

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

УДК 577.25



«УТВЕРЖДАЮ»

И.О. Проректор по научной работе

Е.В. Мисегера
С.В. Микушев

«06» *декабря* 2024 г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по договору от 01.12.2022 № 9112-2022

«Поиск химических соединений, обладающих агонистическими и антагонистическими свойствами к рецепторам следовых аминов, исследования их фармакодинамики и механизма действия»
(ИТОГОВЫЙ)

Руководитель НИР,
Рук. ЛНМФ, директор ИТБМ СПбГУ, к.м.н.

Р.Р. Гайнетдинов

Санкт-Петербург
2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР:

Рук. ЛНМФ, директор
ИТБМ СПбГУ, к.м.н.



подпись

Р.Р. Гайнетдинов

(разделы 1 – 3)

Исполнители:

В.н.с., к.б.н.



подпись

Е.В. Канов
(раздел 2.2)

Н.с., к.б.н.



подпись

Р.З. Мургазина
(раздел 2.2)

В.н.с., к.б.н.



подпись

Е.В. Ефимова
(разделы 2.3)

Н.с., к.б.н.



подпись

А.В. Лопачев
(разделы 2.3)

РЕФЕРАТ

Отчет: 78 страницы, 38 рисунков, 7 таблиц, 29 процитированных публикаций.

Ключевые слова: Фармакология; Нейробиология; Трансляционная биомедицина; Шизофрения; Болезнь Паркинсона; Депрессия; Наркомания; Диабет; Ожирение; Трансгенные модели животных; Следовые амины; GPCR рецепторы; Моноамины

Разработка новых лекарственных средств, воздействующих на TAAR1 и другие рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами (семейство TAARs). Зарегистрированных аналогов в мировой клинической практике нет. Только две международные компании, F. Hoffmann La-Roche (Switzerland) и Sunovion (USA), в данный момент проводят клинические испытания TAAR1 агонистов для лечения пациентов с шизофренией и другими нейropsychиатрическими заболеваниями. Ожидается, что разработка новых TAAR1 агонистов и оценка остальных TAARs в качестве эффективных мишеней для фармакологического воздействия приведёт к появлению в клинике принципиально новых подходов терапии ряда социально-значимых заболеваний.

В рамках данной научно-исследовательской работы были получены следующие результаты:

- 1) Были проработаны и опробованы новые методы синтеза соединений, обладающих общим молекулярным ядром, для оценки биологической активности против рецептора TAAR1 *in vitro* методами.
- 2) В рамках скрининга *in vitro* в модели BRET было выявлено 4 кандидата для исследований на животных моделях. Однако, ввиду данных, полученных с альтернативной модели NanoBiT было принято решение выбрать 1 кандидата из новых соединений и оценить активность соединений AP163 и DS16 на животных моделях при пероральном введении.
- 3) Дополнительные исследования с LK00764 показали низкий уровень биодоступности молекулы при пероральном введении в трех солубилизаторах на химической модели гиперактивности грызунов, вызванной МК-801, а также на модели трансгенных крыс, лишенных рецептора обратного забора дофамина DAT.
- 4) Оценка новых отобранных соединений *in vivo* показала антипсихотическую активность при внутрибрюшинном введении, при этом DS16 показал активность при исследованиях при интрагастральном введении.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ..... | 2 |
| РЕФЕРАТ | 3 |
| СОДЕРЖАНИЕ..... | 4 |
| ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ | 6 |
| СПИСОК РИСУНКОВ..... | 7 |
| СПИСОК ТАБЛИЦ | 11 |
| 1 ВВЕДЕНИЕ | 12 |
| 2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР | 15 |
| 2.1 Синтез библиотеки химических соединений – потенциальных агонистов TAAR1 16 | |
| 2.1.1 Обоснование исследования | 16 |
| 2.1.2 Синтез соединений – схемы синтеза..... | 17 |
| 2.1.3 Заключение | 31 |
| 2.2 <i>IN VITRO</i> тестирование активности потенциальных агонистов TAAR1 | 32 |
| 2.2.1 Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) методом BRET..... | 32 |
| 2.2.1.1 Обоснование исследования | 32 |
| 2.2.1.2 Материалы и методы исследования | 32 |
| 2.2.1.3 Результаты..... | 33 |
| 2.2.1.4 Заключение и выводы | 40 |
| 2.2.2 Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) методом NANObIT | 40 |
| 2.2.2.1 Обоснование исследования | 40 |
| 2.2.2.2 Материалы и методы исследования | 41 |
| 2.2.2.3 Результаты..... | 42 |
| 2.2.2.4 Заключение | 45 |
| 2.3 Исследование активности LK00764 в физиологических тестах <i>IN VIVO</i> | 46 |
| 2.3.1 Острое интрагастральное введение LK00764 для оценки его действия на модели двигательной гиперактивности у крыс, нокаутных по гену DAT..... | 46 |
| 2.3.1.1 Обоснование исследования | 46 |
| 2.3.1.2 Материалы и методы исследования | 46 |
| Животные | 46 |
| Вещества | 47 |
| Экспериментальные процедуры..... | 47 |
| Дизайн исследования | 47 |
| Экспериментальная установка | 47 |
| Регистрируемые показатели поведения | 47 |
| Экспериментальная процедура | 48 |
| Статистический анализ | 48 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3.1.3 | Результаты..... | 48 |
| 2.3.1.4 | Выводы..... | 49 |
| 2.3.2 | ОСТРОЕ ИНТРАГАСТРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ LK00764 ДЛЯ ОЦЕНКИ ЕГО ДЕЙСТВИЯ НА КРЫС, НАХОДЯЩИХСЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНГИБИТОРА РЕЦЕПТОРОВ NMDA - МК-801 | 50 |
| 2.3.2.1 | Обоснование исследования | 50 |
| 2.3.2.2 | Материалы и методы исследования | 50 |
| | ЖИВОТНЫЕ | 50 |
| | ВЕЩЕСТВА | 50 |
| | ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ..... | 51 |
| | <i>Дизайн исследования</i> | 51 |
| | <i>Экспериментальная установка</i> | 51 |
| 2.3.2.3 | Результаты..... | 52 |
| 2.3.2.4 | Выводы | 53 |
| 2.4 | ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ВЫЯВЛЕННЫХ АГОНИСТОВ TAAR1 В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТАХ <i>IN VIVO</i> | 54 |
| 2.4.1 | ОСТРОЕ ВНУТРИБРЮШИННОЕ ВВЕДЕНИЕ LK1932A, AP163 и DS16 ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ ДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ ГИПЕРАКТИВНОСТИ У КРЫС, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ DAT | 54 |
| | 54 | 54 |
| 2.4.1.1 | Обоснование исследования | 54 |
| 2.4.1.2 | Материалы и методы исследования | 54 |
| 2.4.1.3 | Результаты..... | 56 |
| 2.4.1.4 | Выводы..... | 64 |
| 2.4.2 | ОСТРОЕ ИНТРАГАСТРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ AP163 и DS16 ДЛЯ ОЦЕНКИ ЕГО ДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ ГИПЕРАКТИВНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ DAT-ИНГИБИТОРОМ GBR-12909 | 65 |
| 2.4.2.1 | Обоснование исследования | 65 |
| 2.4.2.2 | Материалы и методы исследования | 65 |
| | ЖИВОТНЫЕ | 65 |
| | ВЕЩЕСТВА | 65 |
| | ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОЦЕДУРЫ..... | 66 |
| | <i>Дизайн исследований</i> | 66 |
| | <i>Экспериментальная установка</i> | 66 |
| | <i>Регистрируемые показатели поведения</i> | 67 |
| | СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ | 67 |
| 2.4.2.3 | Результаты..... | 67 |
| 2.4.2.4 | Выводы..... | 72 |
| 3 | <u>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</u> | 73 |
| 4 | <u>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</u> | 74 |
| 5 | <u>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</u> | 77 |
| 5.1 | ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 77 |

