

УДК 544.165

СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ НОВОГО КЛАССА ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ – ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНОВ

© 2023 г. В. В. Григорьев^{1, *}, М. И. Лавров², В. А. Палюлин², Т. Л. Гарибова³, К. В. Анохин⁴, С. О. Бачурин¹

¹ Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия

² Химический факультет Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова” РАН, Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 30.11.2022 г.

Принята к публикации 16.12.2022 г.

В обзоре представлены результаты последовательных научных исследований нового класса положительных аллостерических модуляторов АМРА-рецепторов класса производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов, начиная от теоретического предсказания структур соединений, их синтеза, изучения их влияния на токи АМРА-рецепторов как доказательства отнесения их к классу ПАМ, изучения их активности и эффективности в поведенческих экспериментах, моделирующих как различные острые нарушения памяти и когнитивных функций, так и в хронических экспериментах, моделирующих патологию болезни Альцгеймера, изучение их молекулярного механизма взаимодействия с АМРА-рецептором методами компьютерного 3D моделирования, радиолигандного исследования меченого соединения **5** с фракциями синаптических мембран гиппокампа мозга с целью определения “посадочных мест” этого ПАМ в мозге крыс. Все вышеописанное характеризует новые соединения этого класса как наиболее активные среди известных ПАМ в мире, обладающие выраженным когнитивно-стимулирующим действием как у нормальных животных, так и в различных моделях патологического расстройства памяти, что указывает на их большой терапевтический потенциал.

Ключевые слова: АМРА-рецепторы, положительные аллостерические модуляторы, когнитивно-стимулирующее действие, радиолигандное связывание

DOI: 10.31857/S1027813323020073, EDN: UCLORN

ВВЕДЕНИЕ

Глутаматергическая система играет чрезвычайно важную роль в функционировании центральной нервной системы млекопитающих. Глутаматные рецепторы по своей чувствительности к селективным агонистам делятся на три типа: рецепторы *N*-метил-*D*-аспарагиновой кислоты (NMDA-рецепторы), α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (АМРА-рецепторы) и каиновой кислоты (каионатные (КА) рецепторы) [1]. АМРА-рецепторы принимают непосредственное участие в процессах формирования когнитив-

ных функций и памяти [2, 3]. Среди лигандов различных регуляторных сайтов АМРА-рецепторов особый интерес вызывают положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) АМРА-рецепторов. Это обусловлено их уникальными свойствами: они мягко настраивают глутаматергическую систему, поскольку не вызывают никаких эффектов в отсутствие природного лиганда в синапсе в отличие от прямых агонистов АМРА-рецептора, передозировка которых может вызвать гиперстимуляцию глутаматергической системы ЦНС и нейротоксичность [4–7]. Напротив, положительные аллостерические модуляторы АМРА-рецепторов имеют относительно мало побочных эффектов в терапевтически эффективных дозах.

* Адресат для корреспонденции: Северный пр-д, 1, 142432 Черноголовка, Московская обл., e-mail: grigor@ipac.ac.ru.

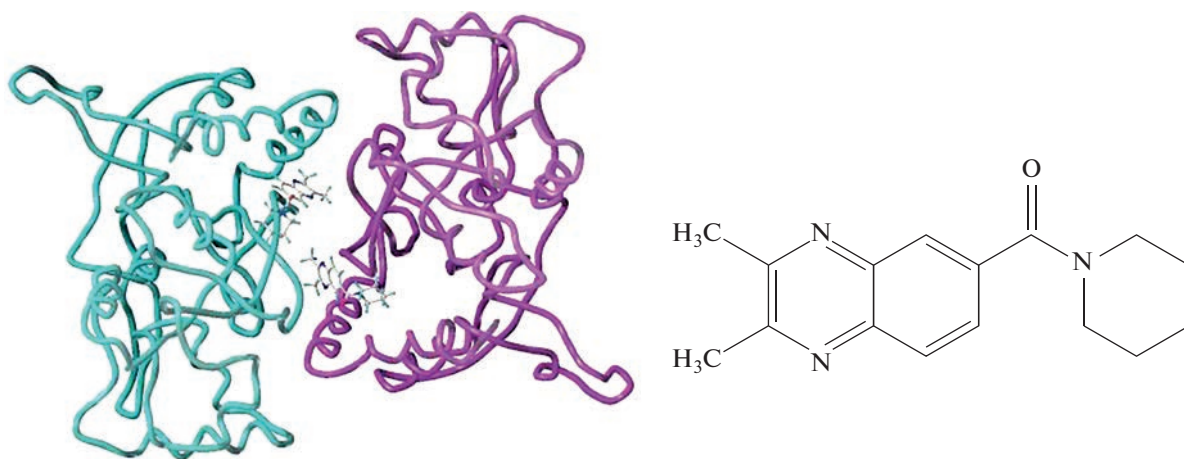


Рис. 1. Молекулярный докинг производного CX-516.

ПАМ АМРА-рецепторов могут быть полезны при лечении различных неврологических расстройств, таких как депрессия, шизофрения, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, синдром дефицита внимания/гиперактивности СДВГ) и расстройства настроения, наркотической зависимости [8–12]. Терапевтический эффект ПАМ частично связан с их способностью значительно повышать экспрессию нейротрофических факторов – фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) [13]. Хроническое пероральное применение ПАМ вызывает у крыс восстановление дендритов, сопровождающееся улучшением как синаптической пластичности, так и кодирования долговременной памяти о новых событиях [14].

Учитывая крайне ограниченный набор лекарств для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и других форм деменций, поиск и создание новых ПАМ с

высокой активностью и специфичностью является крайне актуальной задачей.

ОБОСНОВАНИЕ СТРУКТУР

Первые исследования по докингу положительных модуляторов АМРА-рецептора были выполнены после появления рентгеноструктурных данных о строении димера глутаматсвязывающего домена АМРА-рецептора, и была показана возможность одновременного связывания двух небольших молекул (в частности, известных лигандов CX-516 и циклотиазида – СТЗ) на расстоянии друг от друга в симметричном кармане, расположенном на интерфейсе между двумя субъединицами (рис. 1) [15]. В дальнейшем рентгеноструктурные данные для комплексов различных ПАМ с димером глутаматсвязывающего домена АМРА-рецептора подтвердили как такой способ связывания, так и возможность связывания молекул большего размера в центральной части сайта [16, 17].

Был разработан принцип конструирования новых активных лигандов, заключающийся в соединении спейсером двух небольших молекул, связывающихся с каждым из двух модуляторных сайтов димера глутаматсвязывающего домена АМРА-рецептора [18, 19]. Возможный способ связывания конструируемых бивалентных лигандов с модуляторными сайтами АМРА-рецептора показан на рис. 2 [18].

