSPO был выделен

как у эукариотов, так и у прокариотов. При этом аминокислотные последовательности TSPO различных видов имеют различия разной выраженности. На рис. 2 представлены аминокислотные последовательности TSPO человека, мыши, крысы и бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Bacillus cereus*, где цветом отмечены различия относительно последовательности у человека [3].

В 2014 году впервые была определена 3D-структура TSPO мыши (mTSPO) в высоком разрешении в комплексе с классическим лигандом PK11195 методом ЯМР-спектроскопии (идентификатор в Protein Data Bank: 2MGY) (рис. 1) [2]. Структура mTSPO была также опубликована в отсутствие PK11195, при этом было продемонстрировано, что без лиганда белок обладает существенной конформационной гибкостью, в то время как при наличии PK11195 mTSPO принимает одну устойчивую конформацию [2, 4]. В 2015 году была

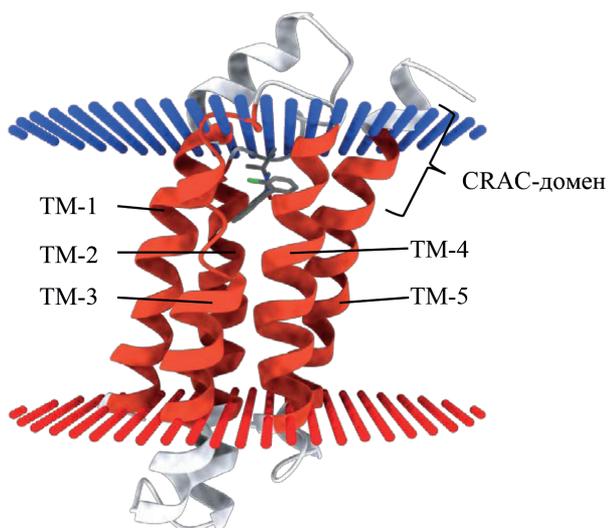


Рис. 1. 3D-структура TSPO мыши в высоком разрешении в комплексе с лигандом PK11195 (идентификатор в Protein Data Bank: 2MGY). PK11195 связывается с центральным гидрофобным сайтом, а холестерин взаимодействует с CRAC-доменом на спирали TM-V. Красным цветом отмечены трансмембранные участки пептидных спиралей TSPO [2]

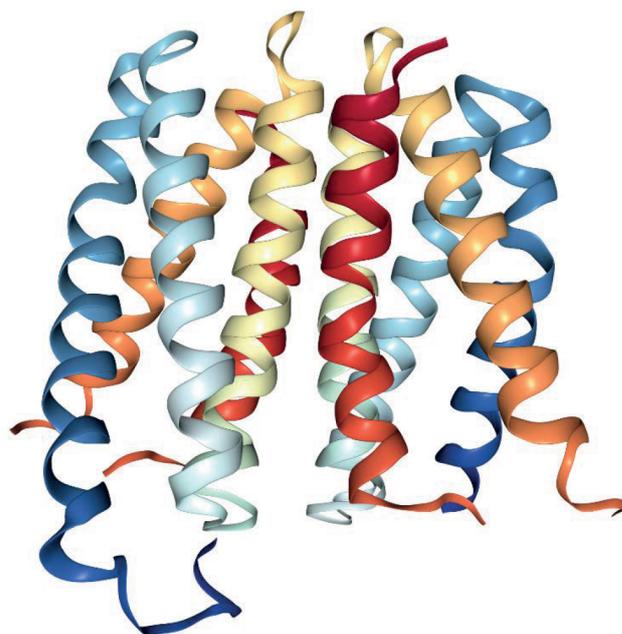


Рис. 3. 3D-структура BcTSPO в комплексе с PK11195 в димерной форме (идентификатор в Proteine Data Bank: 4RYI)

	TM1	TM2		TM3	TM4	TM5	
Человек	MAPPWVPAAGFTLAPSLGCFVGSRFVHGEGLRWYASLQKPSWHPPHWVLGPVWGTLYSAMGYGSYLWVKELGGFTEKAVVPLGLY		85	TGQLALNVAWVPIFFGARQMGWALVDLLLVSGAAATTVAVYQVSPLAARLLYPYLAWLAFATTLNYCVWRDNHGWRRGRRLPE		169	
Мышь	MPESWVPAVGLTLLVPSLGGFMGAYFVRGEGLRWYASLQKPSWHPPRWTLAPITWGTLYSAMGYGSYIWKELGGFTEKAVVPLGLY		85	TGQLALNVAWVPIFFGARQMGWALVDLLLVSGVATATTLAWHRVSPPAARLLYPYLAWLAFATTLNYVWRDNSGRRGGSRRLPE		169	
Крыса	MSQSWVPAVGLTLLVPSLGGFMGAYFVRGEGLRWYASLQKPSWHPPRWTLAPITWGTLYSAMGYGSYIWKELGGFTEKAVVPLGLY		85	TGQLALNVAWVPIFFGARQMGWALVDLLLVSGVATATTLAWHRVSPPAARLLYPYLAWLAFATTLNYVWRDNSGRRGGSRRLPE		169	
<i>R. sphaeroides</i>	MNDWALFLTLAAGAPATTGALLKPD...WDNLNKPWNPPPRWVFLAWTSLYFLMSLAAMRWQLG...SGOALAFY		77	AAQLAFNTLWPTVYFGMKRMATLAVVMVMWLFVAATMWAFFQLDTWAGVLFYPIIWAATATGLNFEAMRLNWNRPEARA...		158	
<i>B. cereus</i>	MFMKKSSITVFLTYGLFYVSSVLEPIDR...TWYDALLEKPSWTPPGMIIIGMIWAVLFGLLALSVALIYNNY...FKPKTFWFLLF		80	LLNYIFNQAFSYFQESQKNLFLATVDCLLVAITTTLLIMFSSNLSKVSAWLPIRYFLWSAFATYLSWTIYSTN...		153	

Рис. 2. Аминокислотные последовательности TSPO человека, мыши, крысы и бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Bacillus cereus*. Цифры в конце строк указывают количество аминокислот в последовательностях. Цветом выделены совпадения в последовательностях аминокислот. Синие зигзаги соответствуют пяти белковым спиральям рецептора TM1-TM5. Взято из [3]

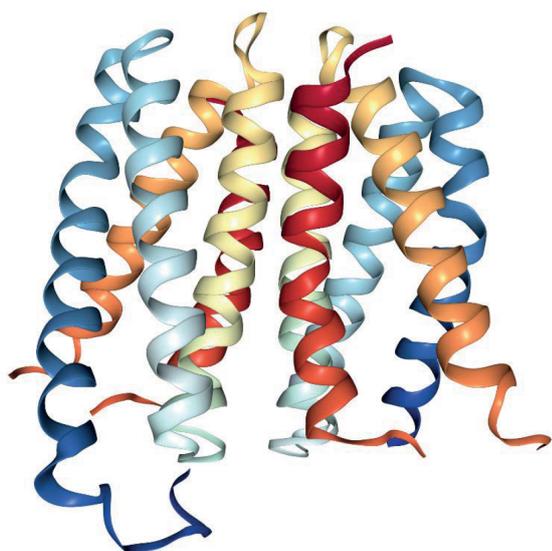


Рис. 4. 3D-структура RsTSPO в димерной форме (идентификатор в Proteine Data Bank: 4UC3)

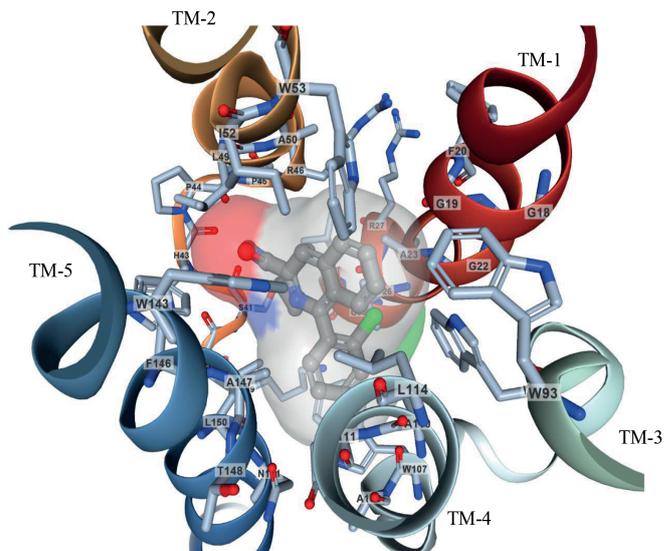


Рис. 5. Положение PK11195 в центральном сайте связывания комплекса mTSPO PK11195

опубликована кристаллическая структура высокого разрешения TSPO *Bacillus cereus* (BcTSPO) в комплексе с PK11195 (идентификатор в Protein Data Bank: 4RYI и 5DUO) (рис. 3) [5], а также кристаллическая структура TSPO *Rhodobacter sphaeroides* (RsTSPO) (идентификатор в Protein Data Bank: 4UC1, 4UC2, и 4UC3) (рис. 4) [6, 7].

Установлено, что в структурах mTSPO, и BcTSPO имеется центральная гидрофобная полость, которая является сайтом 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 (рис. 5) [2].

В структуре комплекса BcTSPO-PK11195 выявлено подобное расположение сайта связывания PK11195 между пептидными спиралями TM-I и TM-II, включающее аминокислотные остатки Ser22, Tyr32, Pro42, Ile47, Phe55, Phe90, Ser91, Gln94, Cys107, Ala142 и Leu145. При этом отмечена возможная роль индольных NH-групп триптофановых остатков Trp51 и Trp138 в образовании водородной связи с карбонильной группой PK11195 [5] (рис. 6).

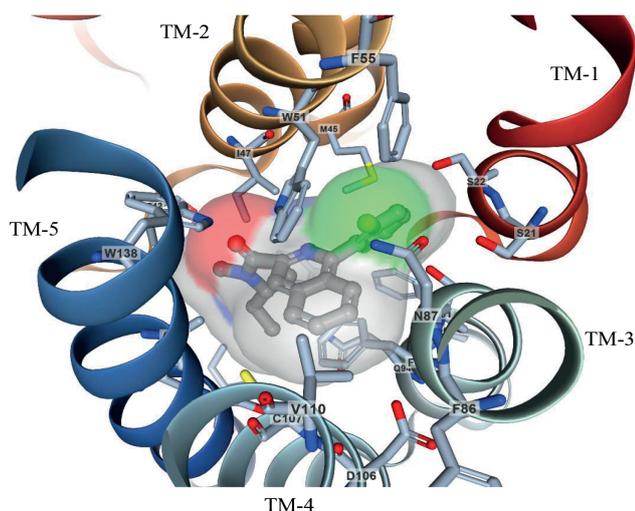


Рис. 6. Положение PK11195 в центральном сайте связывания комплекса BcTSPO PK11195. Водородные связи показаны черным пунктиром, гидрофобные взаимодействия не отмечены

Ещё один сайт связывания находится на CRAC-домене (cholesterol recognition amino acid consensus, аминокислотный участок, распознающий холестерин) спирали TM V (рис. 1). Этот сайт ответственен за связывание холестерина и холестерин-подобных лигандов [8]. Предположительно за связывание с холестерином в CRAC-домене ответственны аминокислотные остатки Tyr152 и Arg156.

Полиморфизм TSPO

В начале 2010-х годов в процессе изучения на людях меченного лиганда TSPO – соединения ¹¹C-PBR28,

использовавшегося для проведения позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ), было установлено, что связывание этого лиганда у разных людей происходит с различной эффективностью [9]. Исследования позволили разделить популяцию людей на три типа: HABs (high-affinity binders, с высоким сродством к TSPO), low-affinity binders (LABs, с низким сродством к TSPO) и mixed-affinity binders (MABs, со смешанным сродством к TSPO). Различия в аффинности лиганда PBR28 по отношению к TSPO для HABs и LABs оказались весьма существенными, константы ингибирования по отношению к ним составили ~4 нМ и ~200 нМ соответственно. В то же время для MABs были определены две константы ингибирования, составляющие ~4 и ~300 нМ. Другие лиганды TSPO, такие как DAA1106, DPA713, PBR06, PBR111, XBD173 также демонстрировали существенное различие в связывании с сайтами связывания TSPO у HABs и LABs [9, 10]. Однако было обнаружено, что лиганд PK11195 не имеет различий в аффинности по отношению к TSPO у HABs и LABs [10]. Было установлено, что различия в аффинитете к TSPO в популяции человека обусловлены полиморфизмом TSPO, а именно, различием аминокислоты в 147-м положении полипептидной цепи этого рецептора [11]. При этом у «основного TSPO» (TSPO wild type, TSPO WT) в этом положении находится аланин, а у «второго типа TSPO» – треонин (TSPO A147T). С целью исследований влияния данного полиморфизма на функции TSPO были получены кристаллические формы TSPO из бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и созданного на его основе мутантного TSPO, имитирующего замену Ala(147) на Thr(147) у TSPO человека [6]. Было установлено, что данная мутация приводит к конформационным изменениям в области спиралей TM-II и TM-V, за счёт чего и возможно изменение конфигураций сайтов связывания на TSPO (рис. 7). Однако следует

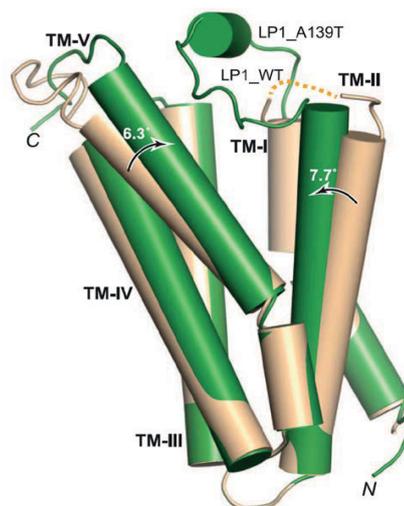


Рис. 7. Структурное наложение TSPO *Rhodobacter sphaeroides* дикого типа (WT TSPO) и мутанта (A139T TSPO). Показаны углы и направления конформационных изменений пептидных спиралей TM-II и TM-V. Взято из [6]

учитывать тот факт, что TSPO *Rhodobacter sphaeroides* имеет лишь 34 % идентичности с TSPO человека, поэтому различия в двух типах TSPO этой бактерии не может полностью объяснить различия в аффинности лигандов TSPO у человека.

Локализация, функции и физиологическая роль TSPO

TSPO представлен во многих органах, однако в наибольшей степени он обнаруживается в тканях, продуцирующих стероиды, таких как ткани надпочечников, гонад и мозга [1, 12]. В центральной нервной системе (ЦНС) TSPO обычно представлен в клетках микроглии и реактивных астроцитах [13, 14]. Также высокое содержание TSPO было обнаружено в некоторых типах нейрональных клеток, таких как нейроны обонятельной луковицы млекопитающих [15, 16], в первичной клеточной культуре корковых астроцитов и нейронов млекопитающих, в гранулярных клетках мозжечка, в глиальных клетках линии BV-2 [17] и в сенсорных нейронах спинального ганглия крыс [18]. О важнейшей роли TSPO свидетельствует тот факт, что функциональная инактивация TSPO индуцирует образование у мышей фенотипа, погибающего на эмбриональной стадии [19].