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие определения, обозначения и сокращения с соответствующими определениями:

| | |
|------------------|---|
| ВОЗ | – Всемирная организация здравоохранения |
| ДНК | – Дезоксирибонуклеиновая кислота |
| НИР | – Научно-исследовательская работа |
| РФ | – Российская Федерация |
| СДВГ | – Синдром дефицита внимания и гиперактивности |
| СПбГУ | – Санкт-Петербургский государственный университет |
| США | – Соединенные Штаты Америки |
| цАМФ | – Циклический аденозинмонофосфат |
| ЦНС | – Центральная нервная система |
| АТСС | – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection) |
| BRET | – Резонансный перенос энергии биолюминесценции |
| DA (ДА) | – Дофамин |
| DAT | – Транспортёр обратного захвата дофамина |
| DAT-КО | – Трансгенные животные, нокаутные по гену транспортёра обратного захвата дофамина |
| EC ₅₀ | – Полумаксимальная эффективная концентрация |
| EPAC | – Exchange protein activated by cAMP |
| GPCR | – Рецепторы, сопряженные с G-белками (G protein-coupled receptors) |
| hTAAR1 | – Человеческий TAAR5 |
| IC ₅₀ | – Концентрация полумаксимального ингибирования |
| Rluc | – Люцифераза кораллового полипа <i>R. reniformis</i> |
| RLU | – Относительные единицы люминесценции (Relative luminescence units) |
| ТА | – Следовые амины (Trace amines) |
| ТААР | – Рецепторы следовых аминов (Trace Amine-Associated Receptors) |
| ТААР1-КО | – Линии мышей, лишённые рецепторов TAAR1 |
| YFP | – Жёлтый флуоресцентный белок |

СПИСОК РИСУНКОВ

| Рисунок № | Название рисунка | Страница |
|-----------|--|----------|
| 1 | <i>Структура ранее открытого агониста TAAR1 (1)</i> | 16 |
| 2 | Схема 1. Реагенты и условия: i. 2, K ₂ CO ₃ , ДМФА, 120 °С., 12 ч; ii. 15% водн. р-р NaOH, MeOH, 50 °С., 4 ч. iii. R ₁ R ₂ NH, HBTU, Et ₃ N, ДМФА, комн. т, 12 ч; iv. 4M HCl, 1,4-диоксан. | 17 |
| 3 | Схема 2. Реагенты и условия: i. 6, K ₂ CO ₃ , ДМФА, 120 °С., 12 ч; ii. H ₂ , 10% Pd-C, 1 атм, комн.т., 4 ч iii. RCOOH, HBTU, Et ₃ N, ДМФА, комн. т, 12 ч; iv. 4M HCl, 1,4-диоксан | 18 |
| 4 | Схема 3. Реагенты и условия: i. EtO ₂ CCH ₂ P(O)(OEt) ₂ , NaH, ТГФ, 0 °С→ комн.т.; ii. MeOCH ₂ N(Bn)CH ₂ SiMe ₃ , LiF, MeCN, 60 °С, 18 ч. | 19 |
| 5 | Схема 4. Реагенты и условия: i. LiOH·H ₂ O, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. амидоксим, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. TBAF, толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 6 ч; iv. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; v. MsCl, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , 0°С→комн.т., 18 ч. vi. CF ₃ COOH, CH ₂ Cl ₂ , 0 °С→ комн.т., 1 ч; vii. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч. viii. MsCl, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , 0°С→комн.т., 18 ч. | 19 |
| 6 | Схема 5. Реагенты и условия: i. LiOH·H ₂ O, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. амидоксим, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. TBAF, толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 6 ч; iv. CF ₃ COOH, CH ₂ Cl ₂ , 0 °С→ комн.т., 1 ч; iv. MsCl, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , 0°С→комн.т., 18 ч. | 20 |
| 7 | Схема 6. Реагенты и условия: i. LiOH·H ₂ O, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. RNHR', HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; iv. R ₂ NH ₂ , КДИ, ДМФА, комн.т. v. MsCl, Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ , 0°С vi. LiAlH ₄ , ТГФ 0°С→комн.т | 20 |
| 8 | Схема 7. Реагенты и условия: i. LiOH·H ₂ O, водн. 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. RNHR', HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. CF ₃ COOH, CH ₂ Cl ₂ , 0 °С→ комн.т., 1 ч; iv. LiAlH ₄ , ТГФ, -70°С→-5°С; v. (CH ₃) ₂ NH, NaBH(OAc) ₃ , CH ₂ Cl ₂ , комн.т., 18 ч.; vi. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., vii. RCOOH, КДИ, ДМФА, комн.т., 4 ч. | 21 |
| 9 | Схема 8. Реагенты и условия: i. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; ii. альдегид, CH ₂ Cl ₂ , NaBH(OAc) ₃ , комн.т., 18 ч; iii. LiOH·H ₂ O, водн. 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; iv. пропаргиламин, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; v. BnNH ₂ , Zn(OTf) ₂ (0.25 мол.%), толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 8 ч; vi. Zn(OTf) ₂ (0.25 мол.%), толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 16 ч; vii. CF ₃ COOH, CH ₂ Cl ₂ , 0 °С→комн.т., 1 ч. | 23 |
| 10 | Схема 9. Реагенты и условия: i. 64% водн. N ₂ H ₄ , этанол, кипячение, 8 ч; ii. MeNCS, этанол, кипячение, 2 ч; iii. Ni Реня, этанол, кипячение, 12 ч; iv. H ₂ , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; v. RCOOH, КДИ, ДМФА, комн.т., 4 ч. vi. CF ₃ COOH, CH ₂ Cl ₂ , 0 | 24 |

| Рисунок № | Название рисунка | Страница |
|-----------|---|----------|
| | $^{\circ}\text{C} \rightarrow$ комн.т., 1 ч; v. vi. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; vii. RCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , $0^{\circ}\text{C} \rightarrow$ комн.т., 18 ч. | |
| 11 | Схема 10. Реагенты и условия: i. ацетамидин (циклопропанамидин) HCl , MeONa , MeOH , комн.т., 18 ч; ii. 170°C в токе аргона; iii. CF_3COOH , CH_2Cl_2 , $0^{\circ}\text{C} \rightarrow$ комн.т., 1 ч. iv. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; v. 37% водн. формальдегид, CH_2Cl_2 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, комн.т., 18 ч. | 26 |
| 12 | Схема 11. Реагенты и условия: i. пара-хлорфенилбороновая кислота, K_2CO_3 , H_2O , диоксан, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 90°C , 4 ч; ii. NH_2OH , EtOH , т.кип. 5 ч; iii. КДИ, ДМСО, 30 мин., затем 49, 12 ч., затем NaOH , 30 мин. | 28 |
| 13 | Схема 12. Реагенты и условия: i. аминоктанол, толуол, H_2O , диоксан, т.кип, 5 ч; ii. NaBH_4 , EtOH , $0^{\circ}\text{C} \rightarrow$ комн.т., 30 мин.; iii. Woc_2O , EtOAc , 18 ч, комн.т.; iv. DIAD, PPh_3 , ТГФ, 18 ч. | 29 |
| 14 | Схема 13. Реагенты и условия: i. BuLi , ТГФ, -70°C , 30 мин, затем ДМФА; ii. NHR_1R_2 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, CH_2Cl_2 , комн.т., 24; iii. 4M HCl /диоксан, комн. т., 8 ч | 29 |
| 15 | Схема 14. Реагенты и условия: i. $\text{RB}(\text{OH})_2$, K_2CO_3 , H_2O , диоксан, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 90°C , 4 ч; ii. 4M HCl /диоксан, комн. т., 8 ч | 30 |
| 16 | Схема 15. Реагенты и условия: i. BuLi , ТГФ, -70°C , 30 мин, затем CO_2 ; ii. КДИ, $\text{NH}_2\text{-R}_2$, CH_2Cl_2 , комн.т., 2 ч; iii. 4M HCl /диоксан, комн. т., 8 ч | 30 |
| 17 | Кривые “концентрация-эффект” для веществ, показавших наибольший эффект, и тирамина гидрохлорида. | 39 |
| 18 | Кривые “концентрация-эффект” для положительных контролей: тирамина гидрохлорида и фенилэтиламина. | 40 |
| 19 | Схема репортерной системы NanoBiT , используемая в данной работе. | 41 |
| 20 | Проверка специфичности ответа в системе NanoBiT на тирамин (100 мкМ) - агонист TAAR1 . | 42 |
| 21 | Кривые доза-эффект для известных агонистов TAAR1 . | 42 |
| 22 | Кривые доза-эффект для агонистов TAAR1 , разработанных в нашей лаборатории. | 43 |