Конструирование и оптимизация потенциальных лигандов осуществлялись с помощью пакета программ SYBYLX2.1 [18]. Молекулярный докинг исследуемых соединений проводился в предполагаемый сайт связывания, расположенный между двумя глобулами двух субъединиц глутаматсвязывающих доменов АМРА-рецептора. Для поиска наилучшей конформации в полости связывания

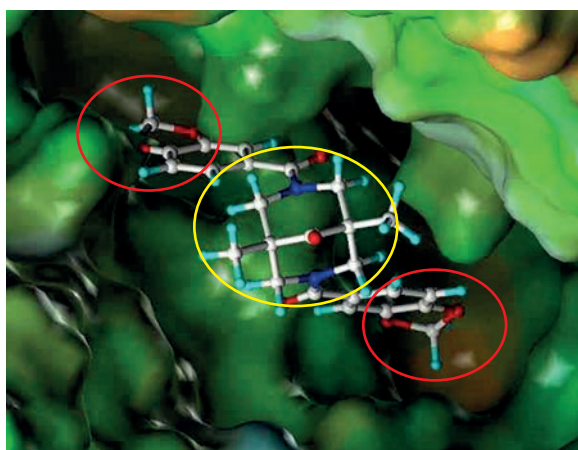


Рис. 2. Возможный способ связывания бивалентных лигандов с модуляторными сайтами АМРА-рецептора.

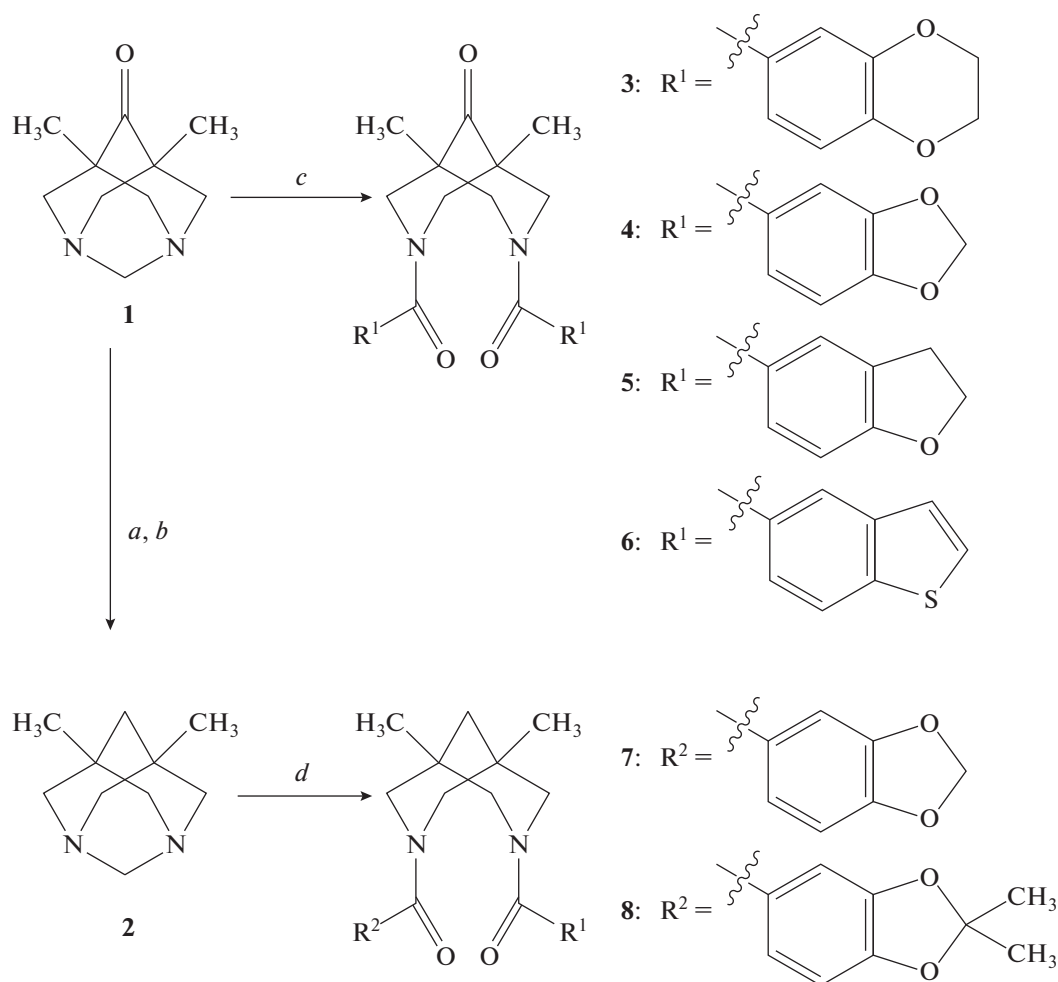


Рис. 3. Схема синтеза новых производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана [18, 19, 22]. (a, b) Восстановление по Кижнеру–Вольфу и *tert*-бутоксидом калия, (c, d) ацилирование хлорангидами соответствующих кислот.

мишени применялось варьирование торсионных углов лигандов методом синхронного поиска.

Процедура докинга осуществлялась с помощью программы AutoDock 4.2 [18]. Для оптимизации структуры использовался метод моделирования *de novo*, который заключается в виртуальном конструировании молекулы и оптимизации ее положения в активном центре биомишени с учетом стерических, электростатических взаимодействий, водородных связей и других факторов, обуславливающих взаимодействие лиганда с белком. В результате был подобран спейсер — каркасная структура на основе 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана, обеспечившая необходимую для оптимального связывания ориентацию двух ацильных заместителей, соответствующие которым исходные “монолиганды” [15, 20] обладали весьма умеренной активностью.

Таким образом была сконструирована молекула **4** и серия ее аналогов **3**, **6–8** [18, 19], которые по данным моделирования хорошо соответствовали по форме карману связывания ПАМ и по оцен-

кам связывания с биомишенью могли проявлять значительно более высокую активность, чем известные соединения с похожим физиологическим действием.

СИНТЕЗ

Синтез сконструированных соединений представлен на рис. 3. В качестве исходных соединений были использованы 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-он **1** [21] или его восстановленный аналог 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan **2** (восстановление проводили по Кижнеру–Вольфу, а также трет-бутоксидом калия в толуоле). Конечные соединения **3–8** были получены ацилированием диазаадамantanов **1** и **2** хлорангидами соответствующих кислот (рис. 3) [18, 19, 22].

Таким образом, была синтезирована серия новых соединений, которые в дальнейшем были исследованы в электрофизиологических и поведенческих экспериментах [22].

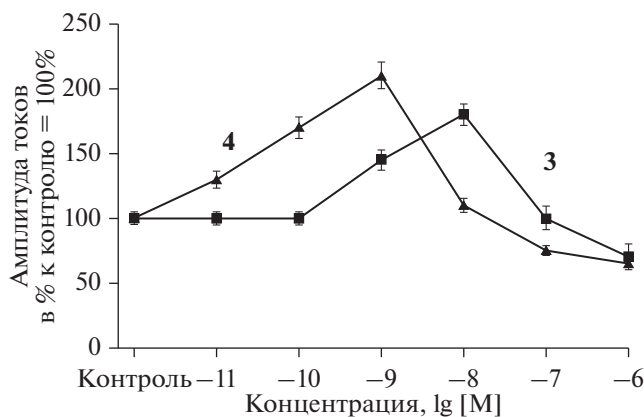


Рис. 4. Действие различных концентраций соединений **3** и **4** на токи AMPA рецепторов в нейронах Пуркинью мозжечка крыс, вызванных аппликацией каиновой кислоты [22].