Как основной компонент наружной мембраны митохондрий, TSPO опосредует различные функций митохондрий, в том числе транспорт холестерина и синтез стероидных гормонов, транспорт порфиринов, митохондриальное дыхание, открытие митохондриальных пор, апоптоз и пролиферацию клеток [12–14, 20–22].

TSPO-опосредованный стероидогенез.

В клетках, продуцирующих стероиды, TSPO опосредует перенос холестерина от внешней к внутренней мембране митохондрий, что является лимитирующей стадией в синтезе нейростероидов [1, 12, 23]. *In vitro* эксперименты, подтвержденные методом ядерного магнитного резонанса, показали, что TSPO связывает холестерин в области карбоксильного конца цитозольного белка (CRAC), входящего в состав аминокислотного домена TSPO, в наномолярных концентрациях [24, 25].

Механизм переноса холестерина внутрь митохондрии до сих пор окончательно не ясен, однако продолжительные исследования показали, что в этот процесс вовлечены помимо TSPO множество других белковых структур. На сегодняшний день транспорт холестерина в митохондрию представляется следующим образом (рис. 8) [26, 27]. На поверхности митохондрии TSPO образует белковый комплекс, получивший название «трандуктосома», который отвечает за перенос холестерина из цитозоля на CRAC-домен TSPO. Помимо самого TSPO в этот комплекс входят следующие компоненты: VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel, Вольт-зависимый анионный 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 I сАМР-зависимой протеинкиназы А (РКА-RI). «Трандуктосома» непосредственно связана с другой структурой, получившей название «метаболон» [27]. Термин «метаболон» описывает мультибелковый комплекс, который является промежуточным звеном между «трандуктосомой» и цитохромом СYP11A1 (P450_{scc}), обеспечивая второй этап переноса холестерина внутрь митохондрии к месту его превращения в прегненолон. «Метаболон» представляет собой 800 кДа комплекс, содержащий несколько белков TSPO, VDAC, AAA+ АТФаза (АТAD3А, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальной мембран) и сам цитохром СYP11A1 [27]. Таким образом, TSPO и VDAC являются компонентами как «трандуктосомы», так и «метаболон», что подчеркивает их ключевую роль в транспорте холестерина внутрь митохондрии.

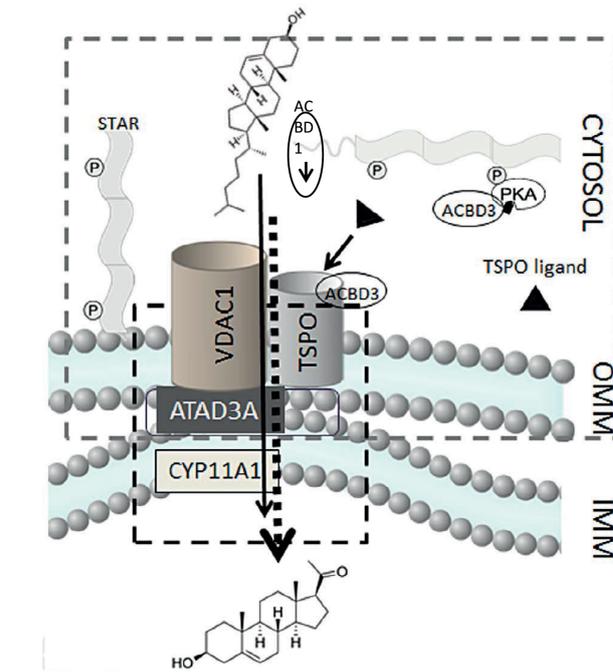


Рис. 8. Современные представления о механизме переноса холестерина внутрь митохондрии с участием рецептора TSPO.

Примечания: VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel, Вольт-зависимый анионный канал), StAR (Steroidogenic acute regulatory protein, Стероидогенный острый регуляторный белок), ACBD1 (acyl-CoA binding domain 1), ACBD3 (acyl-CoA binding domain 3), PKA – сАМР-зависимая протеинкиназа А, АТAD3А – ААА + АТФаза, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальной мембран, СYP11A1 – цитохром P450_{scc}, OMM – outer mitochondrial membrane, внешняя мембрана митохондрии, IMM – inner mitochondrial membrane, внутренняя мембрана митохондрии. Серым пунктиром ограничена «трандуктосома», а черным — «метаболон». Взято из [26]

domain 1, другое название – DBI, ингибитор связывания диазепама), ACBD3 (acyl-CoA binding domain 3, другое название – PAP7, PBR-associated protein) и регуляторная субъединица I сАМР-зависимой протеинкиназы А (РКА-RI). «Трандуктосома» непосредственно связана с другой структурой, получившей название «метаболон» [27]. Термин «метаболон» описывает мультибелковый комплекс, который является промежуточным звеном между «трандуктосомой» и цитохромом СYP11A1 (P450_{scc}), обеспечивая второй этап переноса холестерина внутрь митохондрии к месту его превращения в прегненолон. «Метаболон» представляет собой 800 кДа комплекс, содержащий несколько белков TSPO, VDAC, AAA+ АТФаза (АТAD3А, белок, формирующий контакт внешней и внутренней митохондриальной мембран) и сам цитохром СYP11A1 [27]. Таким образом, TSPO и VDAC являются компонентами как «трандуктосомы», так и «метаболон», что подчеркивает их ключевую роль в транспорте холестерина внутрь митохондрии.

На внутренней мембране митохондрии холестерин под действием фермента P450_{scc}, расщепляющего боковую цепь холестерина и относящегося к семейству цитохромов P450, превращается в пре-

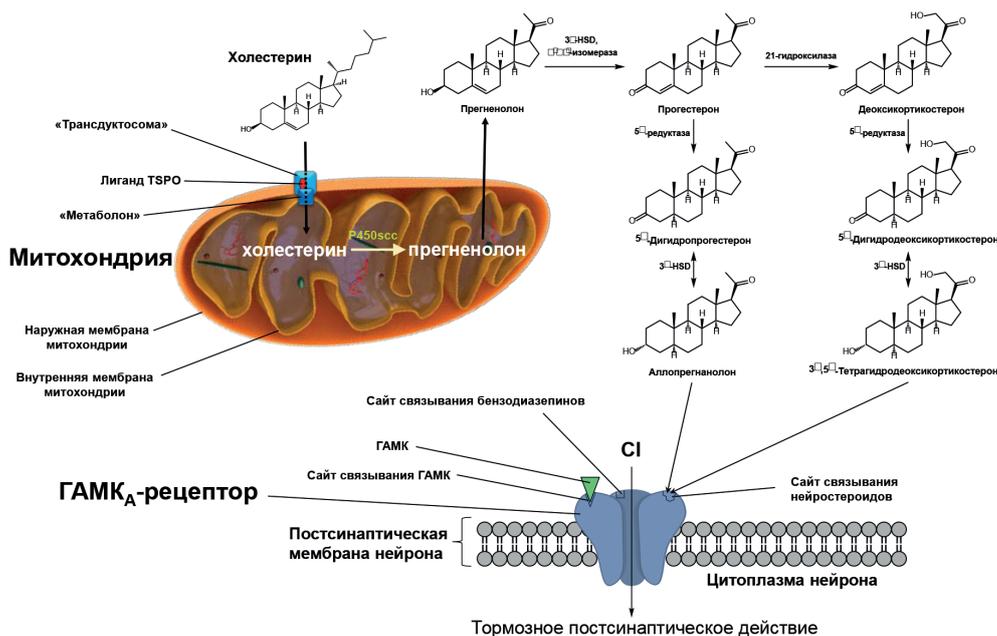


Рис. 9. Механизм нейростероидогенеза и тормозного действия нейростероидов, опосредованных модуляцией TSPO его лигандами

гненолон, который затем диффундирует в цитоплазму (рис. 9) [28]. Ферменты 3β -HSD (3β -гидроксистероиддегидрогеназа) и Δ^4 - Δ^5 -изомераза формируют прегненолон в прогестерон, который под действием 21-гидроксилазы превращается в деоксикортикостерон. 5α -редуктаза восстанавливает прогестерон и деоксикортикостерон в 5α -дигидропрогестерон и 5α -дигидродеоксикортикостерон соответственно. Последние трансформируются в аллопрегнанонон и $3\alpha, 5\alpha$ -тетрагидродеоксикортикостерон соответственно под действием 3α -HSD (3α -гидроксистероиддегидрогеназы). Нейростероиды имеют собственный, отличный от бензодиазепинового, сайт связывания на GABA_A -рецепторе, и они модулируют нейромедиаторное действие ГАМК (γ -аминомасляной кислоты), что приводит к усилению тока анионов хлора внутрь клетки нейрона, что приводит к тормозному постсинаптическому эффекту. Лиганды TSPO (эндогенные или синтетические) модулируют действие этого рецептора, активируя транспорт холестерина с внешней на внутреннюю мембрану митохондрии.

Лиганды 18 кДа транслокаторного белка TSPO

Эндогенные лиганды

Холестерин является ключевым лигандом TSPO, так как именно он является исходным веществом для дальнейшего биосинтеза нейростероидов после проникновения через мембрану митохондрии. Холестерин обладает наномолярным сродством к TSPO ($K_d < 10 \text{ нМ}$) [29]. Как было показано выше, местом связывания холестерина на TSPO является CRAC-домен.

Порфирины. Ряд порфиринов являются эндогенными лигандами TSPO [30, 31], их сайт связывания имеет общую область с сайтом связывания PK11195 [5]. Наибольшим аффинитетом обладают следующие производные порфиринов: протопорфирин IX ($K_i = 14,5 \pm 10,7 \text{ нМ}$ [31]), дейтеропорфирин IX ($K_i = 31,3 \pm 2 \text{ нМ}$) и гемин ($K_i = 40,6 \pm 13,7 \text{ нМ}$) (рис. 10) [31]. Несмотря на то, что многие порфирины обладают высокой аффинностью по отношению к TSPO, эти соединения практически не изучались на наличие био-

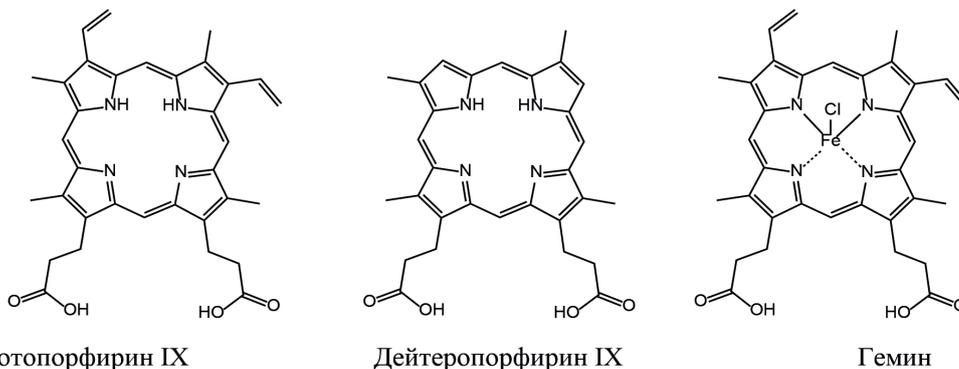


Рис. 10. Представители порфиринов, обладающих высоким сродством к TSPO

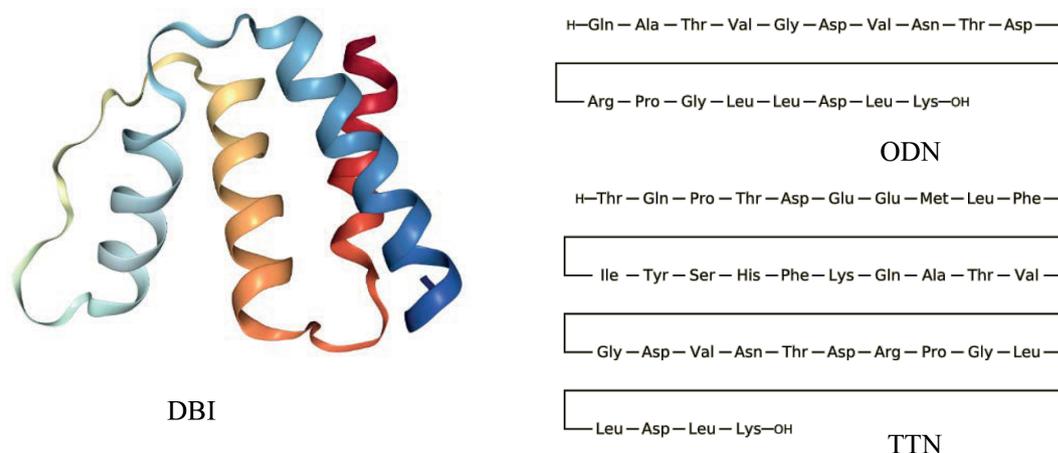


Рис. 11. Третичная структура DBI (идентификатор в Proteine Data Bank: 1HB8) и аминокислотные последовательности TTN и ODN

логических эффектов. Вероятно, 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 [32].

DBI и его производные

В процессе поиска эндогенных лигандов TSPO было установлено, что одним из таковых является ингибитор связывания диазепама (DBI). DBI представляет собой полипептид массой 9 кДа, который был открыт в 1983 году в мозге крысы при изучении белков, ингибирующих бензодиазепиновое связывание с ГАМК_A-рецептором (рис. 11) [33]. Было установлено, что DBI способен вытеснять бензодиазепиновые лиганды из TSPO, выделенных из коры надпочечников крыс, а также что DBI содержится в высоких концентрациях клетках коры надпочечников и клетках Лейдига текстикул, которые обогащены рецепторами TSPO [34]. Также было показано, что основные посттрансляционные продукты DBI — октадеканейропептид DBI₃₃₋₅₀ (octadecaneuropeptide, ODN) и триаконтатетранейропептид DBI₁₇₋₅₀ (trikontatetranuropeptide, TTN) также обладают сродством к TSPO (рис. 11) [35, 36].

В работе Papadovulos V, et. al. [37] было установлено, что как сам DBI, так и его производные TTN и ODN стимулируют митохондриальный биосинтез стероидов. При этом авторы показали, что максимальная стимуляция образования прегненолона под действием DBI (в три раза) достигается при концентрации белка 0,33 мкмоль. Эффективность стимуляции стероидогенеза DBI превышает этот показатель, полученный под действием производных бензодиазепинов. Анализ литературы позволяет сделать предположение, что DBI и его производные взаимодействуют с тем же сайтом

связывания на TSPO, что и синтетические лиганды. Таким образом, вероятно, синтетические лиганды TSPO полностью или частично выполняют роль DBI при взаимодействии с этим рецептором.

РАР7. В 2001 году был выявлен ещё один эндогенный белковый лиганд TSPO, получивший название «Ассоциированный с ПБР протеин» (PBR-associated protein, PАР7) [38]. Этот белок массой 52 кДа был выявлен в тканях грызунов и человека, содержащих сам TSPO. Позже было установлено, что PАР7 является важной составляющей при формировании белкового комплекса, включающего TSPO, для транспорта холестерина на внутреннюю мембрану митохондрии [39, 40].

В процессе выявления новых функций эндогенных пептидов как DBI, так и PАР7 были отнесены к общему классу белков, содержащих домен связывания ацил-кофермента А (acyl-coenzyme A binding domain containing protein, ACBD), в связи с чем были переименованы в ACBD1 и ACBD3 соответственно [39]. Эти данные позволили предположить, что ацил-КоА-связывающие белки или сам ацил-КоА регулируют митохондриальную функцию TSPO.