| Рисунок № | Название рисунка | Страница |
|------------------|---|-----------------|
| 23 | <i>Результат скрининга серии ЛК.</i> | 43 |
| 24 | <i>Данные доза-эффект веществ серии ЛК.</i> | 45 |
| 25 | <i>Базальная горизонтальная двигательная активность и влияние введения LK00764 (40; 80 и 160 мг/кг) или 10% раствора Tween 80 в дистиллированной воде на горизонтальную двигательную активность WT (А,В) и DAT-KO (Б,Г) крыс.</i> | 49 |
| 26 | <i>Уровень двигательной активности крыс, находящихся под действием МК-801 (0,1 мг/кг, в/б), после введения различных вариантов растворов LK00764 160 мг/кг, п/о.</i> | 52 |
| 27 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-15 (N=3), AP163-30 (N=3), AP163-45 (N=3), AP163-15+GBR (N=8), AP163-30+GBR (N=3), AP163-45+GBR (N=6).</i> | 57 |
| 28 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-15 (N=3), AP163-15+GBR (N=8).</i> | 58 |
| 29 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-45 (N=3), AP163-45+GBR (N=6).</i> | 58 |
| 30 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), DS16-30 (N=6), DS16-30+GBR (N=9).</i> | 59 |
| 31 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), DS16-30 (N=6), DS16-30+GBR (N=9).</i> | 60 |
| 32 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-15 (N=4), LK1932-30 (N=4), LK1932-15+GBR (N=3), LK1932-15+GBR (N=3), LK1932-30+GBR (N=6).</i> | 61 |
| 33 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-15 (N=4), LK1932-15+GBR (N=3).</i> | 62 |
| 34 | <i>Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-30 (N=4), LK1932-30+GBR (N=6).</i> | 63 |
| 35 | <i>Различие между температурой тела мышей до эксперимента и через 100 мин после введений 10 мг/кг GBR12909 и 30 мг/кг DS16. Сравнение групп: контроль (N=9), GBR12909 (N=11), DS16-30 (N=4), DS16-30+GBR (N=9).</i> | 64 |

| Рисунок № | Название рисунка | Страница |
|------------------|--|-----------------|
| 36 | <i>Действие GBR12909 10 мг/кг внутривбрюшинно на горизонтальную двигательную активность мышей.</i> | 68 |
| 37 | <i>Действие DS16 100 мг/кг перорально на горизонтальную двигательную активность мышей.</i> | 70 |
| 38 | <i>Действие AP163 100 мг/кг перорально на горизонтальную двигательную активность мышей.</i> | 71 |

СПИСОК ТАБЛИЦ

| Таблица № | Название таблицы | Страница |
|-----------|---|----------|
| 1 | <i>Данные оценки активности новых соединений</i> | 33 |
| 2 | <i>Результат скрининга серии LK</i> | 44 |
| 3 | <i>Оценка EC50 у наиболее активных соединений</i> | 44 |
| 4 | <i>Вещества</i> | 51 |
| 5 | <i>Группы крыс</i> | 51 |
| 6 | <i>Распределение животных по группам</i> | 55 |
| 7 | <i>Дизайн исследования</i> | 66 |

1 ВВЕДЕНИЕ

Открытие в 2001 году нового класса моноаминергических рецепторов, сопряженных с G белками (G protein-coupled receptors, GPCRs) – рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами (Trace Amine-Associated Receptors, TAARs, 6 функциональных рецепторов идентифицированы у человека, TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9) открыла возможность изучения функциональной роли эндогенных Следовых Аминов (Trace amines, TA) в физиологии и патологии млекопитающих (Liberles S.D., Buck L.B., 2006; Borowsky V. et al. 2001). Следовые амины, такие как β -фенилэтиламин, тирамин, триптамин и октопамин, структурно близки к классическим моноаминам и играют важную роль в физиологии беспозвоночных, но их функции в организме млекопитающих, где они представлены в «следовых» количествах, остаются малоизученными (Berry M.D., 2004). Определение роли этих аминов и их рецепторов в физиологии млекопитающих могло бы объяснить многие загадки патологии и фармакологии моноаминергической передачи. В целом, ТА присутствуют в ЦНС и функционируют параллельно с моноаминергическими путями. ТА структурно связаны, ко-локализуются и высвобождаются вместе с биогенными аминами (Gainetdinov R.R., et al, 2018). Считается, что ТА обладают нейромодуляторными функциями классических нейротрансмиттеров, таких как дофамин, серотонин и норадреналин, на уровень которых влияют все используемые в клинической практике антидепрессанты и антипсихотические препараты. Нарушения в физиологии ТА уже длительное время ассоциируется с шизофренией и депрессией (Wolf M.E., Mosnaim A.D., 1983). Изменённые уровни следовых аминов были обнаружены также у пациентов, страдающих синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), болезнью Паркинсона и некоторыми другими заболеваниями мозга (Gainetdinov R.R., et al, 2018). Таким образом, считается, что идентификация новых лигандов TAAR рецепторов может привести к разработке принципиально новых лекарственных средств.

Наиболее изученным рецептором среди TAARs является TAAR1, который уже является доказанной мишенью для фармакологии широкого спектра психиатрических, неврологических и метаболических расстройств и агонисты TAAR1 уже находятся на стадии клинических испытаний компаниями F. Hoffmann La-Roche, Switzerland (нозологрия: нейропсихиатрические заболевания) и Sunovion, USA (нозологрия: шизофрения) (Koblan K.S. et al., 2020). Использование селективных агонистов TAAR1 и линии мышей, лишенных TAAR1 (TAAR1-КО мыши) в исследованиях показали, что TAAR1 агонисты могут быть эффективными при лечении психических и ряда других заболеваний мозга, таких как шизофрения, депрессия, СДВГ, наркомании, болезни Паркинсона, нарушения сна, причем

действуя как непосредственно, так и косвенно, путем модуляции других моноаминергических систем (Leo D. et al., 2014).

Психоневрологические расстройства остаются одной из главных проблем современного здравоохранения. По статистическим данным распространенность этой группы заболеваний в течение жизни у людей составляет около 30% (по данным некоторых исследований в развитых странах эта цифра доходит почти до 50%), то есть каждый третий человек в мире находится в группе риска. Среди детей и подростков частота встречаемости психических расстройств составляет 12,0 – 14,2%. По оценкам ВОЗ психоневрологические расстройства - одна из ведущих причин инвалидности в мире, уступая только сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям. За 2009 году мировые затраты, связанные с лечением и уходом за больными с этими заболеваниями, оценивают в 2,5 триллиона долларов США, и, ожидают, что к 2030 году они составят уже 6 триллионов долларов. Таким образом, психоневрологические заболевания – важная социальная проблема, требующая адекватного решения. В настоящее время ведущим подходом к лечению подобных заболеваний остаётся фармакотерапия. Однако современные фармакологические подходы к терапии психоневрологических расстройств недостаточно эффективны и вызывают у пациентов тяжёлые побочные эффекты. Поэтому поиск новых мишеней для фармакотерапии этих заболеваний - актуальная и важная проблема современной психофармакологии. Одной из таких мишеней могут быть открытые в 2001 году TAAR рецепторы к следовым аминам. Моноаминергическая система мозга оказалась «золотым рудником» в психофармакологии для самых продаваемых лекарств, которые были разработаны для лечения таких заболеваний мозга, как шизофрения, депрессия, биполярные расстройства, тревожные состояния, СДВГ, и другие (Caron M.G., Gainetdinov R.R., 2006). TAAR1 являлся предметом детальных исследований в последнее десятилетие, и накопленная доклиническая информация показывает потенциальную эффективность агонистов этого рецептора при ряде психоневрологических расстройств, таких как шизофрения и депрессия, а также при диабете и ожирении. Наличие оригинальных TAAR1 агонистов позволяет приступить к непосредственной разработке таких лекарственных средств. Рецепторы TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9 представляют абсолютно новые и в настоящее время не изученные мишени для модулирования функции мозга и других систем. Оценка механизмов такой модуляции, понимание функциональной роли TAAR, а также идентификация TAAR-селективных соединений в комбинации с исследованиями на соответствующих моделях животных представляют собой эффективный подход для определения потенциальной терапевтической ценности этих

новых мишеней. Эти исследования могут привести к разработке принципиально новых фармацевтических препаратов для лечения болезней человека.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

Лабораторией нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ в 2022-2024 гг. были проведены исследования в рамках НИР по теме «Поиск химических соединений, обладающих агонистическими и антагонистическими свойствами к TAAR рецепторам следовых аминов, исследования их фармакодинамики и механизма действия». Основанием для проведения работ является договор №9112-2022 от 01.12.2022. Получен ряд результатов по следующим направлениям:

- 1) Синтез библиотеки химических соединений – потенциальных агонистов TAAR1.
- 2) *In vitro* тестирование активности потенциальных агонистов TAAR.
 - a) Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) в тест-системе BRET.
 - b) Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) в тест-системе NanoBiT.
- 3) Исследование активности LK00764 в физиологических тестах *in vivo*.
 - a) Острое введение LK00764 для оценки его действия на модели двигательной гиперактивности, вызванной DAT-ингибитором GBR-12909.
 - b) Острое интрагастральное введение LK00764 для оценки его действия на модели двигательной гиперактивности у крыс, нокаутных по гену DAT.
 - c) Острое и хроническое введение LK00764 для оценки его действия на поведение в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тест вынужденного плавания».
 - d) Сравнение гипотермического эффекта LK00764 на мышей дикого типа и TAAR1-нокаутов.