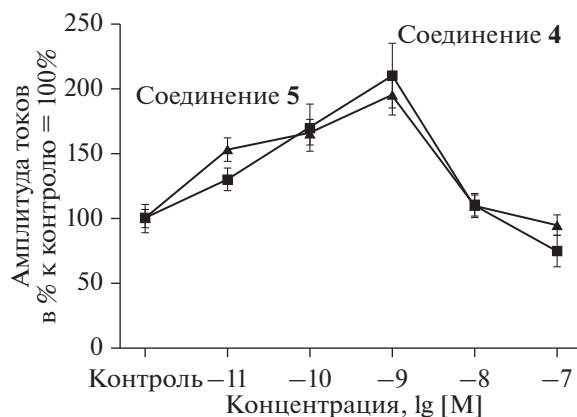


Рис. 5. Потенциация токов AMPA-рецепторов в нейронах Пуркинью мозжечка крыс при действии соединений **4** и **5**, исследованных электрофизиологическим методом patch-clamp [23].

Дальнейшая оптимизация структуры соединения **4** с учетом биодоступности веществ позволила существенно улучшить его фармакокинетические характеристики, что привело к новому соединению-лидеру – соединению **5** (рис. 3). Так, период полувыведения соединений **4** и **5** в дозах 1 мг/кг п/о составляет 38 ± 2 и 164 ± 3 мин соответственно [23].

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ

Электрофизиологические эксперименты по оценке действия веществ на AMPA-рецепторы были проведены методом patch-clamp [24, 25]. Эффекты новых соединений – производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана на ответы AMPA-рецепторов исследовали на изолированных нейронах Пуркинью от 12–15-дневных крысят с использованием частичного агониста AMPA-рецепторов – каиновой кислоты (КА), которая индуцирует токи, вызывая при этом относительно низкую десенситилизацию рецепторов [24]. Было показано, что соединения исследуемого ряда изменяют амплитуду токов AMPA-рецепторов в зависимости от концентрации. Наиболее активными оказались соединения **4** и **3**. Действие соединения **4** началось с концентрации 0,01 нМ, при которой оно увеличивало амплитуду токов AMPA-рецепторов в среднем на 30% (рис. 4). Дальнейшее увеличение концентрации вещества приводило к усилению потенцирующего эффекта, который достигал максимума при концентрации 1 нМ и составлял 110%. Однако более высокие концентрации (более 10 нМ) не вызывали дополнительного увеличения токов. Наоборот, концентрация **4** выше 10 нМ вызывала снижение активационного эффекта на токи AMPA-рецепторов, а при концентрации 100 нМ соединения **4** активирующий эффект полностью исчезал. Более высокие концентрации (до 1 мкМ)

уменьшали токи по сравнению с контрольными значениями. Действие соединения **3** было очень похоже на действие соединения **4**, но его активность была в среднем в 10 раз ниже, чем у соединения **4** (рис. 4). Максимальное потенцирование наблюдалось при концентрации 10 нМ и составляло 80%. Дальнейшее увеличение концентрации приводило к уменьшению потенцирующего эффекта, а затем и к блокаде токов [22].

Потенцирующий эффект соединений **7** и **8** проявлялся только в узком диапазоне концентраций по сравнению с соединением **4** и был менее выражен: максимальная величина потенцирующего эффекта для соединения **7** составила около 35%, а для соединения **8** – 70%. Соединение **6** не проявляло активности во всем диапазоне исследованных концентраций [22].

Полученные данные электрофизиологических экспериментов показали, что соединения **3**, **4**, **7** и **8** являются положительными модуляторами AMPA-рецепторов, обладающими колоколообразным потенцирующим действием [22].

Электрофизиологические эксперименты по оценке действия вещества **5** на AMPA-рецепторы также были проведены методом patch-clamp на свежееизолированных нейронах Пуркинью [23]. Аппликация каиновой кислоты (КК) вызывала в нейронах Пуркинью трансмембранные входящие токи. Добавление в перфузируемый раствор соединения **5** приводило к зависимому от концентрации **5** увеличению амплитуды токов (рис. 5). Этот эффект был зарегистрирован в диапазоне очень низких концентраций соединения **5**: 10^{-11} – 10^{-8} М. При использовании больших концентраций **5** значения амплитуды токов возвращались к контрольному уровню, как это было и в случае соединения **4** (рис. 5) [23].

ПОВЕДЕНИЕ

Для оценки антиамнестических свойств соединений **3**, **4** и **5** как наиболее активных позитивных модуляторов АМРА-рецепторов использовали методику амнезии условной реакции пассивного избегания (УРПИ) у крыс, вызванной максимальным электрошоком (МЭШ) [22, 26]. Выработку экспериментальной амнезии УРПИ с применением МЭШ проводили на стандартной установке пассивного избегания (Passive Avoidance) фирмы Lafayette Instrument Co (США). МЭШ применяли непосредственно после обучения через кортикальные электроды силой тока 43 мА, частота тока 50 Гц, продолжительность 0.3 с. Тест на воспроизведение осуществляли через 24 ч после обучения. Животное помещали на освещенную платформу установки хвостом к входу в темную камеру и регистрировали латентный период первого захода в темную камеру. Максимальное время регистрации – 3 мин. Исследуемые вещества вводили внутривентриально за 30 мин до обучения [26].

Для дополнительной оценки антиамнестических свойств соединений **3** и **4** использовали широко применяемую для этих целей методику амнезии УРПИ у крыс, вызванной однократным введением скополамина. Выработку экспериментальной амнезии УРПИ с применением скополамина проводили на стандартной установке пассивного избегания (Passive Avoidance) фирмы Lafayette Instrument Co (США). Животное помещали на освещенную платформу установки хвостом к входу в темную камеру и регистрировали латентный период первого захода в темную камеру. Максимальное время регистрации 3 мин. Для получения экспериментальной амнезии крысам за 15 мин до обучения УРПИ вводили внутривентриально блокатор М-холинэргических рецепторов – скополамин в дозе 1.5 мг/кг, затем проводили процедуру обучения УРПИ и через 24 ч воспроизводили [26].

Показано, что в контрольной группе крыс с МЭШ при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения всего 10% животных помнили об ударе током и не заходили в темный отсек камеры, тогда как в группе интактных (без МЭШ) животных этот показатель составлял 100% (табл. 1). В контрольной группе крыс, получавших скополамин, условный рефлекс через 24 ч воспроизводили только 10% крыс (табл. 2). Это свидетельствует о развитии амнезии у этих животных. При изучении антиамнестических свойств соединения **4** установлено, что соединение в дозе 0.01 мг/кг, при введении животным до обучения УРПИ, статистически достоверно увеличивало как латентное время рефлекса ($P \leq 0.05$), так и количество крыс, не зашедших в темную камеру установки ($P \leq 0.05$) и у животных с МЭШ и у животных, получивших скополамин (табл. 1 и 2). Лекарственный препарат мемантин, используемый для лечения болезни

Альцгеймера, в этих экспериментах в дозе 1 мг/кг улучшал (но не приводил к достижению критерия достоверности) воспроизведение рефлекса по количеству животных, не зашедших в темный отсек камеры, и не увеличивал латентное время рефлекса (табл. 1).

Таким образом, соединение **4** обладает выраженным антиамнестическим действием на модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ. Наибольший антиамнестический эффект проявляется в дозе 0.01 мг/кг. С увеличением дозы эффект уменьшается и теряется достоверность различий от контроля. Препарат сравнения – мемантин в многократно большей дозе 1 мг/кг вызывает гораздо меньший эффект, не достигающий уровня достоверных отличий от контроля.