Синтетические лиганды TSPO

Ro 5 4864

История создания и исследования синтетических лигандов TSPO (табл. 1) начинается в 1977 году вместе с открытием самого рецептора, когда Браэстрап и Сквирес при проведении экспериментов по связыванию меченного тритием диазепама в различных тканях крыс обнаружили, что он связывается не только со своим специфическим сайтом связывания на мембранах мозга (центральный бензодиазепиновый рецептор, ЦБР (СВР)), но и с сайтом связывания, расположенным в митохондриальной фракции почек, печени и лёгких крыс [41]. В этом же исследовании авторы изучили способность различных представителей ряда

бензодиазепинов вытеснять [³H]диазепам из выявленных сайтов связывания. Было обнаружено, что соединение Ro 5 4864, которое практически не вытесняет [³H]диазепам из мембран мозга, очень активно замещает эту радиометку из митохондриальной фракции почек. Напротив, клоназепам, показавший наибольшую степень ингибирования связывания меченного диазепама с мембранами мозга, практически не ингибировал почечное связывание. Полученные данные, а также последующие исследования позволили сделать вывод, что новый сайт связывания бензодиазепинов отличается от ЦБР и имеет собственные функции. На основании первичных данных по локализации нового бензодиазепинового сайта связывания, ему было присвоено название периферический бензодиазепиновый рецептор (ПБР, Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR)). В 2006 году в свете детализации молекулярных функций и структуры этого рецептора, он был переименован в транслокаторный белок (TSPO, translocator protein) [1].

Благодаря своей высокой аффинности и селективности соединение Ro 5-4864 в дальнейшем использовалось для исследования характеристик TSPO, на основании которых был сделан вывод, что этот рецептор принципиально отличается от ЦБР, имеет собственную структуру с внутриклеточной локализацией и собственные функции [42].

Производные бензодиазепинов явились первыми синтетическими лигандами TSPO, а соединение Ro 5-4864 стало классическим представителем этой группы, которое активно использовалось далее для выявления функционала TSPO и в качестве эталонного вещества при поиске новых лигандов TSPO.

Ro 5-4864 проявляет антидепрессивное действие в тесте вынужденного плавания в дозах 1,0 и 3,0 мг/кг (внутрибрюшинно, в/б), причём этот эффект блокируется при предварительном введении антагониста TSPO – соединения РК11195 [42]. Также Ro 5 4864 продемонстрировал высокий потенциал в качестве средства для лечения болезни Альцгеймера в модели на мышах в дозе 3 мг/кг (в/б) [43]. В экспериментах на крысах показана нейропротективная активность Ro 5-4864 в моделях повреждения периферической и центральной нервной системы в дозе 10 мг/кг (в/б). Это соединение способствовало регенерации двигательных нейронов и восстанавливало функцию лицевого нерва после аксотомии [44], а также препятствовало нейродегенерации седалищного нерва у стареющих крыс в дозе 3 мг/кг (8 подкожных инъекций) [45]. В модели повреждения кортекса крыс Ro 5-4864 в концентрации 100 и 150 мкмоль/л существенно увеличивал выживаемость нейронов [46], а в модели эксайтотоксичности, вызванной каиновой кислотой, это соединение защищало нейроны гиппокампа крыс от повреждения и снижало уровень реактивных астроцитов в микроглии в дозе 3 мг/кг (в/б) [47]. Показана способность Ro 5-4864 снижать развитие диабетической нейропатии за счёт активации нейростероидогенеза в модели на крысах [48].

РК11195

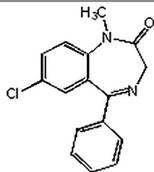
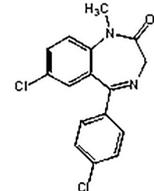
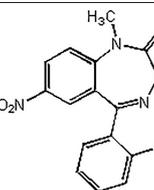
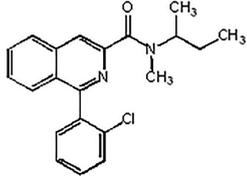
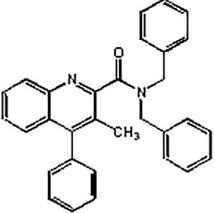
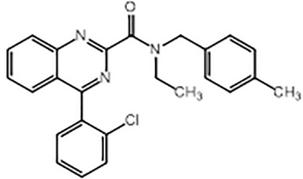
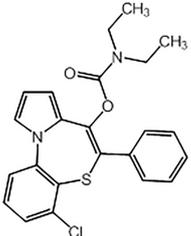
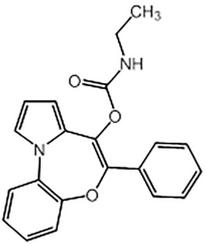
Производное изохинолина РК11195, открытое в 1983 году, стало первым соединением, не относящимся к классу бензодиазепинов, способным связываться с TSPO с наномолярной аффинностью при отсутствии связывания с ЦБР [49]. Авторы, впервые опубликовавшие данные о РК11195, не представили в своей работе ход дизайна данной молекулы, на основании чего можно предположить, что оно было открыто путём широкого скрининга. При сопоставлении характеристик связывания соединений РК11195 и Ro 5-4864 с TSPO в мембранах тканей почек крыс с использованием [³H] РК11195 было показано превосходство первого соединения ($K_i = 9,3$ нМ) перед вторым ($K_i = 23,0$ нМ) [50]. РК11195 с момента открытия и до настоящего времени широко используется в качестве «золотого стандарта» лигандов TSPO в исследованиях, связанных с этим рецептором. Ряд фармакологических исследований позволяет утверждать, что РК11195 является антагонистом TSPO, так как он блокирует нейрорепродуктивные эффекты других лигандов TSPO, демонстрирующих агонистические свойства [42, 51–54].

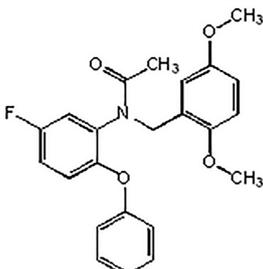
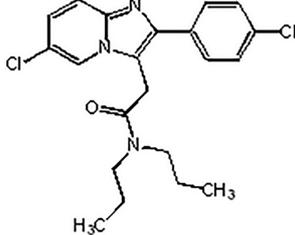
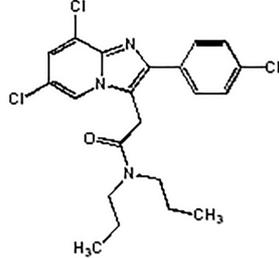
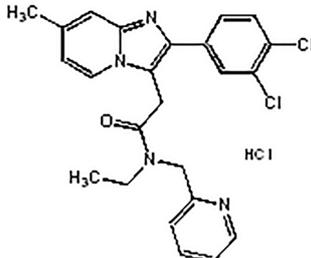
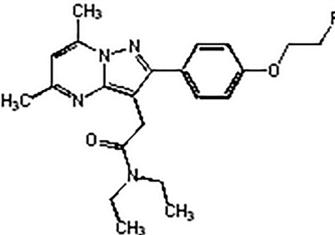
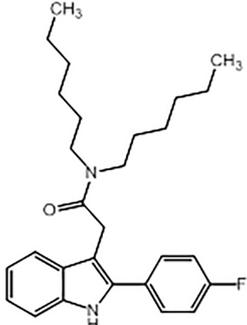
Алпидем

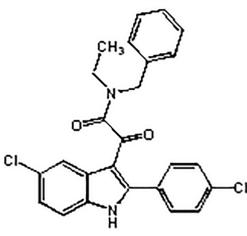
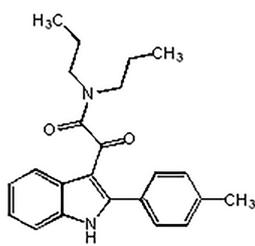
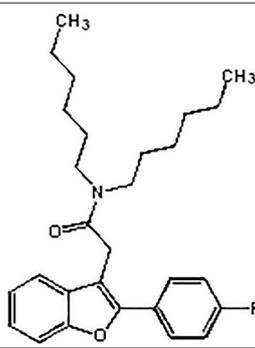
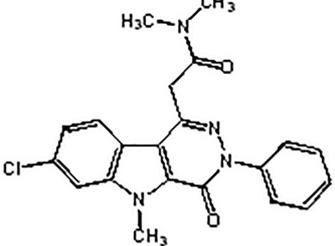
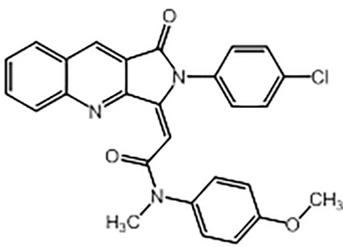
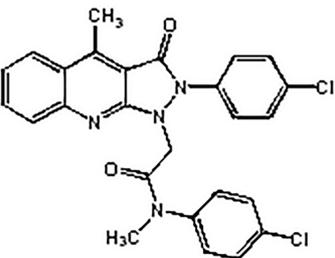
Алпидем – третий лиганд TSPO, ставший впоследствии классическим представителем этой группы. Этот препарат разрабатывался в компании Synthlabo (Франция) в качестве анксиолитического средства в конце 1980-х – начале 1990-х годов. Он был внедрен в клинику в 1991 году [55]. Алпидем был выявлен и отобран в ходе широкого скрининга производных имидазо[1,2-а]пиридинов, в котором оценивались анксиолитические, гипнотические, снотворные и противосудорожные свойства этих веществ на животных моделях на грызунах [56]. Позже было установлено, что Алпидем обладает аффинными свойствами по отношению как к TSPO, так и к ЦБР (K_i 0,5-7 нМ и 1-28 нМ соответственно) [57]. Алпидем стимулирует образование прегненолона в митохондриях клеток глиомы линии С6-2В [57]. Показано, что анксиолитическое, а также антиконвульсивное действие алпидема обусловлено как его связыванием с ЦБР, так и с TSPO-рецептором с последующим образованием нейростероидов [58]. В 1994 году препарат Алпидем (таблетки, 50 мг активного компонента) был изъят из клиники вследствие обнаружения нарушения функции печени на фоне его приёма с несколькими смертельными случаями [59–61]. Следует отметить, что этот побочный эффект может быть обусловлен сродством Алпидема к ГАМКА-рецепторам, которые часто экспрессированы в тканях печени.

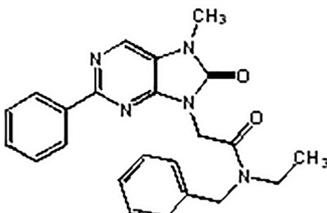
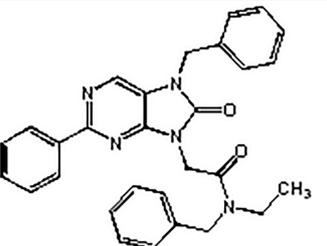
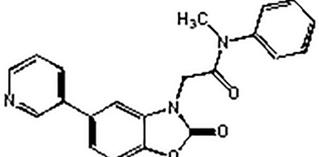
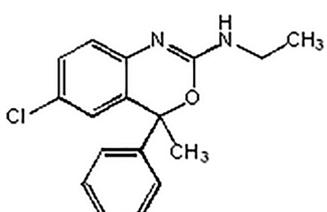
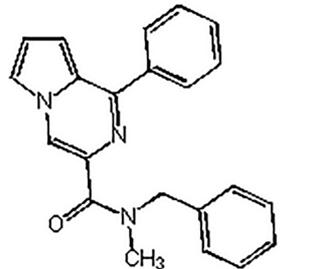
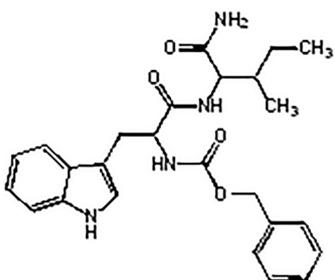
Три представленных лиганда TSPO, Ro 5 4864, РК-11195 и Алпидем, явились ключевыми родоначальниками большинства последующих синтетических лигандов TSPO, так как именно отталкиваясь от их структур, происходило конструирование новых молекул и создание фармакофорных моделей структур, обладающих аффинностью к TSPO.

Представители различных классов синтетических лигандов TSPO

Класс	Шифр	Формула	Значения IC50/Ki	Ссылка
Бензодиазепины	Диазепам		IC50 (TSPO) 40 нМ, (CBR) 3 нМ	[41]
	Ro-5-4864		IC50 (TSPO) 4,7 нМ, (CBR) 163000 нМ	[41]
	Клоназепам		IC50 (TSPO) 2900 нМ, (CBR) 5 нМ	[41]
Изохинолины	PK11195		Ki (TSPO) 9,3 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[50]
Хинолины	QIN-3k		Ki (TSPO) 11 нМ	[79]
Хиназолины	QZ-19		Ki (TSPO) 0,489 нМ	[80]
Бензотиазепины	THIA-4i		Ki (TSPO) 2 нМ	[64]
Бензоксазепины	BOZ-11a		Ki (TSPO) 2,26 нМ	[65]

Класс	Шифр	Формула	Значения IC50/Ki	Ссылка
Арилокси-амиды	DAA1106		Ki (TSPO) 0,92 нМ	[66]
Имидазо-пиридины	Алпидем		Ki (TSPO) 0,5-7 нМ (CBR) 1-28 нМ	[57]
	CB-34		IC50 (TSPO) 20 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[84]
	YL-IPA08		IC50 (TSPO) 0,23 нМ, (CBR) > 700 нМ	[51]
Пиразоло-пиримидины	DPA-714		Ki (TSPO) 7,0 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[85]
Индолы	FGIN-1-27		Ki (TSPO) 4,4 нМ	[53, 87]

Класс	Шифр	Формула	Значения IC50/Ki	Ссылка
Индолы	IND-32		Ki (TSPO) 3,33 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[90]
	MPIGA		Ki (TSPO) 5,5 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[91]
Бензофураны	BZF-4b		Ki (TSPO) 8 нМ, (CBR) > 1000 нМ	[92]
Пиримидино-индолы	SSR180575		IC50 (TSPO) 2,5 нМ, (CBR) > 1000 нМ	[93]
Пирроло-хинолины	PRQ-4e		Ki (TSPO) 0,9-1,9 нМ	[94, 95]
Пиразоло-хинолины	PZQ-10t		Ki (TSPO) 16 нМ	[96]

Класс	Шифр	Формула	Значения IC50/Ki	Ссылка
Пурины	AC-5216, XBD173, Эмапунил		IC50 (TSPO) 0.298 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[54]
	ZBD-2		Ki (TSPO) 0.463 нМ	[75]
Бензоксазолонь	BOZ-74		Ki (TSPO) 11 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[77]
Бензоксазины	Этифоксин		IC50 (TSPO) 27300 нМ, (CBR) 6700 нМ	[97]
Пирроло-пиазины	ГМЛ-1		IC50 (TSPO) 54 нМ, (CBR) > 10000 нМ	[102]
Дипептидные лиганды	ГД-23		Нет данных	[110]

Дизайн лигандов TSPO на базе бензодиазепинов

В начале 1990-х годов *Campiani G, et al.* описали группу производных бензотиазепинов, которые разрабатывались в качестве аналогов бензодиазепинов и лигандов ГАМК-рецепторов. Однако исследование характеристик связывания показало, что ряд представителей данной группы обладает высокой аффинностью и селективностью к TSPO [62]. Исследователями была сконструирована фармакофорная модель молекул, обладающих лигандными свойствами к TSPO. В неё входят следующие элементы: центроид ортоконденсированного бензольного кольца L1, центроид фенильного заместителя L3, неподеленная пара sp^2 или sp^3 гибридизованного атома кислорода, связанного с тиазепиновым кольцом (H2), и центроид пиррольного фрагмента $\pi 1$ (рис. 12).