Все экспериментальные вмешательства проводилась в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» № 755 от 12.08.1977, «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 и в соответствии с международными нормами по проведению медико-биологических исследований с использованием животных.

2.1 Синтез библиотеки химических соединений – потенциальных агонистов TAAR1

2.1.1 Обоснование исследования

В то время как TAAR1 становится горячей мишенью в психофармакологии, известно относительно небольшое количество сильнодействующих и селективных лигандов TAAR1. В большинстве доклинических исследований агонистов TAAR1 участвовали производные имидазола (например, RO5073012) (Galley G. et al. 2012) или 2-аминооксазолина (например, RO5166017) (Galley G. et al. 2016). Агонисты TAAR1 других химических классов, такие как производные бигуанидов (Guariento S. et al., 2018) и 2-(2-аминоэтил)триазолы (Krasavin M. et al., 2022), исследовались только в исследованиях активности *in silico* и *in vitro*.

Ранее нами был обнаружен субмикромольный агонист TAAR1 (1 или 4-(2-аминоэтил)-N-фенилпиперидин-1-карбоксамид дигидрохлорид), который демонстрировал дозозависимую активацию рецептора и был основан на 4-(2-аминоэтил)пиперидиновом ядре, ранее не связанное с модуляцией TAAR1 в литературе (Рисунок 1). Соединение уже имело довольно многообещающий уровень эффективности ($EC_{50} = 0,507 \mu M$) со 100% агонизмом в отношении TAAR1 по сравнению с $1 \mu M$ β -фенилэтиламина, используемого в качестве положительного контроля. Кроме того, в данной структуре отсутствовали какие-либо стереоцентры, что рассматривалось как преимущество, так как хиральность может быть введена позже, на этапе оптимизации для увеличения аффинности к рецептору. Тем не менее, на данный момент не удастся повысить биодоступность данной молекулы при пероральном введении. Было принято решение провести работы по разработке новых методов синтеза соединений на основе базового ядра молекулы, а также провести оптимизацию данной молекулы (эта часть работы отражена в отчете «Современные подходы к синтезу соединений с фрагментом 1,2,4-триазола» А. Лукин, Москва 2024).

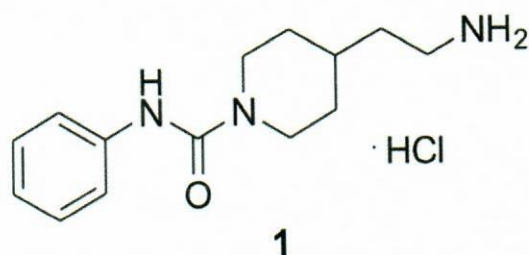


Рисунок 1 – Структура ранее открытого агониста TAAR1

Цель исследования

Синтез новой библиотеки химических соединений – потенциальных лигандов к человеческому рецептору следовых аминов 1 типа

Задача исследования

- 1) Разработать схему синтеза новых химических соединений на основании ядерной структуры замещенных 2-(5-арил-4*H*-1,2,4-триазол-3-ил)этанаминов, (азациклоалкил)метокси-замещенных бензамидов и замещенных 2,3,4,5-тетрагидробензо[*f*][1,4]оксазепинов
- 2) Синтезировать вещества из новой библиотеки в количестве, достаточном для проведения *in vitro* тестирования активности по отношению к человеческому TAAR1 с использованием технологии BRET и NanoBiT.

2.1.2 Синтез соединений – схемы синтеза

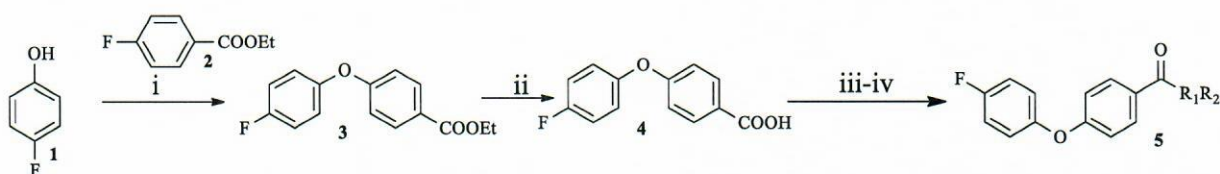


Рисунок 2 - Схема 1. Реагенты и условия: i. **2**, K₂CO₃, ДМФА, 120 °С., 12 ч; ii. 15% водн. р-р NaOH, MeOH, 50 °С., 4 ч. iii. R₁R₂NH, HBTU, Et₃N, ДМФА, комн. т, 12 ч; iv. 4М HCl, 1,4-диоксан

| LK01757 | LK01758 | LK01759 | LK01760 | LK01761 |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | | | |
| LK01762 | LK01763 | LK01764 | LK01765 | LK01766 |
| | | | | |
| LK01767 | LK01768 | LK01769 | LK01770 | |
| | | | | |

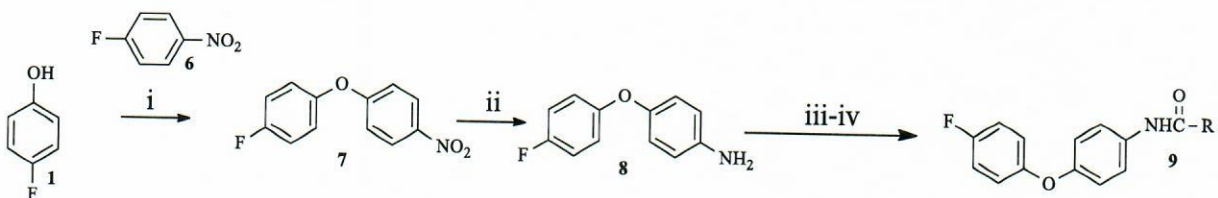


Рисунок 3 - Схема 2. Реагенты и условия: i. 6, K_2CO_3 , ДМФА, 120 °С., 12 ч; ii. H_2 , 10% Pd-C, 1 атм, комн.т., 4 ч iii. RCOOH, HBTU, Et_3N , ДМФА, комн. т, 12 ч; iv. 4M HCl, 1,4-диоксан

| LK1813 | LK1823 | LK1820 | LK1828 | LK01771 |
|--------|--------|--------|--------|---------|
| | | | | |
| LK1812 | LK1814 | LK1815 | LK1816 | LK1817 |
| | | | | |
| LK1818 | LK1821 | LK1822 | LK1824 | LK1825 |
| | | | | |
| LK1826 | LK1827 | LK1829 | | |
| | | | | |

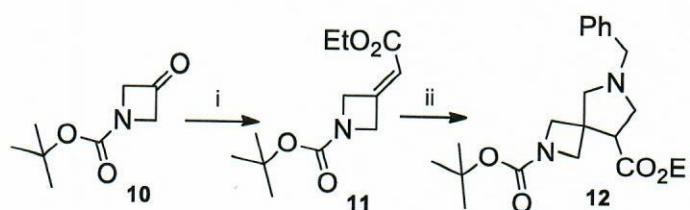


Рисунок 4 - Схема 3. Реагенты и условия: i. $\text{EtO}_2\text{CCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$, NaH, ТГФ, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$ комн.т.; ii. $\text{MeOCH}_2\text{N}(\text{Bn})\text{CH}_2\text{SiMe}_3$, LiF, MeCN, $60\text{ }^\circ\text{C}$, 18 ч.