Изучение антиамнестической активности соединения **4** на модели амнезии УРПИ, вызванной однократным внутривентриальным введением скополамина в дозе 1.5 мг/кг показало, что соединение **4** в дозе 0.01 мг/кг обладает выраженным антиамнестическим эффектом, который характеризуется статистически достоверным увеличением латентного времени рефлекса и количества животных, не зашедших в темную камеру (60%) при воспроизведении рефлекса через 24 ч после обучения (табл. 2). В дозах 0.05 и 0.1 мг/кг вещество предупреждало амнезию у 50% животных, но эти результаты были статистически недостоверны. Антиамнестическое действие препарата сравнения мемантина выявлялось в условиях этой модели в дозе 1 мг/кг (табл. 2).

Таким образом, соединение **4** обладает отчетливым антиамнестическим эффектом, на модели амнезии УРПИ, вызванной холинолитиком скополамином и превосходит по эффективности мемантин [22].

В отдельной серии экспериментов были исследованы антиамнестические свойства соединения **5**, используя метод амнезии условной реакции пассивного избегания (УРПИ) у крыс, вызванной максимальным электрошоком (МЭШ) (табл. 3). Так же, как и соединение **4**, соединение **5** обладает выраженным антиамнестическим действием на модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ. Наибольший антиамнестический эффект проявляется в дозе 0.01 мг/кг. С увеличением дозы эффект уменьшается и теряется достоверность различий от контроля. Препарат сравнения – мемантин в многократно большей дозе 2 мг/кг вызывает гораздо меньший эффект, не достигающий уровня достоверных отличий от контроля [23].

Полученные результаты характеризуют соединения **4** и **5** как перспективные кандидаты для клинических исследований в качестве средств для лечения и профилактики нейродегенеративных и психоневрологических заболеваний, связанных с

Таблица 1. Антиамнестический эффект веществ на модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ [22]

Группа животных	Доза, мг/кг внутрибрюшинно	Обучение	Воспроизведение УРПИ через 24 ч после обучения		
		латентное время рефлекса, с	латентное время рефлекса, с	количество животных, не зашедших в темную камеру	количество животных, не зашедших в темную камеру, %
Интактные	Физ. р-р	18.5 ± 3.7	169.0 ± 31.0	9/10	90
МЭШ	Физ. р-р	12.7 ± 0.9	84.4 ± 24.7 ^a	1/10 ^c	10
Соединение 3	0.01	19.3 ± 2.6	91.9 ± 30.1	4/10	40
Соединение 3	0.1	16.4 ± 1.7	154.3 ± 48.2 ^b	7/10 ^d	70
Соединение 3	0.5	17.7 ± 2.1	160.2 ± 40.2 ^b	6/10 ^d	60
Интактные	Физ. р-р	22.5 ± 4.9	177.5 ± 2.5	9/10	90
МЭШ	Физ. р-р	14.1 ± 1.8	45.1 ± 5.2 ^a	1/10 ^c	10
Соединение 4	0.01	18.7 ± 5.6	160.3 ± 15.2 ^b	7/10 ^d	70
Соединение 4	0.05	15.2 ± 4.5	149.6 ± 14.0 ^b	5/10	50
Соединение 4	0.1	17.2 ± 3.3	121.3 ± 21.2	5/10	50
Мемантин	1.0	33.3 ± 17.7	135.6 ± 21.8 ^b	6/10 ^d	60

^a Достоверность отличия от контроля, ^b достоверность отличия от контроля с МЭШ, при $p \leq 0.05$ (U критерий Мана–Уитни); ^c достоверность отличия от контроля, ^d достоверность отличия от контроля с МЭШ, при $p \leq 0.05$ (критерий Фишера).

Таблица 2. Антиамнестический эффект веществ на модели амнезии УРПИ, вызванной скополамином [22]

Группа животных	Доза, мг/кг внутрибрюшинно	Обучение	Воспроизведение УРПИ через 24 ч после обучения		
		латентное время рефлекса, с	латентное время рефлекса, с	количество животных, не зашедших в темную камеру	количество животных, не зашедших в темную камеру, %
Интактные	Физ. р-р	18.1 ± 6.0	157.1 ± 24.9	8/10	80
Контроль со скополамином	1.5	29.6 ± 8.7	91.6 ± 20.8 ^a	1/10 ^c	10
Соединение 3	0.01	19.3 ± 7.0	100.1 ± 32.6	5/10	50
Соединение 3	0.1	17.3 ± 9.0	177.0 ± 33.9 ^b	8/10 ^d	80
Соединение 3	0.5	16.1 ± 7.8	150.7 ± 43.8 ^b	7/10 ^d	70
Интактные	Физ. р-р	8.6 ± 1.4	165.7 ± 9.5	9/10	90
Контроль со скополамином	1.5	14.1 ± 1.8	45.1 ± 5.2 ^a	1/10 ^c	10
Соединение 4	0.01	10.0 ± 1.9	115.6 ± 28.9 ^b	7/10 ^d	70
Соединение 4	0.05	14.5 ± 2.3	99.0 ± 11.1 ^b	6/10	60
Соединение 4	0.1	15.9 ± 3.3	97.1 ± 30.1	5/10	50
Мемантин	1.0	16.6 ± 3.2	121.6 ± 30.1 ^b	7/10	70

^a Достоверность отличия от контроля, ^b достоверность отличия от контроля со скополамином (1.5 мг/кг) при $p \leq 0.05$ (U критерий Мана–Уитни); ^c достоверность отличия от контроля, ^d достоверность отличия от контроля со скополамином (1.5 мг/кг), при $p \leq 0.05$ (критерий Фишера).

Таблица 3. Антиамнестический эффект соединения **5** на модели амнезии, вызванной максимальным электрошоком (методика УРПИ) [23]

Группа животных	Доза, мг/кг внутрибрюшинно	Обучение	Воспроизведение УРПИ через 24 ч после обучения		
		латентное время рефлекса, с	латентное время рефлекса, с	время нахождения на светлой площадке	количество животных, не зашедших в темную камеру, %
Интактные	—	22 ± 5	161 ± 20	178 ± 3	100
Контроль с МЭШ (120 В)		22 ± 5	54 ± 23	84 ± 25*	30 ^{\$}
Соединение 5	0.1	17 ± 3	117 ± 27	121 ± 21	50
Соединение 5	0.05	15 ± 4	75 ± 23	120 ± 19	50
Соединение 5	0.01	19 ± 5	131 ± 25	160 ± 15*	70 ^{&}
Мемантин	2.0	20 ± 4	106 ± 26	138 ± 27	40

Достоверность отличий от интактного контроля, при $P \leq 0.05$ (критерий Стьюдента), * достоверность отличий от контроля с МЭШ, при $P \leq 0.05$ (критерий Стьюдента), \$ достоверность отличий от интактного контроля, при $P \leq 0.05$ (критерий χ_2).

Таблица 4. Возможность восстановления фармакологически нарушенной памяти [27]

Группа	i.p. физ. раствор + i.c. физ. раствор	i.p. физ. раствор + i.c. анизомидин	i.p. соединение 4 + i.c. анизомидин
% избегания	95%*	17% $p < 0.001$	68%* $p = 0.003$

ослаблением памяти, и улучшения когнитивных функций человека.