В дальнейшем теми же авторами на основании данных структура-аффинность была предложена 3D-QSAR модель лигандов TSPO, созданная с помощью сравнительного метода анализа молекулярного поля (CoMFA) на множестве из 42 лигандов, относящихся к классу бензотиазепинов. Данная модель оказалась способной

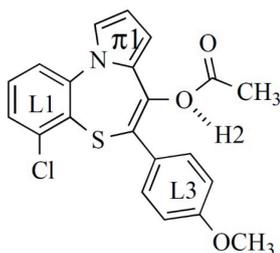


Рис. 12. Фармакофорная модель строения бензотиазепиновых лигандов TSPO

рационализировать сродство лигандов по стерическим и электростатическим параметрам со стандартной ошибкой значения $riC50$, не превышающей 0,648 [63].

С использованием представленной методологии дизайна группой *Campiani G, et al.* в ряду производных бензотиазепинов были выявлены высокоаффинные

лиганды, из которых наибольший потенциал продемонстрировало соединение TH1A-4i [64].

В развитие предложенного подхода к дизайну лигандов TSPO *Campiani G, et al.* была сконструирована группа ближайших аналогов бензотиазепинов – бензоксазепины [65], среди которых были выявлены высокоаффинные молекулы. Так, соединение **BOZ-11a** показало субнаномольное значение аффинности. Кроме того, оно в концентрации 2 мкмоль/л стимулировало образование прегненолона в клетках Лейдига MA10 с той же эффективностью, что и соединение Ro-5-4864 [65].

Однако несмотря на перспективные результаты по аффинности в разработанных классах, в литературе нет данных о доклинических исследованиях их представителей.

Okubo T and Okuyama S, et al. с соавт. описали открытую ими группу лигандов TSPO – арилоксианилидов, сконструированную на базе бензодиазепинового лиганда Ro-5-4864. Дизайн новой группы осуществлялся путём раскрытия диазепинового цикла и введением в молекулу дополнительного арильного заместителя, что позволило создать конформационно-свободные лиганды (рис. 13) [66, 67].

Среди полученных представителей класса арилоксианилидов были выявлены высокоаффинные и высокоселективные к TSPO структуры, например DAA1106. Эксперимент по оценке связывания соединения DAA1106 с митохондриальной фракцией кортекса обезьян резус показал, что высокое сродство этого соединения к TSPO сохраняется (K_d 0,426 нМ), что свидетельствует об отсутствии видоспецифичности его взаимодействия [68]. В исследовании *Briard E, et al.* 2009 года представлены близкие данные по аффинности DAA1106 по отношению к TSPO мозга крыс, обезьян резус, а также человека, составляющие (K_i) 0,0726; 0,230 и 0,242 нМ соответственно [69].

Соединение DAA1106 показало наличие анксиолитической активности в эксперименте на мышях в тестах ПКЛ и светло-тёмная камера в дозах 0,1–3,0 мг/кг (перорально), не оказывая при этом, в отличие от диазепам и буспирона, влияния на спонтанную двигательную активность [66].

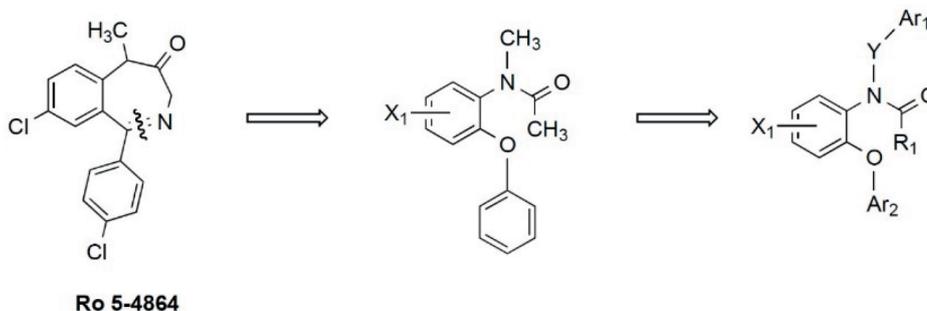


Рис. 13. Дизайн лигандов TSPO в ряду арилоксианилидов путём раскрытия бензодиазепинового цикла соединения Ro-5-4864 и последующей модификации

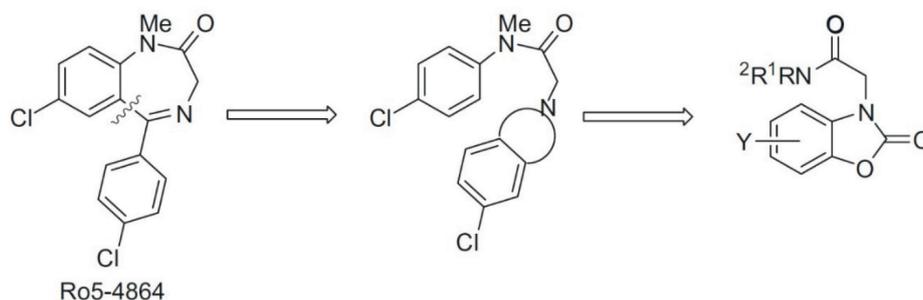


Рис. 14. Дизайн лигандов TSPO в ряду производных бензоксазолонов путём раскрытия бензодиазепинового цикла соединения Ro-5-4864 и последующей модификации

Группа учёных из Японии из компании Dainippon Pharmaceutical Co. предложила новый тип лигандов TSPO на базе пуринового гетероцикла. К сожалению, авторами не представлен ход дизайна новой группы, однако можно предположить, что конструирование велось по пути, представленном сотрудниками этой же компании в последующих работах по поиску новых лигандов TSPO (см. ниже – бензоксазолоновый лиганд **BOZ-74**), а именно путём размыкания диазепинового цикла модельного лиганда Ro-5-4864 и заменой ароматического остова пуриновым гетероциклом (см. схему по конструированию **BOZ-74**). В качестве наиболее перспективной молекулы в ряду пуриновых производных было отобрано соединение AC 5216 [54], получившее впоследствии также шифр XBD173 и название Эмапунил. Данное вещество обладает субнанолярной аффинностью к TSPO и высокой селективностью. При этом аффинность AC 5216 была продемонстрирована как к TSPO в мозге крыс (K_i 0,297 нМ) и клетках глиомы крыс (IC_{50} 3,04 нМ), так и в клетках глиомы человека (IC_{50} 2,73 нМ). AC 5216 показал противотревожный эффект в тесте Фогеля у крыс (в дозах 0,1–3,0 мг/кг, п/о) и в тестах «светло-тёмная камера» (в дозах 0,003–0,01 мг/кг, п/о) и «социальное взаимодействие» (в дозах 0,01–0,3 мг/кг, п/о) у мышей, причём эффекты соединения полностью блокировались действием антагонистом TSPO – соединением PK11195. Выраженность эффектов AC 5216 была на уровне активности диазепама в аналогичных дозах. Также AC 5216 продемонстрировал антидепрессивную активность в дозах 3,0–30,0 мг/кг (п/о) в тесте вынужденного плавания у крыс, этот эффект также снимался действием PK11195. Выраженность антидепрессивного действия AC 5216 превышала эффект препарата дезипрамина в дозе 30 мг/кг (п/о). В отличие от бензодиазепинов, AC 5216 не обладал миорелаксантным действием, не оказывал влияния на память и на гексобарбиталовой сон у мышей, не вносил существенных изменений в электроэнцефалограмму крыс [54]. В следующей публикации японских авторов было установлено, что анксиолитическое действие AC-5216 ингибируется трилостаном, финастеридом (ингибиторы биосинтеза

нейростероидов) и пикротоксином (блокатор ионного канала ГАМКА-рецептора), что свидетельствует о реализации эффектов соединения через активацию стероидогенеза [70]. В эксперименте по хроническому введению AC-5216 мышам установлено, что он не вызывает зависимости и синдрома отмены, кроме того, он не приводит к потере массы тела [71].

В публикации *Rupprecht R, et al.* описана способность AC-5216 предотвращать панические атаки у грызунов при отсутствии седативных свойств и развития толерантности [72]. В эксперименте на людях установлено, что AC-5216 (приём по 90 мг препарата в течение 7 дней) проявляет анксиолитическую и антипаническую активность у здоровых добровольцев при использовании экспериментальной модели ССК4-индуцированной тревоги (тревоги, индуцированной тетрапептидом холецистокинина) [72]. На модели посттравматического стрессового расстройства у мышей выявлена анти-ПТСП активность AC-5216 [73]. Также AC-5216 активировал биосинтез прегненолона в клетках глиомы крыс линии С6 и в клетках микроглии мышей BV-2, а также приводил к увеличению экспрессии TSPO [74].

Соединение AC-5216 доведено компанией Novartis до II фазы клинических исследований в качестве средства для лечения генерализованных тревожных расстройств (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00108836). В этом неопубликованном исследовании AC-5216 не показал различий с плацебо в лечении тревожных расстройств. Отсутствие активности во II стадии, возможно, связано с выбором неподходящей модели заболевания: ССК4-индуцированная тревога в большей степени моделирует панические расстройства, чем генерализованные тревожные расстройства.

Ещё одним перспективным лигандом TSPO в ряду производных пуринов является молекула ZBD-2, отличающаяся от AC-5216 наличием бензильного заместителя вместо метильного в седьмом положении гетероцикла [75]. Этот высокоаффинный лиганд продемонстрировал анксиолитическую активность на модели хронической боли у мышей в дозах 0,15–1,5 мг/кг (п/о) [75]. ZBD-2 показал также нейропротективный

эффект в моделях очаговой ишемии головного мозга и NMDA-индуцированной нейротоксичности [76].

В 2012 году группа учёных из компании Dainippon Sumitomo Pharma Co. описали группу высокоаффинных и селективных лигандов TSPO, относящихся к классу бензоксазолонов. Дизайн нового класса осуществлялся путём структурного преобразования бензодиазепинового лиганда Ro5-4864 (рис. 14). При этом диазепиновый цикл был разомкнут, а иминный фрагмент был заменен на оксазолоновый гетероцикл [77]. Заместители в образовавшемся остове были широко проварьированы.

Наибольший потенциал в группе бензоксазолонов продемонстрировало соединение **BOZ-74**. Это соединение показало в дозе 10 мг/кг (п/о) выраженную анксиолитическую активность у крыс в тесте Фогеля [77]. Кроме того, **BOZ-74** обладало хорошими фармакокинетическими показателями, демонстрируя метаболическую активность в печени крысы и человека и способность проникать в мозг при пероральном введении крысам.

Дизайн лигандов TSPO на базе структуры PK11195

Соединение PK11195 стало отправной точкой в дизайне и моделировании целого ряда родственных ему лигандов TSPO.

Так, *Capelli A, et al.* был осуществлен систематический подход к дизайну новых лигандов TSPO путём создания конформационно-жестких производных PK11195 (рис. 15). Для этого был создан пространственный пул молекул с определёнными значениями диэдральных углов между ключевыми фармакофорными элементами молекул: карбонильной группой, ароматическим заместителем и другими [78].

Использование данного подхода позволило установить, что для достижения значений высокой аффинности к TSPO молекула должна обладать следующими характеристиками: карбонильная группа должна располагаться под диэдральным углом в диапазоне от 80 до 110° по отношению к гетероциклическому остову, что указывает на принципиальное участие этого фрагмента в образовании водородной связи с подходящей аминокислотой в рецепторе, кроме того, угол поворота ароматического заместителя не играет существенной роли в лигандных свойствах молекул; анализ состава амидных групп привёл к выводу, что для наличия высокой аффинности необходима объёмная липофильная третичная амидная группа, в то время как вторичные амиды обладают существенной худшими свойствами. Наконец, изменение положения гетероциклического атома азота не оказывает существенное значение на аффинность молекул.

С использованием представленного подхода группой *Capelli A, et al.* было создано производное хинолинов QIN-3k, которое обладает высокой аффинностью к TSPO и существенно увеличивает уровень прегненолона, прогестерона и аллопрегнанола в кортексе и в плазме крыс в сравнении с контролем [79].

В 2014 году в продолжение исследований аналогов PK11195 с целью создания высокоаффинных и эффективных молекул была предпринята попытка создания 3D-фармакофорной модели лигандов TSPO с использованием пакета PHASE программного обеспечения Maestro из Schroedinger 9.1 (рис. 16) [80]. В состав предложенной модели входит акцептор водородной связи (красная сфера A), три ароматических кольца

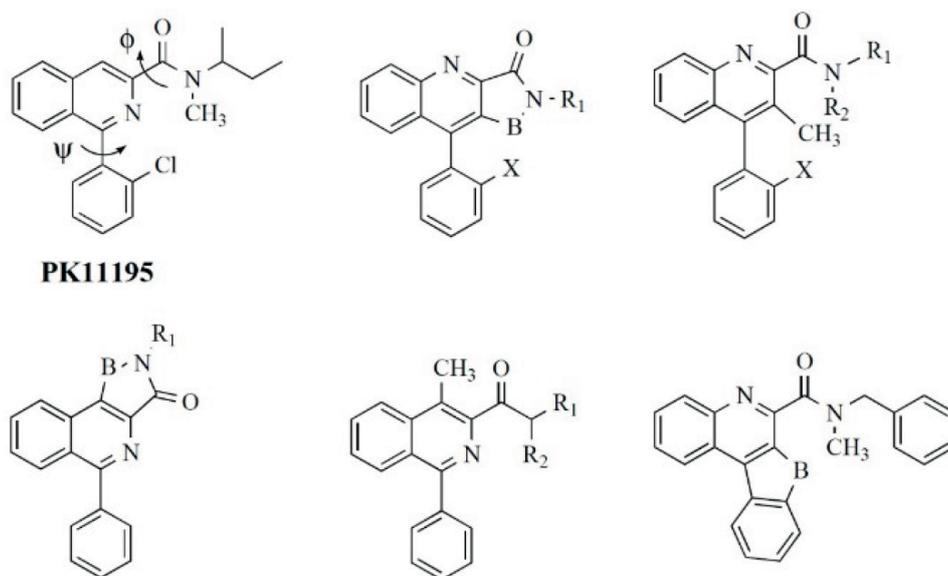


Рис. 15. Конформационно-жесткие производные PK11195, сконструированные для уточнения фармакофорной модели лигандов TSPO

(оранжевые кольца R1, R2, R3) и функции дизамещенного амида (голубые сферы X1 и X2). Кроме того, в модель были добавлены фармакофоры, учитывающие замещение в хиразолиновом кольце и циклические амидные группы (жёлтые сферы). Для всех фармакофорных элементов в данной модели были заданы чёткие пространственные характеристики.

С использованием описанного подхода авторами был сконструирован ряд производных хиразолинов, среди которых можно выделить соединение QZ-19, которое обладает субнанолярной аффинностью к TSPO и показало антипролиферативную активность на клеточной линии U343 глиобластомы человека [80].