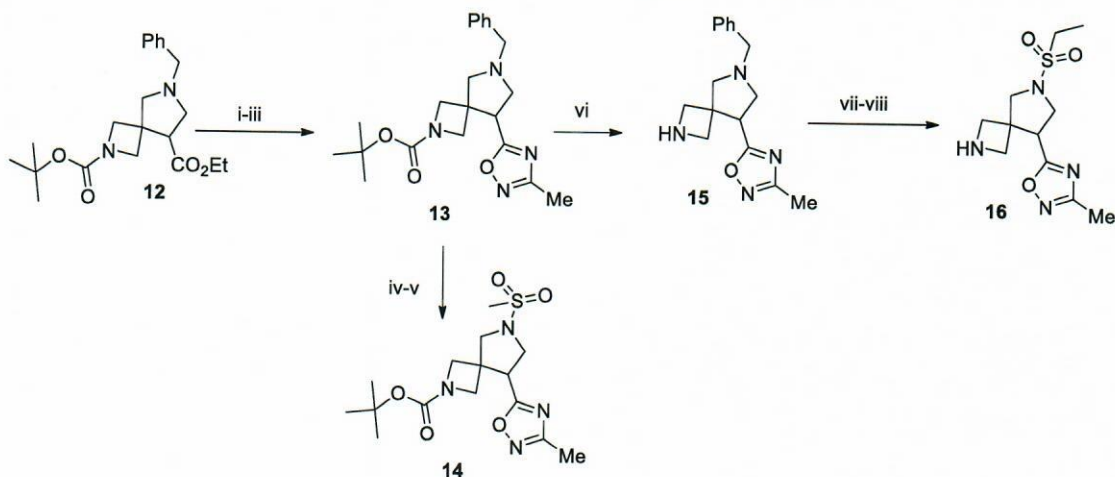


Рисунок 5 - Схема 4. Реагенты и условия: i. $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. амидоксим, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. TBAF, толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 6 ч; iv. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; v. MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$ комн.т., 18 ч. vi. CF_3COOH , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$ комн.т., 1 ч; vii. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч. viii. MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$ комн.т., 18 ч.

| | |
|---------|--|
| LK1952 | |
| LK 1936 | |
| LK 1878 | |

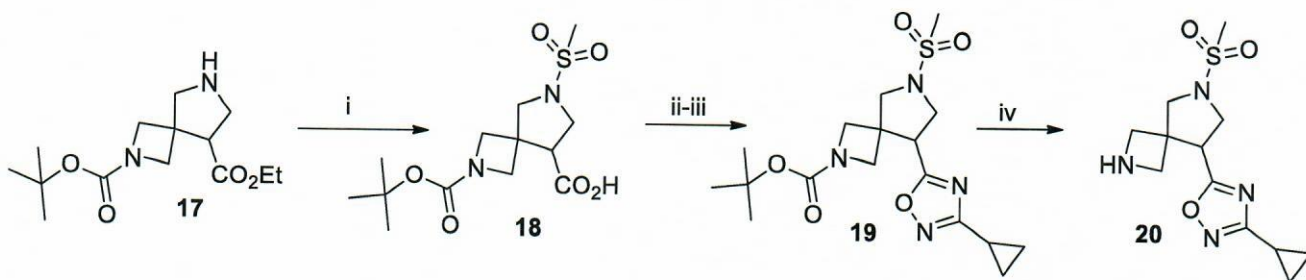


Рисунок 6 - Схема 5. Реагенты и условия: i. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. амидоксим, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. TBAF, толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 6 ч; iv. CF_3COOH , CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C}\rightarrow$ комн.т., 1 ч; iv. MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C}\rightarrow$ комн.т., 18 ч.

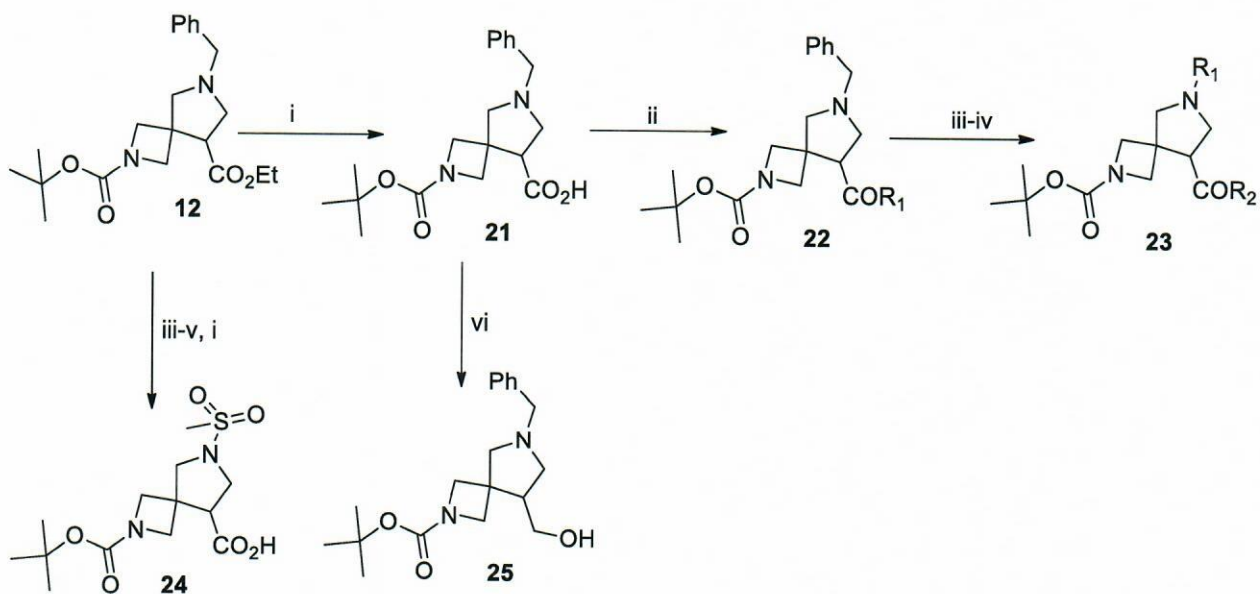
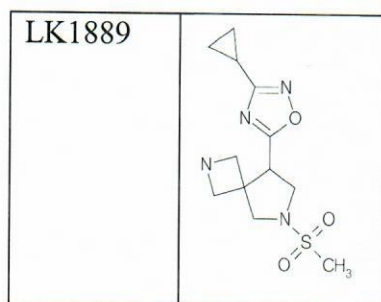


Рисунок 7 - Схема 6. Реагенты и условия: i. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. RNHR' , HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; iv. R_2NH_2 , КДИ, ДМФА, комн.т. v. MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C vi. LiAlH_4 , ТГФ $0^\circ\text{C}\rightarrow$ комн.т.

| | |
|--------|--|
| LK1873 | |
| LK1877 | |
| LK1879 | |
| LK1895 | |

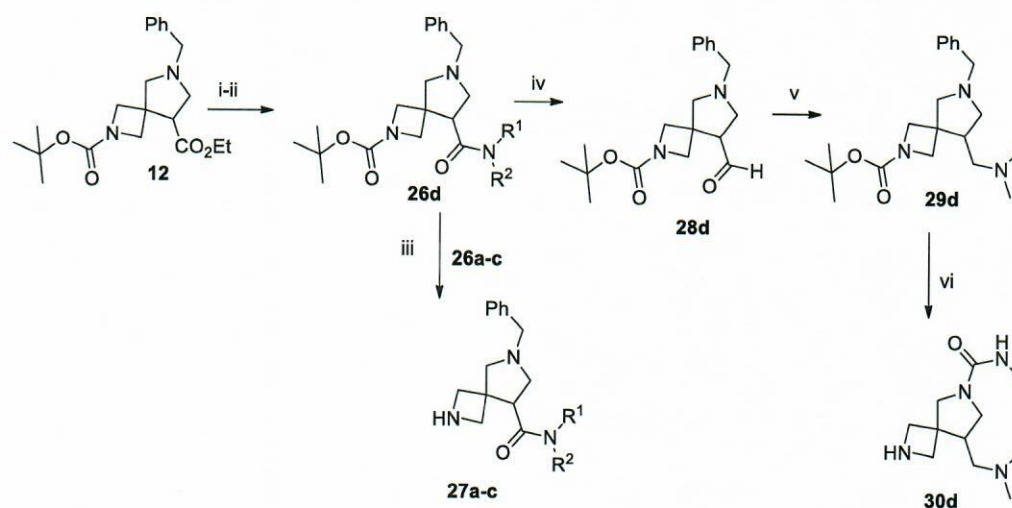
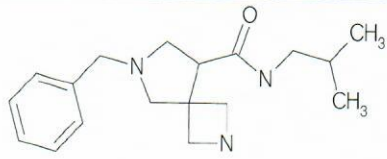
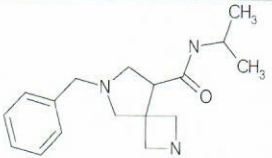
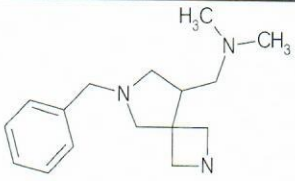
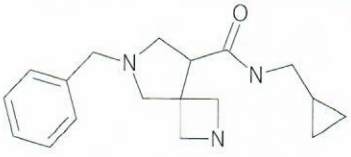
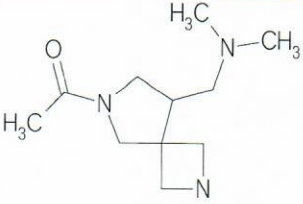
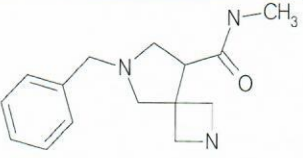
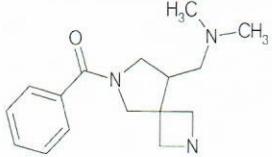