Соединение **4** обладает еще одним уникальным свойством, которое делает его крайне многообещающим средством для коррекции слабой памяти, возникшей в результате различных неблагоприятных воздействий. А именно, возможностью восстановления фармакологически нарушенной памяти (табл. 4), и возможностью фармакологического усиления слабой памяти в момент напоминания (табл. 5).

Введение цыплятам соединения **4** перед обучением пассивному избеганию, сопряженным с нарушением синтеза белка, приводит к сохранению памяти. Животных обучали в стандартной модели

пассивного избегания, приводящей к формированию устойчивой памяти. Через 5 мин после обучения в боковые желудочки мозга вводили блокатор синтеза белка анизомидин (80 мкг, 10 мкл на полушарие). При тестировании через 24 ч память у животных, получавших анизомидин, была нарушена по сравнению с контролем. В то же время, введение 0.005 мг/кг соединения **4** за 30 мин до обучения увеличивало уровень избегания при тестировании через 24 ч у животных, получавших анизомидин (см. табл. 4).

Из представленных результатов видно, что введение соединения **4** перед обучением предотвращает развитие амнезии, вызванной блокадой синтеза белка в мозге. Это свойство соединения **4**

Таблица 5. Возможность фармакологического усиления слабой памяти в момент напоминания [27]

Группа	Слабое обучение	Слабое обучение + + напоминание	Слабое обучение + + напоминание + + соединение 4	Слабое обучение + + соединение 4
% избегания	35% $p = 0.063$	31% $p = 0.069$	78% * $p < 0.001$	37% $p = 0.057$

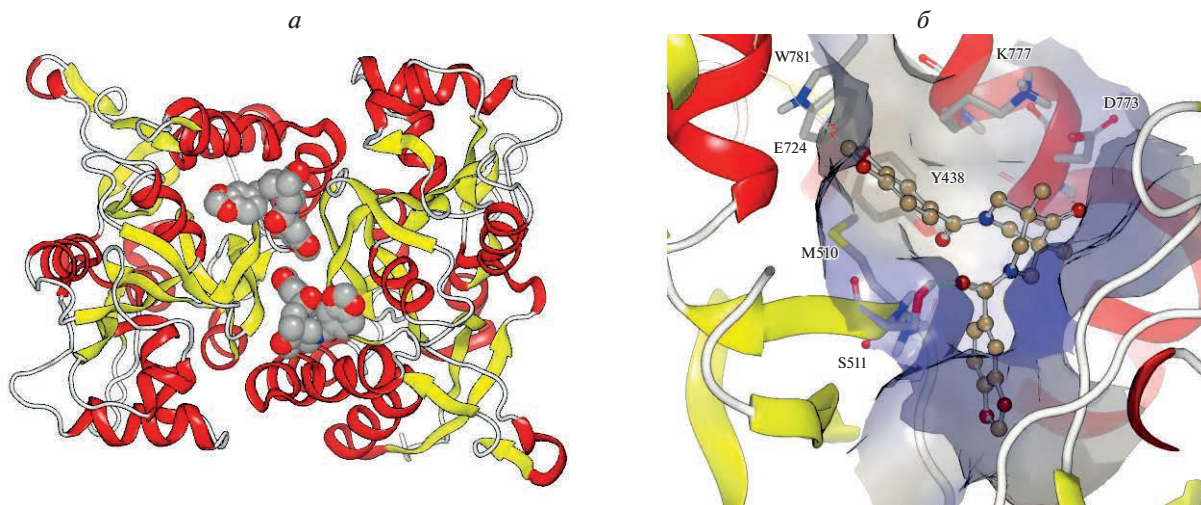


Рис. 6. (а) Способ связывания соединения **4** с GluA1 (флип). (б) Взаимодействие соединения **4** и GluA1 (флип) в сайте связывания ПАМ.

открывает возможность восстановления памяти, нарушенной в результате интоксикации путем фармакологического нарушения памяти, которое приводит к нарушению или снижению интенсивности метаболических процессов в мозге, например, при ослаблении или старении организма [27].

Возможность фармакологического усиления слабой памяти в момент напоминания: была использована экспериментальная модель слабого обучения в сочетании с процедурой напоминания для проверки способности соединения **4** усиливать процесс извлечения памяти [27]. Реактивацию памяти напоминанием проводили через 2 ч после слабого обучения; за 5 мин до напоминания животным вводили внутривенно 0.005 мг/кг соединения **4**, и тестировали память через 24 ч после обучения. Полученные результаты представлены в табл. 5 [27].

Представленные результаты показывают, что при тестировании памяти через 24 ч после слабого обучения напоминание (реактивация памяти) не приводит к увеличению уровня воспроизведения навыка. В то же время, реактивация памяти на фоне системного введения соединения **4** приводит к усилению памяти более чем на 200% по сравнению с животными, получавшими только напоминание или только введение соединения **4** через 2 ч после слабого обучения.

Следовательно, соединение **4** может быть использовано для усиления ослабленной памяти о ранее приобретенном опыте (о событиях, произошедших в прошлом), что открывает совершенно новые возможности его применения в клинике [27].

ДОКИНГ

Для детальной оценки возможности реализации различных способов связывания соединения **4** и его аналогов в сайте связывания ПАМ был осуществлен гибкий докинг с перебором возможных способов связывания с помощью программы Rosetta 3.5. Для этого в работе [22] были построены по гомологии 32 модели гомо- и гетеродимеров лиганд-связывающих доменов AMPA- и каинатных рецепторов, в том числе с альтернативным сплайсингом для AMPA-рецепторов и выполнен докинг соединения **4** во все модели.

Следует отметить, что по данным детального исследования возможных способов связывания весьма вероятным оказывается связывание в глубине модуляторного сайта двух молекул соединения **4** [22] по аналогии со связыванием циклотиазида (CTZ), молекулы которого занимают значительно меньший объем. При этом рассмотренный ранее способ связывания возможно следует рассматривать лишь как одну из начальных стадий взаимодействия лигандов такого типа с рецептором. Полученная конформация лиганда **4** показана на рис. 6 в комплексе с GluA1 (флип). Лиганд **4** образует две водородные связи с остатком серина S511. Описанный способ связывания наблюдается для большинства структур комплексов как с соединением **3**, так и с соединением **4** [22].