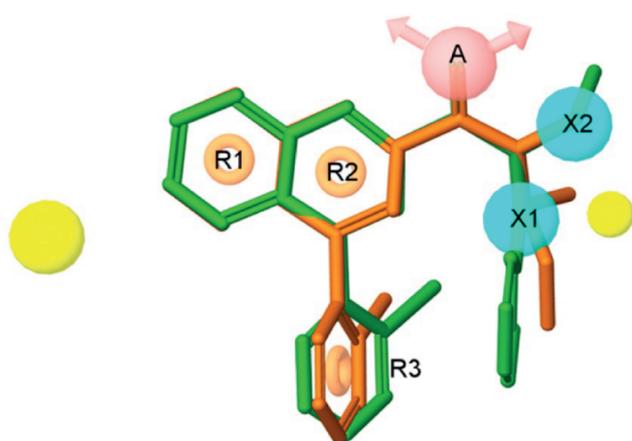


Рис. 16. 3D-фармакофорная модель хиразолиновых лигандов TSPO

Дизайн лигандов TSPO на базе структуры Алпидема

В 1997 году *Trapani G, et al.* опубликовали исследование ряда производных Алпидема на базе его имидазопиридинового ядра, направленное на создание в этом ряду селективных лигандов TSPO [81].

При этом для создания новых молекул Трапани использовал подход модификации базовой молекулы Алпидема путём варьирования заместителей X, Y, Z и R гетероциклического остова (рис. 17).

Дизайн молекул осуществлялся на базе фармакофорной модели, предложенной *Bourguignon JJ* и *Wermuth CG* для лигандов TSPO [58, 82]. Эта модель основана на предположении, что Алпидем принимает две различные конформации при взаимодействии с TSPO и ЦБР за счёт различного пространственного расположения амидного заместителя. На рис. 18 схематично представлено сопоставление моделей взаимодействия Алпидема с TSPO и ЦБР. Названия областей приведено с использованием номенклатуры, предложенной *Wermuth CG* [83]: FRA, freely rotating aromatic ring region – область свободного вращения ароматического кольца, 1, electron-rich zone – электронно-обогащенная зона, OPR, out-plane region – область вне плоскости, PAR, planar aromatic region – плоская ароматическая область; LA, lipophilic area – липофильная область. *Bourguignon JJ*



Рис. 17. Модификация Алпидема с целью поиска высокоаффинных и селективных лигандов TSPO в ряду имидазопиридинов

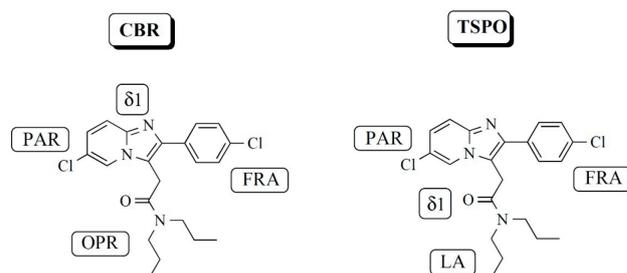


Рис. 18. Сопоставление фармакофорных моделей лигандов ЦБР и TSPO, использовавшееся для дизайна имидазопиридиновых лигандов TSPO

предложил модель взаимодействия с TSPO очень похожую на модель для ЦБР путём перемещения основных фармакофорных элементов:

При помощи представленного подхода *Serra M, et al.* был создан ряд новых лигандов TSPO, обладающих высокой аффинностью и селективностью. Одним из таких соединений стало СВ-34, отличающееся от Алпидема наличием второго атома хлора в имидазопиридиновом цикле. Было установлено, что СВ-34 эффективно стимулирует нейростероидогенез, увеличивая концентрации прегненолона, прогестерона, аллопрегнанолон и аллотетрагидродеоксикортикостерона в плазме крови и мозге крыс [84]. В тесте Фогеля СВ-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 [84].

Используя подход по конструированию структурных аналогов Алпидема, в 2014 году *Li-Ming Zhang, et al.* получили еще одно производное имидазопиридина – YL-IPA08, обладающее субнанолярной аффинностью к TSPO и высокой селективностью [51]. Это соединение увеличивает концентрации прегненолона и прогестерона в клетках астроцитов крыс [51]. Производное YL IPA08 в интервале доз от 0,1 до 10 мг/кг (п/о или в/б) демонстрирует антидепрессивный эффект на моделях принудительного плавания у крыс и мышей и в тесте «подвешивание за хвост» у мышей, а также анксиолитический эффект в тестах Vogel у крыс, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) у мышей и в тесте «подавление нового подкрепления»

на мышах. При этом активность этого соединения блокируется предварительным введением антагониста TSPO РК11195 и не снимается антагонистами ЦБР [51]. При сопоставлении с анксиолитиком диазепамом было установлено, что в отличие от последнего, YL IPA08 не обладает миорелаксирующим действием, не влияет на двигательную координацию, память и на индуцированный гексобарбиталом сон у мышей. Также было установлено, что YL IPA08 демонстрирует анксиолитическую активность в моделях посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) у мышей, причём анти-ПТСР эффект блокируется антагонистом TSPO РК11195 [52].

Класс пиразолопиримидиновых лигандов TSPO был сконструирован в качестве азоизомеров Алпидема и его аналогов с учётом данных, полученных для имидазопиридиновых производных (рис. 19). Данный класс был предложен в 2001 году *Selleri S, et al.* [50]. Представитель класса DPA-714 показал наномолярное значение аффинности к TSPO и высокую селективность, он существенно увеличивал содержание прегненолона в клетках глиомы крыс C6 [85]. Изучение нейропротективной активности соединения DPA-714 в модели эксайтотоксической нейродегенерации, вызванной хинолиновой кислотой, у крыс, показали, что оно обладает протекторным действием, снижая активацию микроглии [86].

Поиск лигандов TSPO в ряду производных индола был начат *Kozikowski AP* и *Romeo E, et al.* в 1992-1993 годах [53, 87]. Авторы не указывают в работе, какой подход был использован для дизайна новых молекул, однако структурная близость общей формулы предложенных производных индола с Алпидемом позволяет сделать предположение, что конструирование

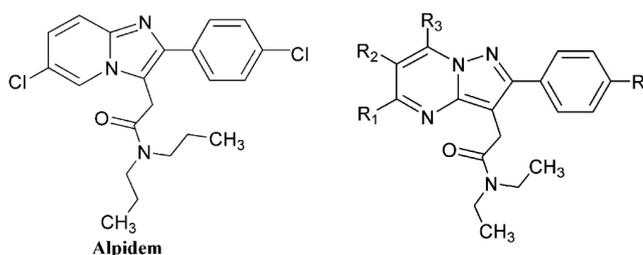


Рис. 19. Дизайн азаизомеров Алпидема в ряду пиразолопиримидинов

осуществлялось на базе его структуры. В ряду производных индола было открыто соединение FGIN 1-27, ставшее впоследствии одним из эталонных лигандов TSPO. Это соединение показало высокое значение аффинности к TSPO и высокую эффективность в активации стероидогенеза. FGIN 1-27 стимулировало синтез прегненолона более чем на 200 % относительно контроля. Также было установлено, что антагонист TSPO РК11195 ингибирует аккумуляцию прегненолона производным FGIN-1-27 [53]. FGIN 1-27 в дозе

0,5 мг/кг (п/о) проявил антинеофобическое действие в тесте ПКЛ, значительно увеличивает количество заходов в открытые рукава лабиринта и процент времени пребывания в открытых рукавах крыс при пероральном введении [53]. Было установлено, что антинеофобический эффект FGIN-1-27 в тесте ПКЛ обусловлен именно его лигандными свойствами по отношению к TSPO. Так, селективный лиганд TSPO РК11195, не проявляющий собственного эффекта в ПКЛ, блокировал антинеофобическое действие FGIN-1-27, не оказывая влияния на эффект диазепама. В то же время активность FGIN-1-27 практически не изменялась под действием антагониста ГАМКА флумазенила, который полностью снимал эффект диазепама.

Для оценки вовлеченности рецепторов TSPO периферических тканей в реализации *in vivo* эффектов FGIN-1-27 был проведён эксперимент по сопоставлению антинеофобического эффекта этого вещества у крыс, подвергнутых адреналэктомии и кастрации, что исключало участие периферических стероидных гормонов в активности соединения. Результаты эксперимента продемонстрировали отсутствие изменений в поведении животных, подвергнутых операциям, что указывает на вовлеченность именно мозгового TSPO в развитие антинеофобического эффекта FGIN-1-27.

Изучение анксиолитико-подобного действия FGIN-1-27 в тесте Vogel при внутривенном введении показало наличие выраженного антиконфликтного эффекта этого соединения в дозах 0,13-0,5 мг/кг [88]. Кроме того, FGIN-1-27 в дозе 2,5 мг/кг (в/в) продемонстрировал антиконвульсивную активность на моделях конвульсий у крыс, вызванных изониазидом и метразолом [88]. Анксиолитическое и антиконвульсивное действие FGIN-1-27 полностью блокировалось РК11195 и не снималось флумазенилом, демонстрируя вовлеченность TSPO в реализацию фармакологических эффектов соединения.

В 2000 году *Bitran D, et al.* показали наличие анксиолитико-подобного эффекта FGIN-1-27 при интрагиппокампальном методе введения (2,5 мкг/животное) в тестах ПКЛ и shock-probe burying test у крыс [89]. При этом активность этого соединения ослаблялась под действием РК11195 и блокировалась действием пикротоксина – блокатора ионного канала ГАМКА-рецептора, и 4-МА – ингибитора 5-редуктазы. В то же время флумазенил не оказывал эффекта на активность FGIN-1-27. Также показано, что FGIN-1-27 увеличивает уровень аллопрегненолона в гиппокампе и в крови. Полученные данные наглядно свидетельствуют о реализации противотревожного действия FGIN-1-27 через взаимодействие с TSPO и через активацию нейростероидогенеза.

Подробно исследованное соединение FGIN-1-27 стало базовой структурой для дизайна целого ряда новых подклассов лигандов TSPO.

Да Сеттимо с группой был получен ряд индолилглиоксиламидных аналогов FGIN-1-27, для констру-

ирования которых была предложена фармакофорная модель, предполагающая наличие трех липофильных участков (L1-L3) и донора водородной связи (H1) (рис. 20) [90].

Среди полученных структур следует отметить соединение IND-32, показавшее наномолярную аффинность к TSPO и высокую селективность. Это вещество показало высокую стероидогенную активность, увеличивая уровень прегненолона в клетках глиомы крыс линии C6 на 171 %, а также продемонстрировало анксиолитическую активность в тесте ПКЛ, значимо

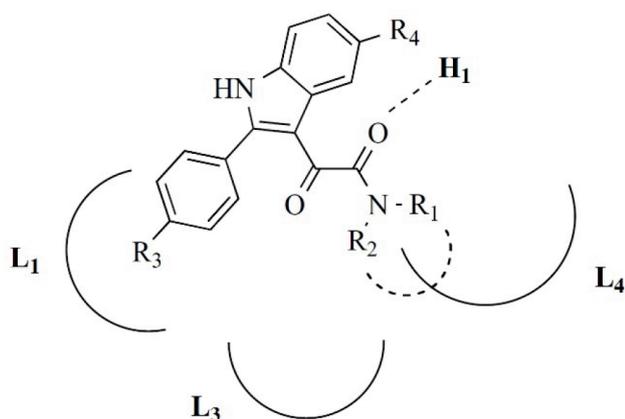


Рис. 20. Фармакофорная модель индолилглиоксалимидных лигандов TSPO

увеличивая процент времени пребывания животных и количества входов в открытые рукава лабиринта в дозе 30 мг/кг (в/б) [90].

Ещё одним перспективным индолилглиоксалимидным лигандом TSPO является соединение MPIGA [91]. Это соединение, обладая хорошим лигандным профилем, показало способность активировать биосинтез как прегненолона, так и его метаболитов прогестерона и аллопрегнанолона, которые являются основными положительными аллостерическими модуляторами ГАМКА-рецептора в клетках астроцитомы человека линии ADF. Также MPIGA через активацию стероидогенеза усиливал захват анионов $^{36}\text{Cl}^-$ в синапто-нейросомах коры головного мозга. Установлено, что MPIGA проявляет выраженный анксиолитический эффект у крыс в тесте ПКЛ в дозе 30 мг/кг при внутрибрюшинном введении, увеличивая процент заходов в открытые рукава лабиринта и время пребывания в них [91].

В 1998 году *Liao Y, et al.* представили класс аналогов индольных лигандов TSPO на базе бензофуранового гетероцикла [92], созданных методом структурной аналогии. За прототип новых структур была взята молекула FGIN-1-27. Было установлено, что бензофурановый аналог FGIN-1-27 **BZF-4b** проявляет хорошие лигандные и фармакологические свойства, сопоставимые с эффектами прототипа. Это соединение так же, как и FGIN-1-27, показало наномолярную аффинность

к TSPO и высокую селективность. У **BZF-4b** в дозе 25 мг/кг (п/о) была выявлена выраженная антинеофобическая активность: соединение значимо увеличивало количество заходов крыс в открытые рукава лабиринта и процент времени пребывания в открытых рукавах [92].

Ferzaz B, et al. в 2002 году был представлен алпидем-родственный лиганд TSPO SSR180575 – представитель группы пиридазиноиндолов [93]. В работе не представлен подход к конструированию данной молекулы, однако по её структуре можно предположить, что в дизайне соединения использовался метод структурной аналогии. Высокоаффинное и селективное соединение SSR180575 показало способность существенно увеличивать уровень прегненолона в мозге и седалищном нерве. SSR180575 проявило нейропротективные и нейрогенеративные свойства на модели нейродегенерации двигательного нерва при аксотомии лицевого нерва у молодых крыс и на модели neuropathic pain, индуцированной акриламидом, у крыс [93]. В 2007 году компанией Sanofi–Aventis была инициирована II стадия клинических исследований SSR180575 в качестве средства для регенерации эпидермальных нервных волокон у больных с периферической диабетической neuropathic pain (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00502515). Результаты не представлены, КИ завершено в 2009.

Группой Капелли с соавторами была предложена группа пирролохинолиновых лигандов TSPO [94, 95]. В дизайне нового класса был применен метод структурного комбинирования препаратов алпидема и зопиклона (рис. 21). Алпидем, как уже было отмечено выше, обладает высоким сродством как к TSPO, так и к CBR, в то время как зопиклон обладает высокой аффинностью по отношению к CBR, однако его сродство к TSPO минимально. В конструировании новой группы авторы использовали подход по построению селективных лигандов из неселективных родоначальных молекул. В процессе комбинирования алпидема

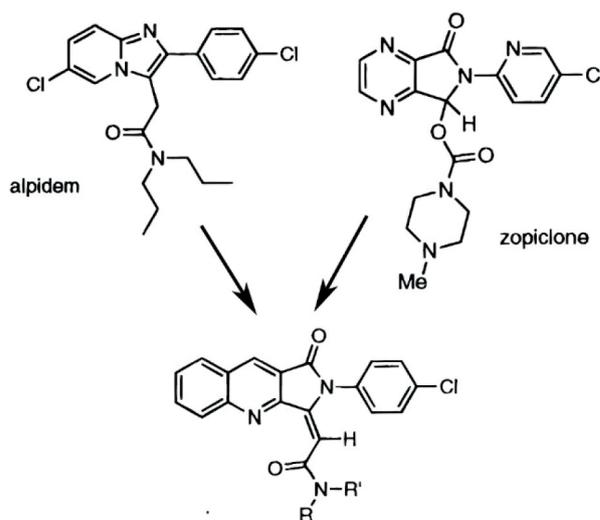


Рис. 21. Дизайн пирролохинолиновых лигандов TSPO путём комбинирования структур алпидема и зопиклона

и зопиклона оставалось минимальное количество функций, ответственных за связывание с обоими рецепторами, варьируя геометрию и липофильность боковых цепей. Кроме того, сродство молекул к TSPO увеличивалось путём добавления конденсированного бензольного кольца.