Рисунок 8 - Схема 7. Реагенты и условия: i. LiOH·H₂O, водн. 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; ii. RNHR', HOBt, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; iii. CF₃COOH, CH₂Cl₂, 0 °C → комн.т., 1 ч; iv. LiAlH₄, ТГФ, -70°C → -5°C; v. (CH₃)₂NH, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂, комн.т., 18 ч.; vi. H₂, 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., vii. RCOOH, КДИ, ДМФА, комн.т., 4 ч.

| | |
|--------|--|
| LK1943 |  |
| LK1943 |  |
| LK1931 |  |
| LK1919 |  |
| LK1951 |  |
| LK1957 |  |
| LK1959 |  |

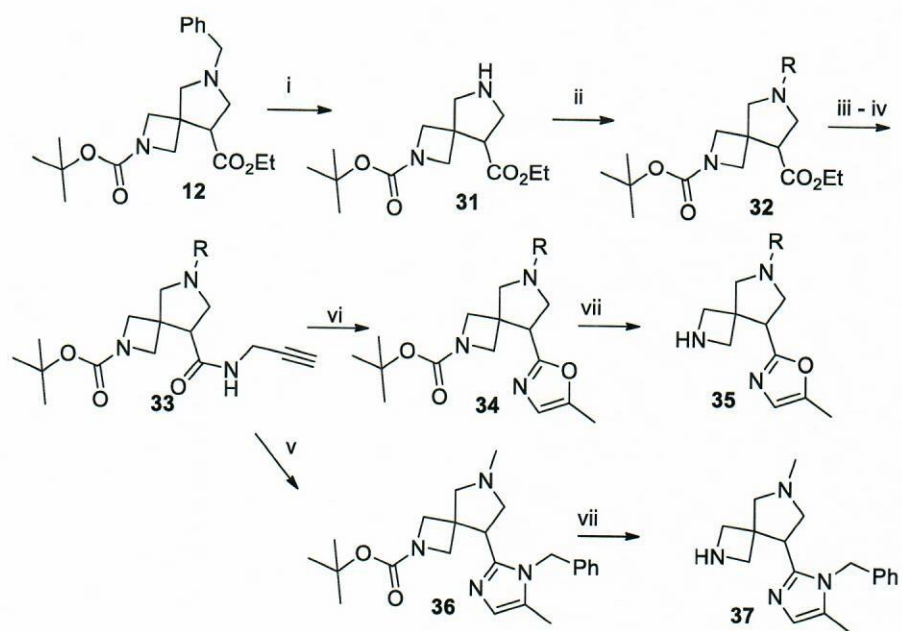
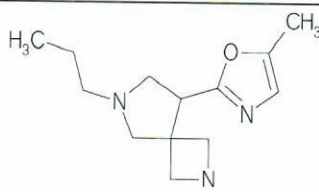
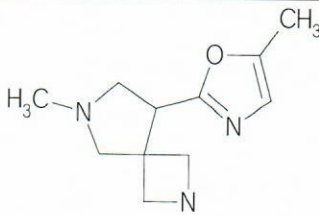


Рисунок 9 - Схема 8. Реагенты и условия: i. H_2 , 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; ii. альдегид, CH_2Cl_2 , $NaBH(OAc)_3$, комн.т., 18 ч; iii. $LiOH \cdot H_2O$, водн. 1,4-диоксан, комн.т., 12 ч; iv. пропаргиламин, HOBT, EDC·HCl, комн.т., 12 ч; v. $BnNH_2$, $Zn(OTf)_2$ (0.25 мол.%), толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 8 ч; vi. $Zn(OTf)_2$ (0.25 мол.%), толуол, кипячение с насадкой Дина Старка, 16 ч; vii. CF_3COOH , CH_2Cl_2 , $0^\circ C \rightarrow$ комн.т., 1 ч.

| | |
|--------|--|
| LK1962 | |
| LK1964 | |
| LK1965 | |

| | |
|--------|--|
| LK1967 |  |
| LK1968 |  |

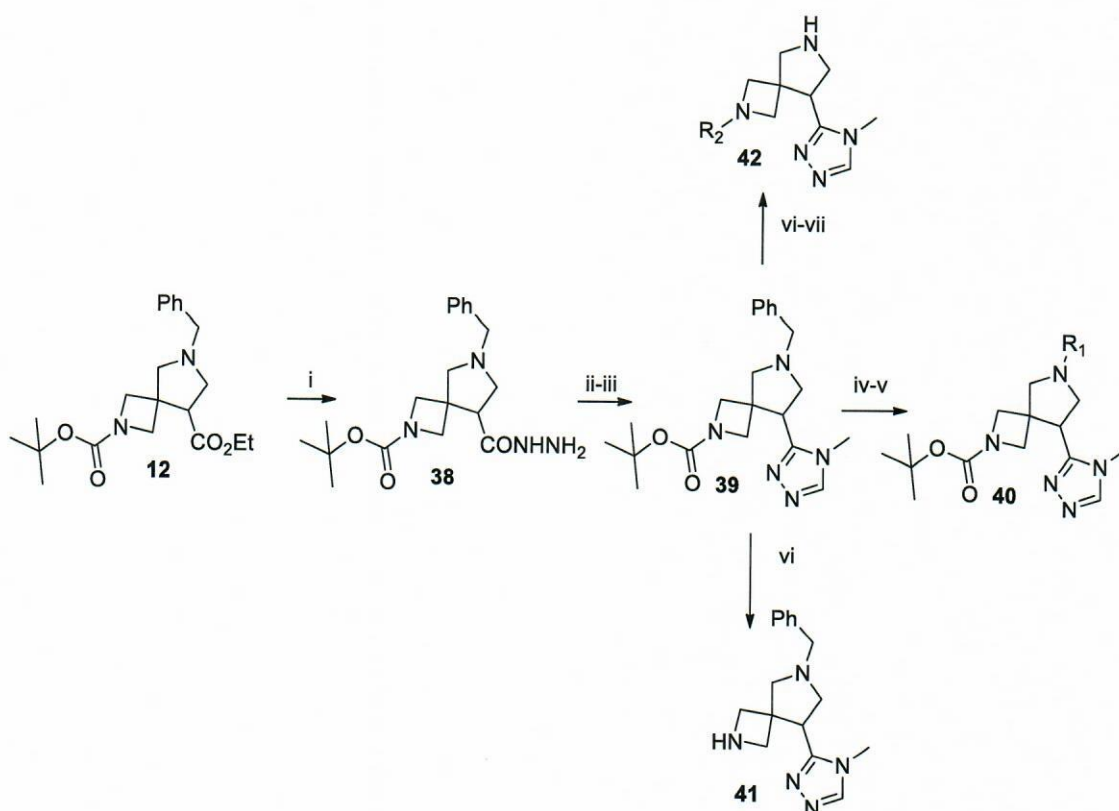
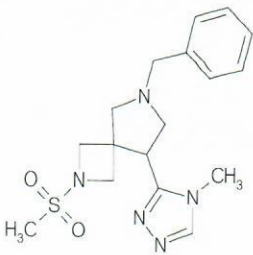
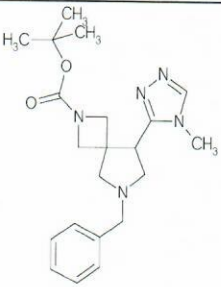
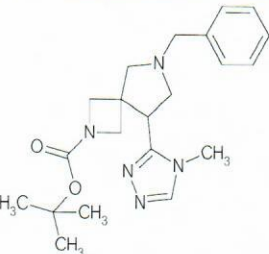
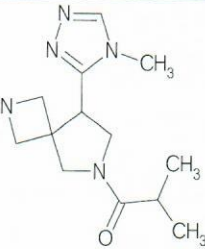
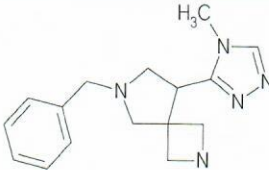
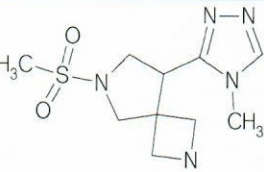
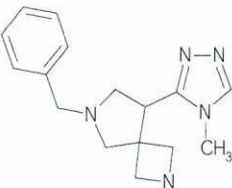