Таким образом, была найдена новая группа положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецепторов на основе 3,7-дизабицикло[3.3.1]нонанового каркаса, концентрационно-зависимо увеличивающих амплитуду токов AMPA-рецеп-

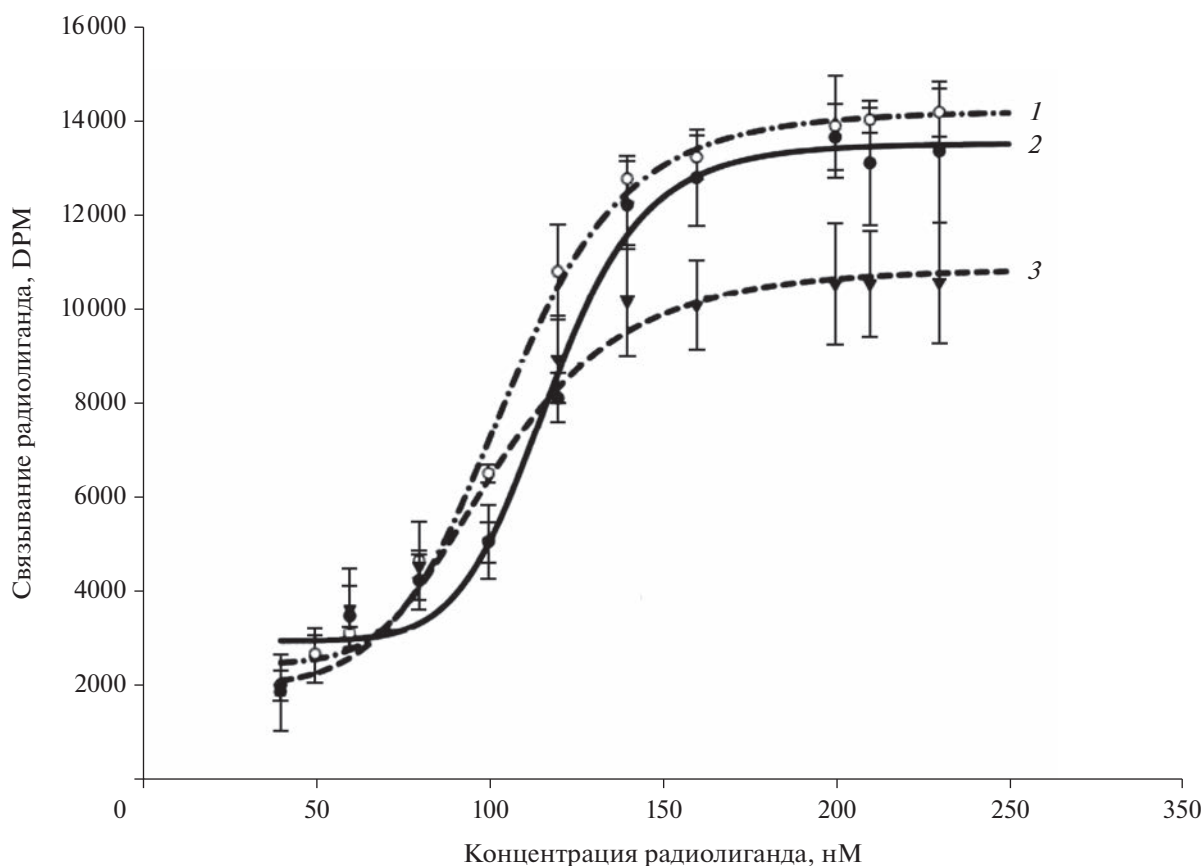


Рис. 7. Специфическое связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ на плазматических мембранах клеток гиппокампа (1), коры (2) и стриатума (3) крысы. По горизонтальной оси отложена концентрация радиолиганда $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, нМ. По вертикальной оси — связывание радиолиганда, ДРМ [30].

торов в электрофизиологических экспериментах в субнаномолярном диапазоне.

СВЯЗЫВАНИЕ

Введение тритиевой метки в соединение **5** позволило получить его полный структурный аналог — радиолиганд $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, удельная активность которого составила 130 Ки/ммоль, а химическая чистота — 98.7% [29]. Последующие исследования молекулярно-биологической активности $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ проводили методом радиолиганд-рецепторного анализа, используя в качестве меченного тритием лиганда — $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, а в качестве биологического материала — суспензию плазматических мембран клеток головного мозга крысы [30]. Поиск мест специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ на поверхности предполагаемых клеточных мишеней позволил установить существование центров специфических взаимодействий соединения **5**, локализованных на плазматических мембранах клеток мозга крысы. Было также отмечено существование высокого порога насыщаемости предполагаемых мест взаимодействий

при низких концентрациях радиолиганда, что может свидетельствовать об эффектах кооперативности связывания соединения **5**, когда при взаимодействии одной или нескольких молекул лиганда происходит экспонирование дополнительных центров связывания. Для более подробной количественной характеристики мест специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ были использованы суспензии плазматических мембран клеток коры, гиппокампа и стриатума крысы, неспецифическое связывание радиолиганда определяли в присутствии избытка немеченого соединения **5**.

Установлено, что связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ носит специфический характер и характеризуется во всех исследованных отделах константой диссоциации $K_d = 106 (\pm 8)$ нМ. Число мест специфического связывания (B_{\max}) в различных отделах головного мозга крысы оказалось неодинаково (рис. 7).

Наибольшее число мест специфических взаимодействий соединения **5** было обнаружено на плазматических мембранах клеток гиппокампа и коры головного мозга крысы (порядка 1200 пмоль/г