Среди серии полученных соединений были выявлены структуры с отличными лигандными характеристиками. Одной из наиболее высокоаффинных молекул явилось соединение **PRQ-4e**. Исследования влияния данных соединений на нейростероидогенез и *in vivo* активность не проводилось.

В 2011 году *Cappelli A, et al.* описали группу пиразолохинолиновых лигандов TSPO, сконструированных методом фармакофорного комбинирования с использованием молекул эмапунила, SSR180575 и пирролохинолинов в качестве модельных структур (рис. 22) [96].

Наибольший потенциал по соотношению *in vitro* и *in vivo* активности среди новой группы продемонстрировало соединение **PZQ-10t**. Оно обладает наномолярной аффинностью к TSPO и показало анксиолитическую активность в тесте светло-тёмная камера (в дозах 3,0 и 10 мг/кг, п/о) на мышах и нейропротективную активность в модели мононевропатии (в дозах 5,0 и 50 мг/кг, п/о) на крысах [96].

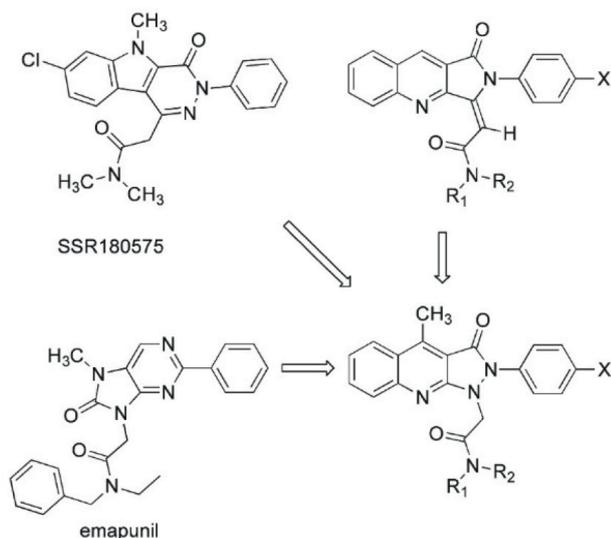


Рис. 22. Дизайн пиразолохинолиновых лигандов TSPO путём комбинирования структур эмапунила, SSR180575 и пирролохинолиновых лигандов

Одним из лигандов TSPO, использующихся в клинике, является препарат Этифоксин – производное бензоксазинов. Этот препарат был разработан немецкой компанией Hoechst AG ещё в 1960-х годах, и его лигандные свойства к TSPO были выявлены существенно позднее. Этифоксин используется в качестве небензодиазепинового анксиолитического и антиконвульсивного средства в виде таблеток, содержащих 50 мг активного вещества. Этот препарат имеет комплексный механизм действия, сочетающий его взаимодействие как с TSPO, так и с ГАМКА-рецептором [97, 98].

Этифоксин увеличивает концентрации нейростероидов (прегненолона, прогестерона, 5-дигидропрогестерона и аллопрегнанола) в мозге и в плазме крыс. При этом финастерид, один из ингибиторов биосинтеза нейростероидов, ослабляет антиконфликтное действие этифоксина [98]. В работе *Wolf L, et al.* было отмечено, что несмотря на не очень высокие лигандные свойства этифоксина к TSPO, он существенно лучше активирует нейростероидогенез, чем пуриновый высокоаффинный лиганд AC-5216 [74]. Угале с использованием ингибиторного анализа показал, что анксиолитический эффект этифоксина у крыс в тесте ПКЛ обусловлен способностью этого препарата активировать биосинтез нейростероида аллопрегнанола [99].

Показано, что этифоксин благодаря своим лигандным свойствам к TSPO снимает симптомы невропатической боли у крыс за счёт своей способности активировать образование 3-восстановленных нейростероидов [100]. Этифоксин доказал свою эффективность в клинике в качестве препарата для лечения тревожных расстройств. По выраженности действия этифоксин демонстрирует активность, сопоставимую с бензодиазепином лоразепамом [101].

Гетероциклические и пептидные лиганды TSPO, разработанные в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова

В начале 2010-х годов *Mokrov GV, et al.* впервые в России разработали группу лигандов TSPO на базе пирроло[1,2-а]пиразина [102]. В дизайне этой группы использовался фармакофор, предложенный *Wermuth CG* [58, 82], и метод молекулярного докинга. Использование последнего оказалось возможным вследствие расшифровки в 2014 году трёхмерной структуры TSPO мыши (PDB ID: 2MGY) [2]. Кроме того, была учтена взаимосвязь структуры и аффинности известных лигандов TSPO с учётом полиморфизма этого белка [9, 11].

На рис. 23 представлена схема соответствия новых пирроло[1,2-а]пиразинных лигандов классическому фармакофору [58, 82]. Молекула лиганда содержит необходимые фармакофорные элементы: плоский ароматический гетероцикл (ПАГ), ароматический заместитель (АЗ), карбонильную группу (КГ) и липофилизированную амидную группу (ЛАГ).

Методом молекулярного докинга с использованием программ AutoDock 4.2. и Glide Schrödinger была показана высокая теоретическая аффинность представителей предложенной группы соединений, и был определён набор наиболее перспективных молекул (рис. 24).

Дизайн новых молекул позволил создать высокоаффинные и селективные к TSPO лиганды, среди которых для дальнейшей разработки было отобрано соединение ГМЛ-1 (*N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-а]пиразин-3-карбоксамид). Радиолигандным методом было подтверждено, что ГМЛ-1 обладает высокой аф-

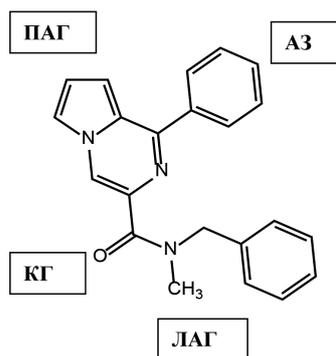


Рис. 23. Соответствие производных пирроло[1,2-а]пирозина «классической» фармакофорной модели строения лигандов TSPO на примере соединения ГМЛ-1

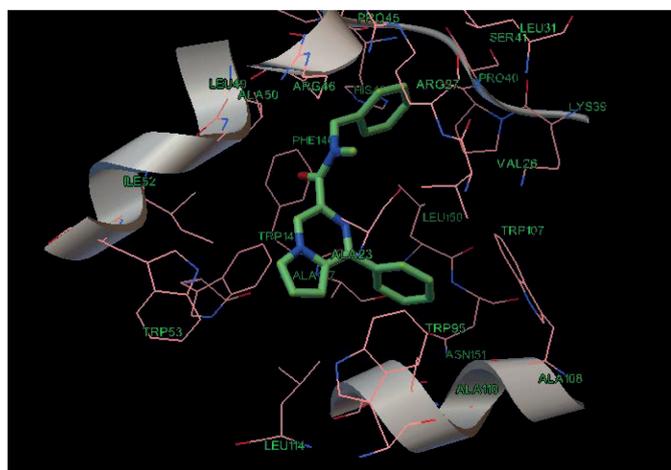


Рис. 24. Докинг молекулы ГМЛ-1 в активный центр TSPO

финностью по отношению к TSPO ($IC_{50} = 5,4 \cdot 10^{-8}$ М) и селективностью в сравнении с CBR ($IC_{50} > 10^{-6}$ М) [102].

В экспериментах *in vivo* в стандартных тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле со световой вспышкой» на грызунах было продемонстрировано, что ГМЛ-1 в интервале доз 0,05–5,0 мг/кг обладает анксиолитической активностью как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении. По выраженности анксиолитического эффекта ГМЛ-1 не уступал классическому транквилизатору диазепаму в дозе 1,0 мг/кг. При этом установлено, что ГМЛ-1 не обладал характерными для диазепама седативным, миорелаксантным и амнестическим побочными эффектами [103, 104]. С помощью ингибиторного анализа доказано, что механизм анксиолитического действия соединения ГМЛ 1 обусловлен его взаимодействием с TSPO. Селективный блокатор TSPO, соединение РК11195, полностью блокировал анксиолитический эффект ГМЛ-1 [104].

В пользу этого же механизма говорит то, что анксиолитическое действие ГМЛ-1 полностью блокировали ингибиторы биосинтеза нейростероидов трилостан (ингибитор 3-гидроксистероиддегидрогеназы) и фи-

настерид (ингибитор 5-редуктазы) [105]. Как известно, TSPO участвует в лимитирующей стадии синтеза нейростероидов – транспорте холестерина в митохондрии [1].

Установлено, что ГМЛ-1 обладает антидепрессивной активностью в дозе 0,5 мг/кг (в/б) при субхроническом введении [106]. Кроме того, у ГМЛ-1 выявлена ноотропная активность: в диапазоне доз 0,05–0,5 мг/кг (в/б) это соединение достоверно противодействует нарушению рабочей памяти у крыс, индуцированному скополамином, в тесте распознавания нового объекта [106].

ГМЛ-1 обладает низкой острой токсичностью, $LD_{50} > 1000$ мг/кг [104]. Фармакокинетические исследования субстанции ГМЛ-1 на крысах при внутрибрюшинном и при пероральном введении с использованием метода ВЭЖХ/МС показали, что проникает через ГЭБ. Концентрации ГМЛ-1 в образцах плазмы крови практически не меняются в течение 6 часов после введения и соединение определяется в крови в течение 10 часов.

Для ГМЛ-1 как перспективного быстродействующего анксиолитика без побочных эффектов в рамках программы Фарма-2020 проведён полный цикл доклинических исследований.

Дипептидные лиганды TSPO

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в 2015 г. были созданы первые в мире дипептидные лиганды TSPO [107, 108].

Для получения дипептидных лигандов TSPO использовали предложенную Гудашевой Т.А. оригинальную стратегию создания коротких пептидов с заданной фармакологической активностью на основе структур непептидных фармакологически активных соединений [109–111]. Эта стратегия базируется на концепции, что многие нейропсихотропные лекарственные вещества, открытые в свое время с помощью скрининга или эвристически, являются лигандами нейропептидных рецепторов. Молекулярная масса синтетических нейропсихотропных лекарств редко превосходит 500 Да. Такой молекулярной массе соответствуют ди- и трипептиды.

Для создания дипептидного лиганда TSPO в качестве непептидного прототипа использовали анксиолитик алпидем, который связывается с TSPO с наномолярной аффинностью, стимулирует стероидогенез и проявляет анксиолитическую активность в эксперименте и в клинике [95] (рис. 25). Это соединение содержит два ароматических ядра – фенильное и бициклическое азотсодержащее – и разветвленную алифатическую цепь. Эти фрагменты могут имитировать боковые радикалы таких аминокислот, как фенилаланин, триптофан, лейцин или изолейцин соответственно. Кроме того, в структуру алпидема входит амидная группа, возможный прототип пептидной связи. Отметим, что подавляющее большинство существующих непептидных лигандов TSPO построены по той же структурной схеме, что и алпидем. Был сконструирован пептидный топологический аналог алпидема, представляющий собой

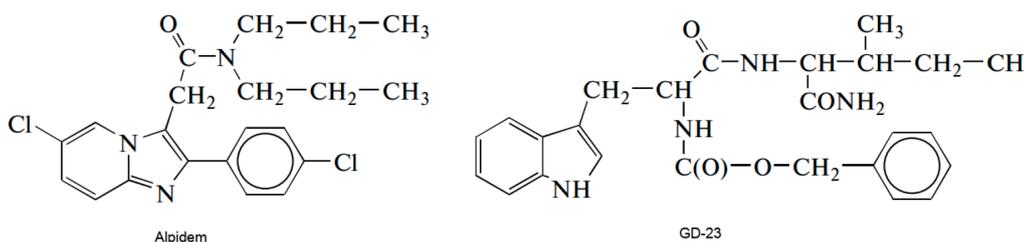


Рис. 25. Дизайн дипептидного лиганда TSPO ГД-23 на основе структуры алпидема

амид N-карбобензокси-L-триптофанил-L-изолейцина (ГД-23) [107].

Сконструированное соединение, как и алпидем, содержит два ароматических и один алифатический фармакофоры, сходным образом расположенные в пространстве относительно друг друга по данным молекулярного моделирования с помощью моделей Дрейдинга. Данные, полученные с помощью докинга молекул алпидема и ГД-23 в активный центр рецептора, подтверждают хорошее совпадение структур этих молекул в пространстве (рис. 26).

Для проведения докинга были сделаны следующие предположения: стехиометрия взаимодействия белок-лиганд составляет 1:1, дипептидный лиганд интегрирован в сайт связывания РК11195.

По результатам докинга были выявлены практически идентичные «связанные» конформации, оптимальные или близкие к оптимальным по энергии. Для анализа были выбраны комплексы с наименьшей расчётной энергией связывания. Результаты конформационного анализа выявили, что фенильные фрагменты ГД-23 и алпидема участвуют в π - π -стекинге с Trp143. Можно предположить, что π - π -стекинг с Trp143 имеет

решающее значение для связывания лиганда в активном центре TSPO, поскольку для контрольного лиганда РК 11195 также наблюдалось образование π - π -стекинга с Trp143. ГД-23 образует водородную связь между NH-группой индольного кольца и карбоксильной группой Pro44, также ГД-23 образует ароматическую водородную связь между двумя СН-группами индольного кольца и карбоксильной группой Val26.

Соединение ГД-23 проявило анксиолитическую активность в дозах 0,05-5,0 мг/кг внутривенно в стандартных фармакологических тестах открытого поля (ОП) со световой вспышкой на мышах-самцах линии Valb/C и приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) на беспородных мышах-самцах линии CD1. Активность сохранялась и при пероральном использовании.

Предварительное введение классического антагониста TSPO РК11195 полностью блокировало анксиолитический эффект ГД-23: показатели поведения животных этой группы оставались на уровне контроля и в то же время с высокой достоверностью отличались от показателей мышей группы, получавшей ГД-23 без ингибитора. Эти данные свидетельствуют о зависимости анксиолитического эффекта ГД-23 от взаимодействия с TSPO.

Установлено, что анксиолитическое действие ГД-23 зависит от биосинтеза нейростероидов. Предварительное введение ингибиторов ферментов нейростероидогенеза трилостана и финастериды предотвращало анксиолитический эффект ГД-23 [112].

Таким образом, можно заключить, что фармакологически доказана зависимость анксиолитического действия лиганда TSPO ГД-23 от биосинтеза нейростероидов. Структура ГД-23 может послужить отправной точкой для выявления эндогенных пептидных регуляторов TSPO, а синтезированный дипептид ГД-23 может стать основой для создания нового класса небензодиазепиновых быстродействующих анксиолитиков – лигандов TSPO.