Рисунок 10 - Схема 9. Реагенты и условия: **i.** 64% водн. N₂H₄, этанол, кипячение, 8 ч; **ii.** MeNCS, этанол, кипячение, 2 ч; **iii.** Ni Реняя, этанол, кипячение, 12 ч; **iv.** H₂, 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; **v.** RCOOH, КДИ, ДМФА, комн.т., 4 ч.; **vi.** CF₃COOH, CH₂Cl₂, 0 °С→комн.т., 1 ч; **v. vi.** H₂, 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; **vii.** RCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °С→комн.т., 18 ч.

| | |
|--------|--|
| LK1872 |  |
| LK1855 |  |
| LK1876 |  |
| LK1888 |  |
| LK1914 |  |
| LK1916 |  |
| LK1918 |  |

| | |
|--------|--|
| LK1940 | |
| LK1960 | |
| LK1961 | |

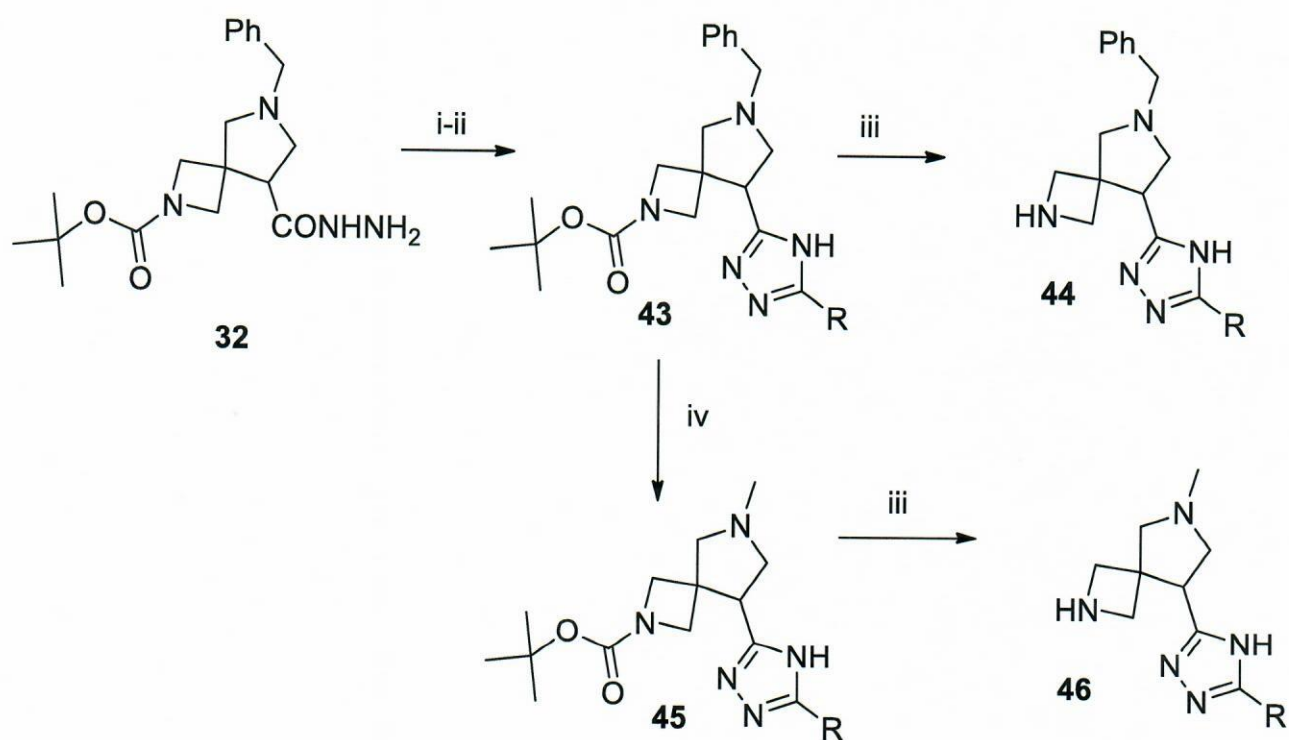
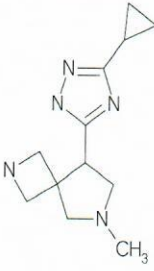
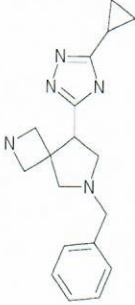
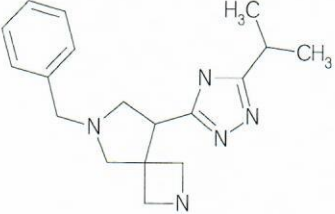
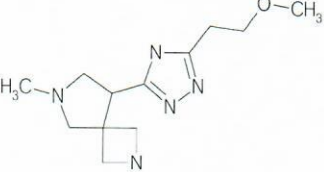
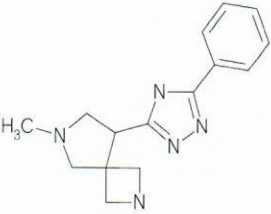
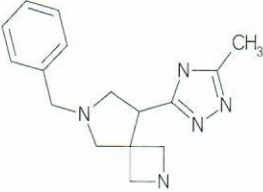


Рисунок 11 - Схема 10. Реагенты и условия: i. ацетамидин (циклопропанамидин) HCl, MeONa, MeOH, комн.т., 18 ч; ii. 170 °C в токе аргона; iii. CF₃COOH, CH₂Cl₂, 0 °C → комн.т., 1 ч. iv. H₂, 10% Pd-C, 100 атм, комн.т., 12 ч; v. 37% водн. формальдегид, CH₂Cl₂, NaBH(OAc)₃, комн.т., 18 ч.

| | |
|--------|--|
| LK1881 |  |
| LK1882 |  |
| LK1963 |  |
| LK1971 |  |
| LK1972 |  |
| LK1973 |  |

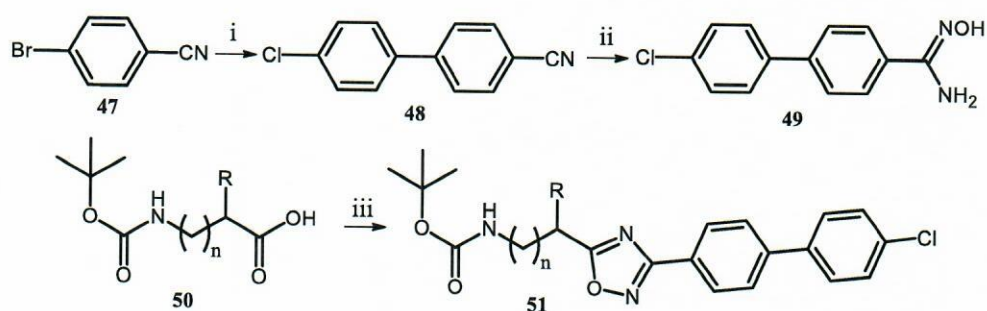


Рисунок 12 - Схема 11. Реагенты и условия: i. пара-хлорфенилбороновая кислота, K_2CO_3 , H_2O , диоксан, $Pd(PPh_3)_4$, $90\text{ }^\circ C$, 4 ч; ii. NH_2OH , $EtOH$, т.кип. 5 ч; iii. КДИ, ДМСО, 30 мин., затем **49**, 12 ч., затем $NaOH$, 30 мин.

| | | | |
|--------|--|--------|--|
| LK1888 | | LK1894 | |
| LK1889 | | LK1895 | |
| LK1890 | | LK1896 | |
| LK1891 | | LK1897 | |
| LK1892 | | LK1898 | |
| LK1893 | | LK1899 | |

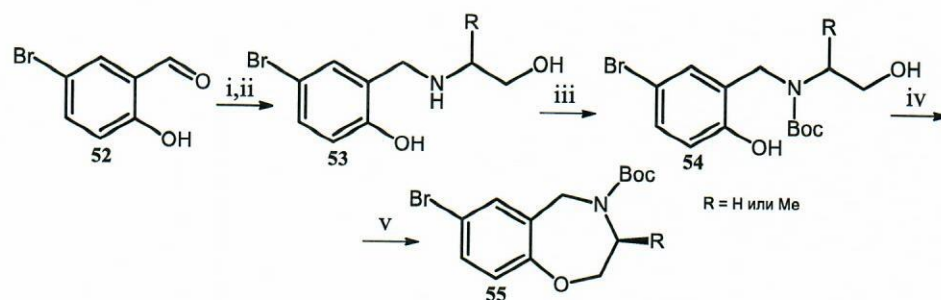


Рисунок 13 - Схема 12. Реагенты и условия: i. аминоэтанол, толуол, H₂O, диоксан, т.кип, 5 ч; ii. NaBH₄, EtOH, 0 °C → комн.т., 30 мин.; iii. Boc₂O, EtOAc, 18 ч, комн.т.; iv. DIAD, PPh₃, ТГФ, 18 ч.