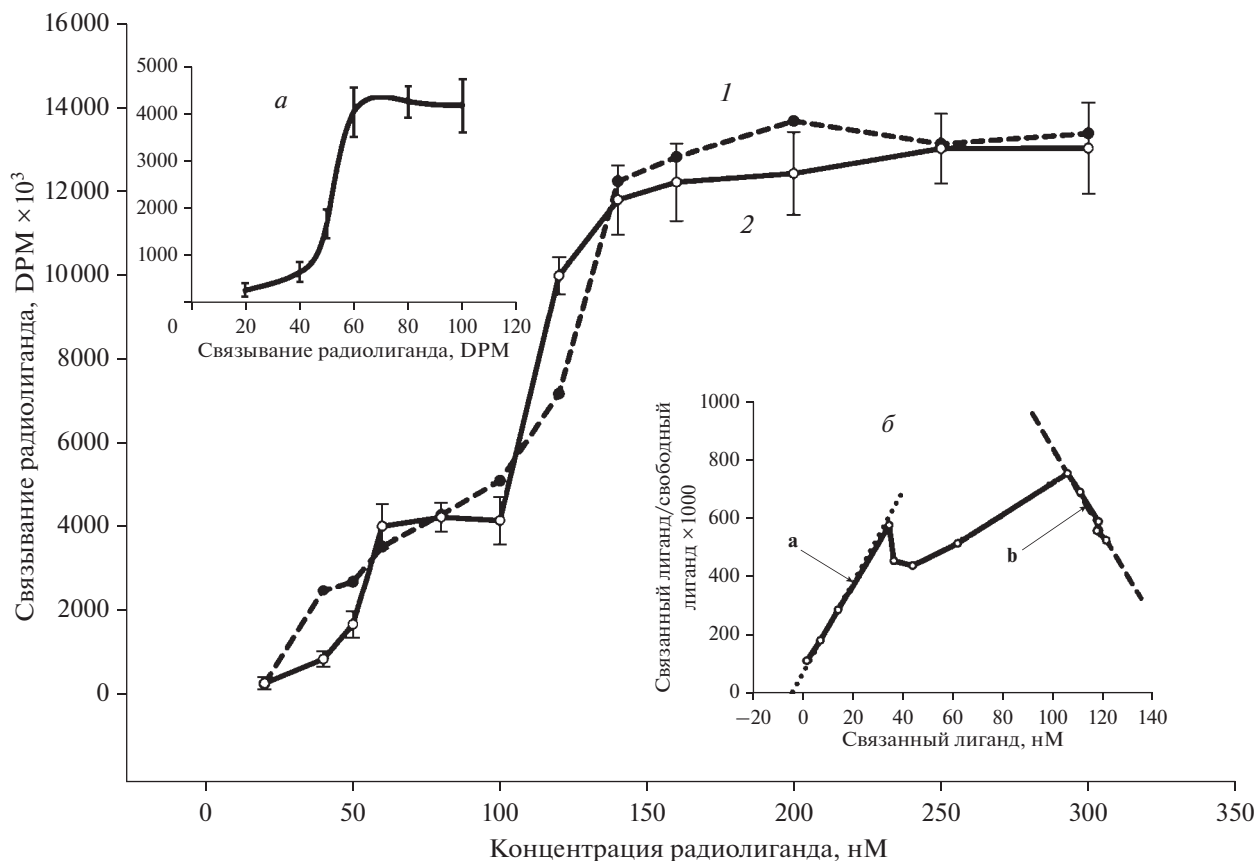


Рис. 8. Специфическое связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ с плазматическими мембранами клеток коры головного мозга крысы. По горизонтальной оси отложена концентрация радиолиганда $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, нмоль. По вертикальной оси — связывание радиолиганда, DPM. Неспецифическое связывание определяли в присутствии немеченого соединения $\mathbf{5}$ (250 мкМ). 1 — специфическое связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ с плазматическими мембранами. 2 — специфическое связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ при предварительном насыщении суспензии плазматических мембран глутаматом. На рис. 8а детально представлена область специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ в присутствии глутамата, и она соответствует глутамат-зависимому участку специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$. На рис. 8б показано специфическое связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ в присутствии глутамата, представленное в виде графиков Скетчарда. График Скетчарда показывает отношение концентраций связанного лиганда к несвязанному лиганду [связанный/свободный] к концентрации связанного лиганда [связанный] (нмоль). Стрелка а соответствует глутамат-зависимому участку специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$. Стрелка б соответствует независимо от глутамата сайту специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$.

белка). Число мест специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, локализованных на плазматических мембранах клеток стриатума крысы, по сравнению с корой и гиппокампом, оказалось на 20–30% меньшим. Полученные характеристики связывания могут свидетельствовать о, вероятно, единой природе центров специфических взаимодействий $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ в головном мозге крысы, характеризующихся разной степенью плотности их локализации, в зависимости от отдела мозга крысы [30].

Было обнаружено, что присутствие глутамата в инкубационном буфере значительно увеличивает “неспецифическое” связывание $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ (при использовании избытка глутамата в качестве немеченого соединения вместо соединения $\mathbf{5}$), что может быть обусловлено формированием дополнительного чис-

ла мест связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$ на мембранах. Было выдвинуто предположение, что при взаимодействии глутамата с соответствующими ему мишенями (рецепторами) происходит открытие доступа $\mathbf{5}$ к дополнительным центрам его специфического связывания, локализованным на глутаматных рецепторах. Проверка данного предположения с использованием плазматических мембран клеток гиппокампа и коры головного мозга крысы подтвердила правильность выдвинутой гипотезы. Так, в условиях предварительного насыщения суспензии плазматических мембран глутаматом происходит экспонирование дополнительного сайта специфического связывания $[^3\text{H}]\mathbf{5}$, характеризующего константой диссоциации $K_d = 52$ нМ и мак-

симальным числом мест специфического связывания $B_{\max} = 360$ пмоль/г белка мембран (рис. 8).

Дополнительное место связывания было также обнаружено и в гиппокампе, причем основные характеристики данного сайта (K_d и B_{\max}) в коре и гиппокампе практически полностью совпали.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании как минимум двух мест специфического связывания **5** на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы [30]. Сайт связывания, характеризуемый более высокой аффинностью (K_d порядка 52 нМ) является, по-видимому, глутамат-зависимым и может быть локализован на АМРА – рецепторах. Второй сайт связывания не зависит от присутствия глутамата, однако может характеризоваться таким свойством, как кооперативность взаимодействия **5**, когда связывание специфических молекул лиганда способствует открытию дополнительных мест взаимодействий, локализованных вблизи первого участка связывания. Кроме того, сопоставление количеств мест специфического связывания [^3H]**5** и [^3H]Глу (установленных в одинаковых условиях проведения экспериментов) позволяет также предположить, что взаимодействие **5** на рецепторах глутамата не является пропорциональным соотношению 1 : 1 (лиганд : рецептор), а характеризуется кратностью 2 : 1 либо 4 : 1 (в зависимости от конкретного из двух обнаруженных нами центров специфического связывания [^3H]Глу) [30].

Проведенное исследование позволяет разработать методику скрининга биологически активных соединений, что открывает возможности для количественной оценки потенциальной модуляторной активности молекул-кандидатов в отношении локализованных на поверхности клеток мозга нейрорегуляторных рецепторных систем: системы [^3H]**5**–рецепторы глутамата, а также системы [^3H]**5**–глутамат-независимые молекулярные мишени **5**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре представлены литературные и патентные данные по созданию и исследованию механизма действия и физиологической активности соединений класса производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов.

На основании данных по молекулярному моделированию взаимодействия различных ПАМ с аллостерическим сайтом связывания АМРА-рецептора была синтезирована группа новых оригинальных производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов, среди которых соединения **4** и **5** оказались одни-

ми из наиболее активных в мире на сегодняшний день положительных модуляторов АМРА рецепторов.

С целью доказательства отнесения к классу положительных модуляторов АМРА рецепторов и установления “классическим” электрофизиологическим методом количественных параметров действия различных концентраций соединений **4** и **5** на токи АМРА рецепторов, была проведена серия электрофизиологических экспериментов. Было показано, что соединения **4** и **5** концентрационно-зависимо увеличивают токи АМРА рецепторов в нейронах, начиная с концентрации 10^{-11} М. Введение тритиевой метки в соединение **5** позволило получить его полный структурный аналог – радиолиганд [^3H]**5**. Поиск мест специфического связывания [^3H]**5** на поверхности предполагаемых клеток-мишеней позволил установить существование центров специфических взаимодействий соединения **5**, локализованных на плазматических мембранах клеток мозга крысы. Полученные результаты свидетельствуют о существовании как минимум двух мест специфического связывания соединения **5** на плазматических мембранах клеток головного мозга крысы.