Для ГД-23 была выявлена ноотропная активность: в дозах 0,05-0,5 мг/кг внутривенно он противодействует скополаминовой амнезии в тесте распознавания нового объекта у крыс, при этом антагонист TSPO РК11195 полностью блокировал этот эффект ГД-23

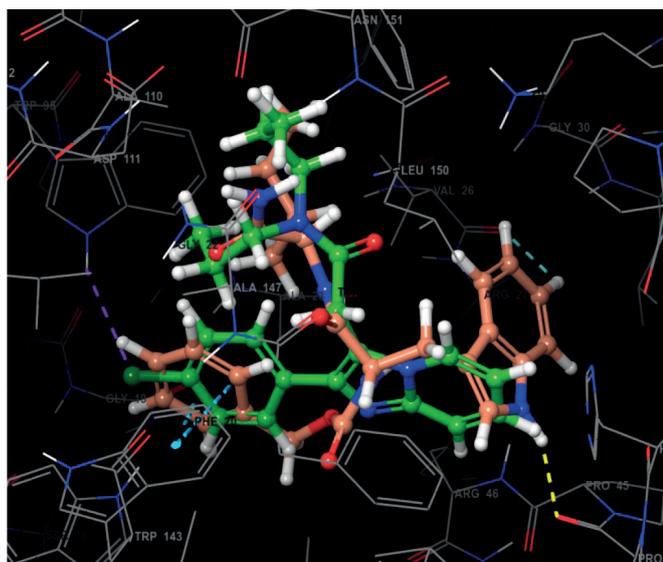


Рис. 26. Положение ГД-23 и алпидема в активном центре TSPO-рецептора

[113]. Таким образом, как и в случае анксиолитического эффекта, ноотропный эффект ГД-23 обусловлен его взаимодействием с TSPO.

Изучение связи структуры и анксиолитической активности в ряду аналогов ГД-23 показало, что уход от природной L-конфигурации любого аминокислотного остатка (L,D и D,L- диастереомеры соответственно) приводил к полной потере активности. 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 $\text{Ph}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{-L-Trp-L-IleNH}_2$, где $n = 1, n = 2, n = 5$. При сохранении расстояния от фенильной группы до остатка триптофана с заменой карбобензоксигруппы (ГД-23) на фенилпропионильную группу ($n = 2$) активность сохранялась. В то же время укорочение этого расстояния даже на 1 сигма-связь ($n = 1$) приводило к полному исчезновению, а удлинение его — к резкому уменьшению активности ($n = 5$). Замена амида на C-конце дипептида ГД-23 на метиловый эфир или метиламид приводила к потере активности, тогда как при переходе к соединению со свободной карбоксильной группой наблюдалось только уменьшение активности. Таким образом, изучение связи структуры и активности показало, что для проявления активности критичным является расстояние между двумя ароматическими группами и природная конфигурация аминокислотных остатков. Последнее свидетельствует в пользу того, что полученный дипептидный лиганд может быть близок к эндогенному лиганду TSPO.

Создание дипептидных лигандов TSPO открывает новый уровень безопасности потенциальных нейропсихотропных препаратов, так как дипептиды, метаболизующиеся до природных аминокислот, обладают чрезвычайно низкой токсичностью. Будучи близкими к эндогенным лигандам, они обладают более высокой селективностью и, следовательно, меньшим числом побочных эффектов.

Заключение

Анализ литературы, посвящённой рецептору TSPO и его лигандам, свидетельствует, что этот белок в на-

стоящее время рассматривается в качестве одной из наиболее перспективных мишеней при поиске новых анксиолитических и других нейропсихотропных средств. За последние 25 лет создано порядка 20 различных классов лигандов TSPO, среди которых выявлено достаточно много молекул, обладающих анксиолитической, антидепрессивной, нейропротективной и ноотропной активностью в ряде моделей *in vivo*. В то же время, на сегодняшний день ни один из лигандов TSPO не выведен в клиническую практику в качестве препарата, что актуализирует дальнейшую разработку данной тематики по поиску клинически эффективных соединений с учётом широкого спектра необходимых требований к активности, безопасности, фармакокинетики и прочих показателей молекул.

Одним из важных выводов данного обзора является наблюдение того факта, что во многих исследованиях по поиску активных лигандов TSPO было выявлено отсутствие корреляции между значениями аффинности и селективности лигандов к TSPO *in vitro* и стероидогенной активностью или активностью в экспериментах *in vivo*. Это свидетельствует о том, что процесс дизайна и разработки новых лигандов TSPO, перспективных в качестве нейропсихотропных средств, должен включать не только анализ аффинности и селективности молекул, но и ряд других показателей, таких как растворимость, липофильность, метаболическая устойчивость, способность проникать через гемато-энцефалический барьер и ряд других. Кроме того, необходимо учитывать наличие TSPO-полиморфизма, за счёт которого один и тот же лиганд этого рецептора может оказывать эффекты различной степени выраженности. Перечисленные требования были использованы при разработке инновационных лигандов TSPO в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», в результате чего были получены две перспективные группы: пирроло[1,2-а]пиразиновые и дипептидные лиганды. Результаты *in vitro*, *in vivo*-экспериментов, токсикологические и фармакокинетические показатели свидетельствуют, что лидеры данных групп имеют значительный шанс стать первыми в классе лигандами TSPO, обладающими клинической эффективностью в качестве анксиолитических средств.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 17-04-00861 А.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мокров Григорий Владимирович
 Автор, ответственный за переписку
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-2617-0334
 SPIN-код: 8755-7666
 к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Деева Ольга Алексеевна
 ORCID: 0000-0002-9842-1545
 SPIN-код: 8877-9489
 н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» Москва

Яркова Милада Альнордовна
 ORCID: 0000-0002-2877-5786
 SPIN-код: 5118-1530
 д. м. н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Гудашева Татьяна Александровна
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN-код: 4970-0006
 д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН, Руководитель отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Середенин Сергей Борисович
 ORCID: 0000-0003-4482-9331
 SPIN-код: 3896-4655
 д. м. н., профессор, академик РАН, Научный руководитель Института, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Mokrov Grigory
 Corresponding author
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID: 0000-0003-2617-0334
 SPIN-code: 8755-7666
 Candidate of Chemical Sciences
 Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department. FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Deeva Olga
 ORCID: 0000-0002-9842-1545
 SPIN-code: 8877-9489
 Researcher of the peptide bio regulators laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Yarkova Milada
 ORCID: 0000-0002-2877-5786
 SPIN-code: 5118-1530
 doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy Director for Science FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Gudasheva Tatiana
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN-code: 4970-0006
 doctor of biological Sciences, professor, RAS corresponding member Head of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Seredenin Sergey
 ORCID: 0000-0003-4482-9331
 SPIN-code: 3896-4655
 doctor of Medical Sciences, Professor, academician of RAS Scientific leader of FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Papadopolous V, Baraldi M, Guilarte TR, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006;27(8):402–409. DOI: 10.1016/j.tips.2006.06.005
- Jaremko L, Jaremko M, Giller K, et al. Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand. *Science.* 2014;343:1363–1366. DOI: 10.1126/science.1248725
- Li F, Liu J, Liu N, et al. Translocator protein 18 kDa (TSPO): an old protein with new functions? *Biochemistry.* 2016;24;55(20):2821–2831. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00142
- Jaremko L, Jaremko M, Giller K, et al. Conformational Flexibility in the Transmembrane Protein TSPO. *Chemistry-A European Journal.* 2015;9;21(46):16555–16563. DOI: 10.1002/chem.201502314
- Guo YZ, Kalathur RC, Liu Q, et al. Structure and activity of tryptophan-rich TSPO proteins. *Science.* 2015;30;347(6221):551–555. DOI: 10.1126/science.aaa1534

- Li F, Liu J, Zheng Y, et al. Crystal structures of translocator protein (TSPO) and mutant mimic of a human polymorphism. *Science.* 2015;30;347(6221):555–558. DOI: 10.1126/science.1260590
- Korkhov VM, Sachse C, Short JM, et al. Three-dimensional structure of TSPO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Structure.* 2010;9;18(6):677–687. DOI: 10.1016/j.str.2010.03.001
- Li H, Papadopolous V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology.* 1998;139:4991–4997. DOI: 10.1210/endo.139.12.6390
- Owen DR, Gunn RN, Rabiner EA, et al. Mixed-affinity binding in humans with 18-kDa translocator protein ligands. *J. Nucl. Med.* 2011;52:24–32. DOI: 10.1007/s40336-015-0141-z
- Owen DR, Lewis AJ, Reynolds R, et al. Variation in binding affinity of the novel anxiolytic XBD173 for the 18 kDa translocator protein in human brain. *Synapse.* 2011;65:257–259. DOI: 10.1002/syn.20884
- Owen DR, Yeo AJ, Gunn RN, et al. An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32:1–5. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.147

12. Lacapere JJ, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 2003; 68:569–585. DOI: 10.1016/S0039-128X(03)00101-6
13. Casellas P, Galieue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem. Int.* 2002;40:475–486. DOI: 10.1016/S0197-0186(01)00118-8
14. Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* 1999;51:629–650.
15. Anholt RR, Murphy KM, Mack GE, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J. Neurosci.* 1984;4:593–603. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.04-02-00593.1984
16. Bolger GT, Mezey E, Cott J, et al. Differential regulation of 'central' and 'peripheral' benzodiazepine binding sites in the rat olfactory bulb. *Eur. J. Pharmacol.* 1984;105:143–148. DOI: 10.1016/0014-2999(84)90658-7
17. Jayakumar AR, Panickar KS, Norenberg MD. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J. Neurochem.* 2002;83:1226–1234. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.01261.x
18. Karchewski LA, Bloechlinger S, Woolf CJ. Axonal injury-dependent induction of the peripheral benzodiazepine receptor in small-diameter adult rat primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2004;20:671–683. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03530.x
19. Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, et al. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*. 1997;62:21–28. DOI: 10.1016/S0039-128X(96)00154-7
20. Hirsch JD, Beyer CF, Malkowitz L, et al. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control. *Mol. Pharmacol.* 1989;35:157–163.
21. Corsi L, Geminiani E, Baraldi M. Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) new insight in cell proliferation and cell differentiation review. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2008;3:38–45. DOI: 10.2174/157488408783329878
22. Veenman L, Papadopoulos V, Gavish, M. Channellike functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13:2385–2405. DOI: 10.2174/138161207781368710
23. Papadopoulos V, Liu J, Culty M. Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007;269:59–64. DOI: 10.1016/j.mce.2006.12.004
24. Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, et al. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:588–594. DOI: 10.1210/me.2004-0308
25. Murail S, Robert JC, Coic YM, et al. Secondary and tertiary structures of the transmembrane domains of the translocator protein TSPO determined by NMR. Stabilization of the TSPO tertiary fold upon ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1778:1375–1381. DOI: 10.1016/j.bbame.2008.03.012
26. Papadopoulos V, Aghazadeh Y, Fan J, et al. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2015;408:90–98. DOI: 10.1016/j.mce.2015.03.014
27. Rone MB, Midzak AS, Issop L, et al. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 2012; 26:1868–1882. DOI: 10.1210/me.2012-1159
28. Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, et al. Translocator protein (18 kDa)(TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat. rev. Drug discov.* 2010;9(12):971–988. DOI: 10.1038/nrd3295
29. Bordet T, Buisson B, Michaud M, et al. Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;322(2):709–720. DOI: 10.1124/jpet.107.123000
30. Snyder SH, Verma A, Trifiletti RR. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *FASEB J.* 1987;1(4):282–288. DOI: 10.1096/fasebj.1.4.2820823
31. Verma A, Nye JS, Snyder SH. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *PNAS.* 1987;84(8):2256–2260. DOI: 10.1073/pnas.84.8.2256
32. Verma A, Snyder SH. Peripheral type benzodiazepine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989;29:307–322. DOI: 10.1146/annurevpharmtox.29.1.307
33. Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, et al. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on BDZ receptors. *PNAS* 1983;80:3531–3533. DOI: 10.1073/pnas.80.11.3531
34. Bovolin P, Schlichting J, Miyata J, et al. Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regul. Peptides.* 1990;29:267–281. DOI: 10.1016/0167-0115(90)90089-f
35. Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, et al. Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *PNAS.* 1986;83:827–831. DOI: 10.1073/pnas.83.3.827
36. Slobodyansky E, Guidotti A, Wambebe C, et al. Isolation and characterization of a rat brain triakontatetrapeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro5-4864 recognition site. *J. Neurochem.* 1989;53:1276–1284. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1989.tb07425.x
37. Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, et al. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology.* 1991;129(3):1481–1488. DOI: 10.1210/endo-129-3-1481
38. Li H, Degahardt B, Tobin D, et al. Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. *Mol. Endocrinology.* 2001;15:2211–2228. DOI: 10.1210/me.15.12.2211
39. Fan J, Liu J, Culty M, et al. Acylcoenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): an emerging signaling molecule. *Prog. Lipid. Res.* 2010;49:218–234. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.12.003
40. Liu J, Rone MB, Papadopoulos V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2006;281:38879–38893. DOI: 10.1074/jbc.M608820200
41. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. *PNAS* 1977;74:3805–3809. DOI: 10.1073/pnas.74.9.380
42. Gavioli EC, Duarte FS, Bressan E, et al. Antidepressant-like effect of Ro5-4864, a peripheral-type benzodiazepine receptor ligand, in forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;471:21–26. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01789-8
43. Barron AM, Garcia-Segura LM, Caruso D, et al. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2013;33(20):8891–8897. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1350-13.2013
44. Mills C, Makwana M, Wallace A, et al. Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27:937–946. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06065.x
45. Leonelli E, Yague JG, Ballabio M, et al. Ro5-4864, a synthetic ligand of peripheral benzodiazepine receptor, reduces aging-associated myelin degeneration in the sciatic nerve of male rats. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2005;126:1159–1163. DOI: 10.1016/j.mad.2005.06.001
46. Soustiel J.F, Zaaroor M, Vlodavsky E, et al. Neuroprotective effect of Ro5-4864 following brain injury. *Exp. Neurol.* 2008;214:201–208. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.04.078
47. Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura, LM. Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 2005;80:129–137. DOI: 10.1002/jnr.20430
48. Giatti S, Pesaresi M, Cavaletti G, et al. Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18 kDa (Ro5-4864) in experimental diabetic neuropathy. *Neuroscience.* 2009;164: 520–529. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.005
49. Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. *Life Sciences.* 1983;32(16): 1839-1847. DOI: 10.1016/0024-3205(83)90062-0
50. Selleri S, Bruni F, Costagli C, et al. 2-Arylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-ylacetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 2001;9: 2661–2671. DOI: 10.1016/S0968-0896(01)00192-4
51. Li-Ming Zhang, Nan Zhao, Wen-Zhi Guo, et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa). *Neuropharmacology.* 2014;81:116–125. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.09.016
52. Li-Ming Zhang, Zhi-Kun Qiu, Nan Zhao, et al. Anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) in animal models of post-traumatic stress disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;17:1659–1669. DOI: 10.1017/S1461145714000479
53. Kozikowski AP, Brewer J, Sun S, et al. Chemistry, binding affinities, and behavioral properties of a new class of "antineophobic" mitochondrial DBI receptor complex (mDRC) ligands. *J. Med. Chem.* 1993;36:2908–2920. DOI: 10.1021/jm00072a010