Таким образом, в обзоре представлены результаты последовательных научных исследований нового класса положительных модуляторов АМРА-рецепторов класса производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов, начиная от теоретического предсказания структур соединений, их синтеза, изучения их влияния на токи АМРА рецепторов как доказательства отнесения их к классу ПАМ, изучения их активности и эффективности в поведенческих экспериментах, моделирующих как различные острые нарушения памяти и когнитивных функций, так и в хронических экспериментах, моделирующих патологию болезни Альцгеймера, изучение их молекулярного механизма взаимодействия с АМРА рецептором методами компьютерного 3D моделирования, радиолигандного исследования меченного соединения **5** с фракциями синаптических мембран гиппокампа мозга с целью определения “посадочных мест” этого ПАМ в мозге крыс. Все вышеописанное характеризует новые соединения **4** и **5** как наиболее активные среди известных ПАМ в мире, обладающие выраженным когнитивно-стимулирующим действием как у нормальных животных, так и в различных моделях патологического расстройства памяти, что указывает на их большой терапевтический потенциал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T. et al. // *Pharmacol. Rev.* 2021. V. 73. P. 298–487.
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
- Palmer C.L., Cotton L., Henley J.M. // *Pharmacol. Rev.* 2005. V. 57. P. 253–277.
<https://doi.org/10.1124/pr.57.2.7>
- Greger I.H., Esteban J.A. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. V. 17. P. 289–297.
doi: 10.1016/j.conb.2007.04.007
- Lynch G. *Curr. Opin. Pharmacol.* // 2004. V. 4. P. 4–11.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2003.09.009>
- Francotte P., de Tullio P., Fraikin P., Counerotte S., Goffin E., Pirotte B. // *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2006. V. 1. P. 239–246.
- O'Neill M.J., Dix S. // *IDrugs.* 2007. V. 10. P. 185–192.
- Григорьев В.В., Прошин А.Н., Кинзирский А.С., Бачурин С.О. // *Успехи химии.* 2009. Т. 78. № 5. С. 520–534.
- Adler L.A., Kroon R.A., Stein M., Shahid M., Tarazi F.I., Szegedi A., Schipper J., Cazorla P. // *Biol. Psychiatry.* 2012. V. 72. P. 971–977.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.05.012>
- O'Neill M.J., Bleakman D., Zimmerman D.M., Nisenbaum E.S. // *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2004. V. 3. P. 181–194.
- Goff D.C., Leahy L., Berman I., Posever T., Herz L., Leon A.C., Johnson S.A., Lynch G. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2001. V. 21. № 5. P. 484–487.
- Alt A., Nisenbaum E.S., Bleakman D., Witkin J.M. // *Biochem. Pharmacol.* 2006. V. 71. № 9. P. 1273–1288.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.022>
- Xiaoyu Hu, Xuebi Tian, Xiao Guo, Ying He, Haijun Chen, Jia Zhou, Zaijie Jim Wang // *Neuropharmacology.* 2018. V. 137. P. 50–58.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.04.020>
- Lauterborn J.C., Pineda E., Chen L.Y., Ramirez E.A., Lynch G., Gall C.M. // *Neuroscience.* 2009. V. 159. № 1. P. 283–295.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.018>
- Lauterborn J.C., Palmer L.C., Jia Y., Pham D.T., Hou B., Wang W., Trieu B.H., Cox C.D. et al. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 5. P. 1636–1646.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3157-15.2016>
- Тихонова И.Г., Лавров М.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. // *ДАН.* 2004. Т. 399. № 2. С. 268–270.
- Jin R., Clark S., Weeks A.M., Dudman J.T., Gouaux E., Partin K.M. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. P. 9027–9036.
- Harms J.E., Benveniste M., Maclean J.K., Partin K.M., Jamieson C. // *Neuropharmacology.* 2013. V. 64. P. 45–52.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.008>
- Лавров М.И., Григорьев В.В., Бачурин С.О., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. // *Доклады Академии наук.* 2015. Т. 464. № 5. С. 626–628.
<https://doi.org/10.7868/S0869565215290265>
- Бачурин С.О., Григорьев В.В., Зефирова Н.С., Лавров М.И., Лаптева В.Л., Палюлин В.А. Патент РФ RU № 2333211. Опубликовано: 10.09.2008, Бюл. № 25.
- Лавров М.И., Лаптева В.Л., Григорьев В.В., Палюлин В.А., Бачурин С.О., Зефирова Н.С. // *Хим. фарм. журн.* 2012. Т. 46. № 2. С. 27–30.
- Кузнецов А.И., Басаргин Е.Б., Московкин А.С., Ба М.Х., Мирошниченко И.В., Ботников М.Я., Унковский Б.В. // *Химия гетероциклических соединений.* 1985. № 12. С. 1679–1685.
- Lavrov M.I., Karlov D.S., Voronina T.A., Grigoriev V.V., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Palyulin V.A. // *Molecular Neurobiology.* 2020. V. 57. P. 191–199.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01768-6>
- Григорьев В.В., Лавров М.И., Замойский В.Л., Гарибова Т.Л., Палюлин В.А., Бачурин С.О. // *Доклады Академии наук.* 2019. Т. 488. № 2. С. 217–220.
- Vignisse J., Steinbusch H.W., Grigoriev V., Bolkunov A., Proshin A., Bettendorff L., Bachurin S., Strekalova T. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 24. № 2. P. 309–320.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.06.010>
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. // *Pflugers Arch.* 1981. V. 391. № 2. P. 85–100.
- Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: изд. ФГБУ “НЦЭМСП” Минздравсоцразвития России, 2012. С. 276–297.*
- Анохин К.В., Бачурин С.О., Григорьев В.В., Зефирова Н.С., Комиссарова Н.В., Лавров М.И., Палюлин В.А., Тунова А.А. Патент РФ RU № 2417082. Опубликовано: 27.04.2011. Бюл. № 12.
- Nagaev I.Yu., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F., Grigoriev V.V., Lavrov M.I., Bondarenko E.V., Kalashnikova E.E. // *Mendelev Commun.* 2018. V. 28. P. 64–65.
- Мясоедов Н.Ф., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Григорьев В.В., Лавров М.И., Бондаренко Е.В., Калашникова Е.Е. Патент РФ RU № 2668982. Опубликовано: 05.10.2018. Бюл. № 28.
- Vyunova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Grigoriev V.V., Palyulin V.A., Lavrov M.I., Bondarenko E.V., Kalashnikova E.E., Myasoedov. // *Current Molecular Pharmacology.* 2020. V. 13. P. 216–223.
<https://doi.org/10.2174/1874467213666200303140834>

Creation and Study of the Mechanism of Action of Compounds of a New Class of Positive Modulators of AMPA Receptors – Derivatives of 3,7-Diazabicyclo[3.3.1]nonanes

V. V. Grigoriev^a, M. I. Lavrov^b, V. A. Palyulin^b, T. L. Garibova^c, K. V. Anokhin^d, and S. O. Bachurin^a

^a Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russia

^b Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^c Federal State Budgetary Scientific Institute “Scientific Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova, Moscow, Russia

^d Federal State Budgetary Scientific Institute “Scientific Research Institute of Normal Physiology named after P.K. Anokhin”, Moscow, Russia

The review presents the results of consistent scientific studies of a new class of positive allosteric modulators of AMPA receptors from the class of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivatives, starting from the theoretical prediction of the structures of compounds, their synthesis, and studying their effect on the currents of AMPA receptors as evidence of assignment them to the PAM class, studying their activity and effectiveness in behavioral experiments simulating both various acute impairments of memory and cognitive functions, and in chronic experiments simulating the pathology of Alzheimer’s disease, studying their molecular mechanism of interaction with the AMPA receptor using 3D computer modeling, radioligand studies of labeled compound **5** with fractions of synaptic membranes of the brain hippocampus in order to determine the “seats” of this PAM in the brain of rats. All of the above characterizes new compounds of this class as the most active among known PAMs in the world, having a pronounced cognitive-stimulating effect both in normal animals and in various models of pathological memory disorder, which indicates their great therapeutic potential.

Keywords: AMPA receptors, positive allosteric modulators, cognitive stimulating effect, radioligand binding