54. Kita A, Kohayakawa H, Kinoshita T, et al. Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142:1059–1072. DOI .org/10.1038/sj.bjp.0705681
55. Zivkovic B, Morel E, Joly D, et al. Pharmacological and behavioral profile of alpidem as an anxiolytic. *Synthelabo Recherche, L.E.R.S., Bagneux, France*. 1990;23S.3:108–113. DOI: 10.1055/s-2007-1014545
56. Kaplan JP, George P. US Patent 4382938 A, 1983.
57. Langer SZ, Arbilla S, Benavides J, et al. Zolpidem and alpidem: two imidazopyridines with selectivity for omega 1- and omega 3-receptor subtypes. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1990;46:61–72.
58. Bourguignon JJ. Endogenous and synthetic ligands of mitochondrial benzodiazepine receptors: structure-affinity relationships. In *Peripheral benzodiazepine receptors*. Giesen-Crouse, E.; Ed.; Academic Press: London; 1993. p. 59–85.
59. Barki J, Larrey D, Pageaux G, et al. Fatal subfulminant hepatitis during treatment with alpidem (Ananxyl). *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1993;17:872–874.
60. Baty V, Denis B, Goudot B, et al. Hepatitis induced by alpidem (Ananxyl). Four cases, one of them fatal. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1994;18:1129–1131.
61. Ausset P, Malavialle P, Vallet A, et al. Subfulminant hepatitis caused by alpidem and treated by liver transplantation. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1995;19:222–223.
62. Fiorini I, Nacci V, Ciani SM, et al. Novel ligands specific for mitochondrial benzodiazepine receptors: 6-arylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepine derivatives. Synthesis, structure-activity relationships, and molecular modelling studies. *J. Med. Chem.* 1994;37:1427–1438. DOI .org/10.1021/jm00036a007
63. Greco G, Novellino E, Fiorini I, et al. Comparative molecular field analysis model for 6-arylpyrrolo[2,1-d][1,5]benzothiazepines binding selectively to the mitochondrial benzodiazepine receptor. *J. Med. Chem.* 1994;37:4100–4108. DOI .org/10.1021/jm00050a007
64. Campiani G, Ramunno A, Fiorini I, et al. New pyrrolbenzothiazepine derivatives as molecular probes of the "peripheral-type" benzodiazepine receptor (PBR) binding site. *Eur. J. Med. Chem.* 1997;32:241–252. DOI .org/10.1016/s0223-5234(97)83975-x
65. Campiani G, Ramunno A, Fiorini I, et al. Synthesis of new molecular probes for investigation of steroid biosynthesis induced by selective interaction with peripheral type benzodiazepine receptors (PBR). *J. Med. Chem.* 2002;45:4276–4281. DOI .org/10.1021/jm0208491
66. Okuyama S, Chaki S, Yoshikawa R, et al. Neuropharmacological profile of peripheral benzodiazepine receptor agonists, DAA1097 and DAA1106. *Life Sci.* 1999;64:1455–1464. DOI .org/10.1016/s0024-3205(99)00079-x
67. Okubo T, Yoshikawa R, Chaki S, et al. Design, synthesis and structure-activity relationships of aryloxyanilide derivatives as novel peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 2004;12:423–438. DOI .org/10.1016/j.bmc.2003.10.050
68. Chaki S, Funakoshi T, Yoshikawa R, et al. Binding characteristics of [3H]DAA 1106, a novel and selective ligand for peripheral benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 371:197–204. DOI .org/10.1016/s0014-2999(99)00118-1
69. Briard E, Zoghbi SS, Siméon FG, et al. Single-step high-yield radiosynthesis and evaluation of a sensitive 18F-labeled ligand for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors with PET. *J. Med. Chem.* 2009;52:688–699. DOI: 10.1021/jm8011855
70. Kita A, Furukawa K. Involvement of neurosteroids in the anxiolytic-like effects of AC-5216 in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2008;171–178. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.12.006
71. Kita A, Kinoshita T, Kohayakawa H, et al. Lack of tolerance to anxiolysis and withdrawal symptoms in mice repeatedly treated with AC-5216, a selective TSPO ligand. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2009;33:1040–1045. DOI:10.1016/j.pnpbp.2009.05.018.
72. Rupperecht R, Rammes G, Eser D, et al. Translocator protein (18 kDa) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. *Science*. 2009;325:490–493. DOI: 10.1126/science.1175055
73. Qiu ZK, Zhang LM, Zhao N, et al. Repeated administration of AC-5216, a ligand for the 18 kDa translocator protein, improves behavioral deficits in a mouse model of post-traumatic stress disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2013; 45:40–46. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.04.010
74. Wolf L, Bauer A, Melchner D, et al. Enhancing neurosteroid synthesis – relationship to the pharmacology of translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligands and benzodiazepines. *Pharmacopsychiatry*. 2015;48:72–77. DOI: 10.1055/s-0034-1398507
75. Wang DS, Tian Z, Guo YY, et al. Anxiolytic-like effects of translocator protein (TSPO) ligand ZBD-2 in an animal model of chronic pain. *Molecular Pain*. 2015;11–16. DOI: 10.1186/s12990-015-0013-6
76. Li XB, Guo HL, Shi TY, et al. Neuroprotective effects of a novel translocator protein (18 kDa) ligand, ZBD2, against focal cerebral ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015; 42(10):1068–1074. DOI: 10.1111/1440-1681.12460
77. Fukaya T, Kodo T, Ishiyama T, et al. Design, synthesis and structure-activity relationships of novel benzoxazolone derivatives as 18 kDa translocator protein (TSPO) ligands. *Bioorg. & Med. Chem.* 2012;20:5568–5582. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.07.023
78. Anzini M, Capelli A, Vomero S, et al. Mapping and Fitting the peripheral benzodiazepine receptor binding site by carboxamide derivatives. comparison of different approaches to quantitative ligand-receptor interaction modeling. *J. Med. Chem.* 2001;44:1134–1150. DOI .org/10.1021/jm0009742
79. Cappelli A, Mohr GP, Gallelli A, et al. Structure-activity relationships in carboxamide derivatives based on the targeted delivery of radionuclides and boron atoms by means of peripheral benzodiazepine receptor ligands. *J. Med. Chem.* 2003;46:3568–3571. DOI: 10.1021/jm034068b
80. Castellano S, Taliani S, Viviano M, et al. Structure activity relationship refinement and further assessment of 4-phenylquinazoline-2-carboxamide translocator protein ligands as antiproliferative agents in human glioblastoma tumors. *J. Med. Chem.* 2014;57:2413–2428. DOI: 10.1021/jm401721h
81. Trapani G, Franco M, Ricciardi L, et al. Synthesis and binding affinity of 2-Phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives for both central and peripheral benzodiazepine receptors. a new series of high-affinity and selective ligands for the peripheral type. *J. Med. Chem.* 1997;40:3109–3118. DOI .org/10.1021/jm970112+
82. Lentini G, Bourguignon JJ, Wermuth CG. Ligands of the peripheral-type benzodiazepine binding site (PBS): structure-activity relationships and computer-aided conformational analysis. In *QASAR: Rational Approaches to the Design of Bioactive Compounds*; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam; 1991. p. 257–260.
83. Tebib S, Bourguignon JJ, Wermuth CG. The active analogue approach applied to the pharmacophore identification of benzodiazepine receptor ligands. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1987;1:153–170. DOI .org/10.1007/bf01676959
84. Serra M, Madau P, Chessa MF, et al. 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *British Journal of Pharmacology*. 1999;127:177–187. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702530
85. James ML, Fulton RR, Vercoullie J, et al. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(5):814–822. DOI: 10.2967/jnumed.107.046151
86. Leaver KR, Reynolds A, Bodard S, et al. Effects of translocator protein (18 kDa) ligands on microglial activation and neuronal death in the quinolinic-acid-injected rat striatum. *ACS Chem. Neurosci.* 2012;3:114–119. DOI: 10.1021/cn200099e
87. Romeo E, Auta J, Kozikowski A, et al. 2-Aryl-3-indoleacetamides (FGIN-1): a new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor (MDR). *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* 1992;262:971–978.
88. Auta J, Romeo E, Kozikowski A, et al. Participation of mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anticonflict, antineophobic and anticonvulsant action of 2-aryl-3-indoleacetamide and imidazopyridine derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993;265:649–656.
89. Bitran D, Foley M, Audette D, et al. Activation of peripheral mitochondrial benzodiazepine receptors in the hippocampus stimulates allopregnanolone synthesis and produces anxiolytic-like effects in the rat. *Psychopharmacology*. 2000;151:64–71. DOI .org/10.1007/s002130000471
90. Da Settimo F, Simorini F, Taliani S, et al. Anxiolytic like effects of N,N-Dialkyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides by modulation of translocator protein promoting neurosteroid biosynthesis. *J. Med. Chem.* 2008;51:5798–5806. DOI: 10.1021/jm8003224
91. Costa B, Da Pozzo E, Chelli B, et al. Anxiolytic properties of a 2-phenylindolglyoxylamide TSPO ligand: Stimulation of in vitro neurosteroid production affecting GABAA receptor activity. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36:463–472. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2010.07.021
92. Liao Y, Kozikowski A, Guidotti A, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of benzofuran-acetamides as "antineophobic" mitochondrial DBI receptor complex ligands. *Bioorg. Med. Chem.* 1998;8:2099–2102. DOI .org/10.1016/s0960-894x(98)00374-6
93. Ferzaz, B, Brault E, Bourliaud G, et al. 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;301: 1067–1078. DOI .org/10.1158/1538-7445.am2014-110

94. Anzini M, Cappelli A, Vomero S, et al. Molecular Basis of peripheral vs central benzodiazepine receptor selectivity in a new class of peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. *J. Med. Chem.* 1996;39:4275–4284. DOI: 10.1021/jm960325j
95. Cappelli A, Giuliani G, Valenti S, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies in peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. *Bioorg. Med. Chem.* 2008; 16:3428–3437. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.06.044
96. Cappelli A, Bini G, Valenti S, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies in translocator protein ligands based on a pyrazolo[3,4-b]quinoline scaffold. *J Med Chem.* 2011; 27:7165–75. DOI: 10.1021/jm200770f
97. Schlichter R, Rybalchenko V, Poisbeau P, et al. Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. *Neuropharmacology.* 2000;39: 1523–1535. DOI: 10.1016/s0028-3908(99)00253-1
98. Verleye M, Akwa Y, Liere P, et al. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2005;82:712–720. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.11.013
99. Ugale R, Sharma A, Kokare D, et al. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res.* 2007;1184:193–201. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.09.041
100. Aouad M, Charlet A, Rodeau J, et al. Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the nonbenzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain.* 2009;147:54–59. DOI: 10.1016/j.pain.2009.08.001
101. Nguyen N, Fakra E, Pradel V, et al. 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. *Human Psychopharmacol.* 2006;21:139–149. DOI: 10.1002/hup.757
102. Mokrov GV, Deeva OA, Gudasheva TA, et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.* 2015;23(13):3368–3378. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.049
103. Патент РФ на изобретение №2572076./ 26.03.2014. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., и др. 1-Арилпирроло [1,2-а]пирозин-3-карбоксамиды с нейрорепрессивной активностью. [Patent Rus №2572076./ 26.03.2014. Seredenin S.B., Mokrov G.V., Gudasheva T.A., et al. 1-Arylpirrololo [1,2-a]pirazin-3-karboksamidy s nejropsihotropnoj aktivnost'yu. (in Russ).] URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2572076>. дата обращения 03.10.2018).
104. Яркoв С.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. и др. Фармакологическое изучение новых соединений – регуляторов 18 кДа транслокаторного белка // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2016. – Т. 79. – № 1. – С. 7–11. [Yarkov SA, Mokrov GV, Gudasheva TA, et al. Pharmacological study of new compounds acting as regulators of 18-kDa translocator protein ligands. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2016. 79(1): 7–11 (in Russ).]
105. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. и др. Анксиолитическое действие оригинальных производных пирроло[1,2-а]пиразина, лигандов TSPO, зависит от биосинтеза нейростероидов // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2016. – Т. 50. – № 8. – С. 3–6. [Yarkova MA, Mokrov GV, Gudasheva TA, et al. Anxiolytic activity of original pyrrolo[1,2-a]pyrazine derivatives (TSPO ligands) depends on neurosteroid biosynthesis. *Khimiko-farmaceuticheskii zhurnal.* 2016;50(8):3–6. (in Russ).] DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6
106. Яркова М.А., Поварнина П.Ю., Мокров Г.В. и др. Антидепрессивный и ноотропный эффекты оригинальных лигандов транслокаторного белка TSPO // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2017. – Т. 80. – № 4. – С. 3–7. [Yarkova MA, Povarnina PYu, Mokrov GV, et al. Antidepressant and nootropic effects of original TSPO ligands. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2017;80(4):3–7 (in Russ).]
107. Гудашева Т.А., Деева О.А., Мокров Г.В. и др. Первый дипептидный лиганд транслокаторного протеина: дизайн и анксиолитическая активность // *Доклады академии наук.* – 2015. – Т. 464. – № 3. – С. 361–364. [Gudasheva TA, Deeva OA, Mokrov GV, et al. The first dipeptide ligand of translocator protein: design and anxiolytic activity. *Doklady akademii nauk.* 2015;464(3):361–364 (in Russ).] DOI: 10.7868/S0869565215270249
108. Патент РФ на изобретение №2573823./ 26.03.2014. Середенин С.Б., Деева О.А., Гудашева Т.А., и др. «Замещенные дипептиды с нейрорепрессивной активностью». [Patent Rus №2573823./ 26.03.2014 Seredenin SB, Deeva OA, Gudasheva TA, et al. Zameshchennyye dipeptidy s nejropsihotropnoj aktivnost'yu (in Russ).] URL: <http://www.freepatent.ru/patents/2573823>. (дата обращения 03.10.2018).
109. Гудашева Т.А. Теоретические основы и технологии создания дипептидных лекарств // *Известия Академии наук. Серия химическая.* – 2015. – Т. 64. – № 9. – С. 2012–2021. [Gudasheva TA. Theoretical grounds and technologies for dipeptide drug development. *Izvestiya akademii nauk. Seriya kimicheskaya.* 2015;64(9):2012–2021 (in Russ).]
110. Gudasheva TA, Voronina TA, Ostrovskaya RU, et al. Design of N-acylprolyltyrosine tripeptoid analogs of neurotensin as potential atypical antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* 1998;41:284–290. DOI: 10.1021/jm970217c
111. Гудашева Т.А. Стратегия создания дипептидных лекарств // *Вестник РАМН.* – 2011. – Т. 7. – С. 8–16 [Gudasheva TA. Stategiya sozdaniya dipeptidnyh lekarstv. *Vestnik RAMN.* 2011;7:8–16 (in Russ).]
112. Гудашева Т.А., Деева О.А., Яркова М.А. и др. Зависимость анксиолитического действия дипептидного лиганда TSPO ГД-23 от биосинтеза нейростероидов // *Доклады академии наук.* – 2016. – Т. 469. – № 5. – С. 621–624. [Gudasheva TA, Deeva OA, Yarkova MA, et al. Dependence of anxiolytic effects of the dipeptide TSPO ligand GD-23 on neurosteroid biosynthesis. *Doklady akademii nauk.* 2016;469(5):621–624. (in Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216230274
113. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Деева О.А. и др. Дипептидный лиганд транслокаторного белка ГД-23 проявляет анксиолитическую и ноотропную активности // *Acta Naturae.* – 2015. – Т. 7. – № 3 (26). – С. 120–125. [Povarnina PYu, Gudasheva TA, Deeva OA, et al. The novel dipeptide translocator protein ligand, referred to as GD-23, exerts anxiolytic and nootropic activities. *Acta Naturae.* 2015;7(3);(26):120–125. (in Russ).]