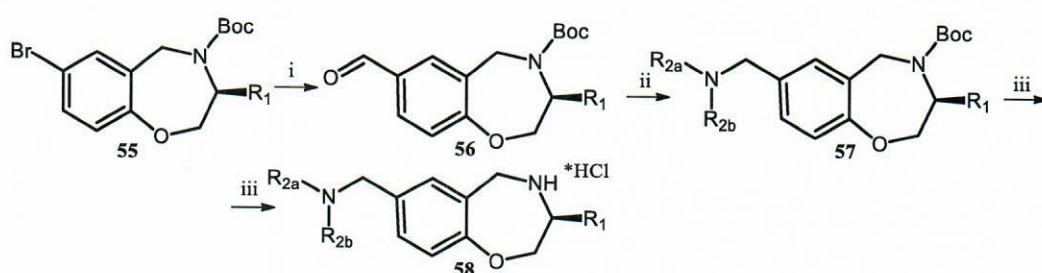


Рисунок 14 - Схема 13. Реагенты и условия: i. BuLi, ТГФ, -70 °C, 30 мин, затем ДМФА; ii. NHR₁R₂, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂, комн.т., 24; iii. 4M HCl/диоксан, комн. т., 8 ч.

| | | | |
|--------|--|--------|--|
| LK1856 | | LK1861 | |
| LK1857 | | LK1862 | |
| LK1858 | | LK1863 | |
| LK1859 | | LK1954 | |
| LK1860 | | LK1928 | |

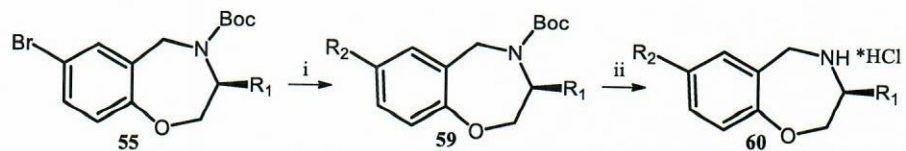


Рисунок 15 - Схема 14. Реагенты и условия: i. $\text{RB}(\text{OH})_2$, K_2CO_3 , H_2O , диоксан, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 90°C , 4 ч; ii. 4М HCl /диоксан, комн. т., 8 ч.

| | |
|--------|--|
| LK1865 | |
| LK1866 | |
| LK1867 | |
| LK1868 | |
| LK1875 | |

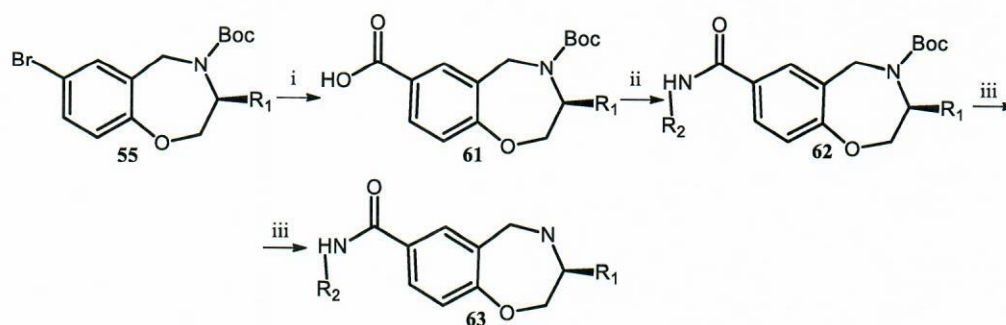
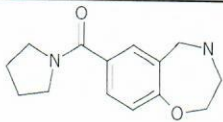
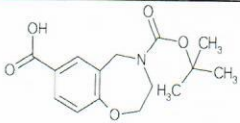
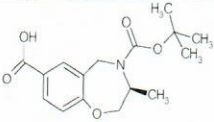
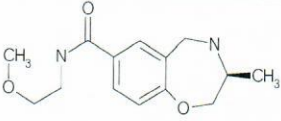
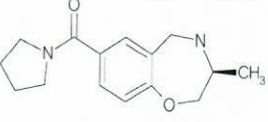


Рисунок 16 - Схема 15. Реагенты и условия: i. BuLi , ТГФ, -70°C , 30 мин, затем CO_2 ; ii. КДИ, $\text{NH}_2\text{-R}_2$, CH_2Cl_2 , комн.т., 2 ч; iii. 4М HCl /диоксан, комн. т., 8 ч.

| | |
|--------|---|
| LK1870 |  |
| LK1874 |  |
| LK1883 |  |
| LK1928 |  |
| LK1950 |  |

2.1.3 Заключение

Согласно вышеописанным схемам были синтезированы указанные соединения в количестве не менее 100мг для последующего анализа в *in vitro* тест-системах.

2.2 *In vitro* тестирование активности потенциальных агонистов TAAR1

2.2.1 Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) методом BRET

2.2.1.1 Обоснование исследования

Способность агонистов активировать человеческий TAAR1 оценивается *in vitro* по повышению внутриклеточного уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) при помощи метода резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET).

В основе метода BRET лежит способность химерного белка Rluc-EPAC-YFP изменять свою конформацию при связывании с цАМФ. В результате молекула-донор энергии (люцифераза кораллового полипа *R. reniformis* – Rluc) и молекула-акцептор (жёлтый флуоресцентный белок – YFP), обычно расположенные близко друг к другу в неактивированном состоянии EPAC (exchange protein activated by cAMP), значительно отдаляются, что приводит к снижению резонансного неизлучательного переноса энергии от донора к акцептору. В итоге изменяется соотношение интенсивности люминесценции акцептора (525 нм) и интенсивности люминесценции донора (480 нм), или так называемое соотношение BRET. Таким образом, при активации G α s-сигнального пути, возникающего при активации изучаемого рецептора каким-либо лигандом, будет наблюдаться снижение соотношения BRET. Следовательно, чем сильнее будет снижение данного соотношения от исходного уровня, тем более сильным агонистом будет считаться химическое соединение.

Цель исследования:

Провести *in vitro* скрининг и фармакологическую характеристику вновь синтезированных соединений-потенциальных агонистов рецептора следовых аминов 1-го типа (TAAR1).

Задача исследования:

Проверить способность ряда вновь синтезированных соединений-потенциальных агонистов *in vitro* активировать человеческий TAAR1 (hTAAR1), с помощью оценки повышения внутриклеточного уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) методом резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET).

2.2.1.2 Материалы и методы исследования

Для проведения *in vitro* тестирования с использованием технологии BRET культуру клеток линии CHO-K1 (ATCC) выращивали до достижения 70-90 % монослоя. Клетки ко-трансфецировали двумя экспрессионными векторами (по 3-5 мкг ДНК), кодирующими hTAAR1 и EPAC соответственно, посредством реагента Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) в соответствии с инструкцией производителя. Трансфицированные клетки засеивали в 96-

луночные планшеты для люминесцентных методов (Costar) из расчета 80000-100000 клеток на лунку. Клетки выращивали на планшетах в течение 24 часов. Затем культуральную жидкость осторожно удаляли и в каждую лунку вносили по 70 мкл среды DMEM без красителя фенолового красного (Sigma), содержащей 0,03% аскорбиновой кислоты, после чего добавляли по 10 мкл 2мМ раствора 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma) в качестве ингибитора фосфодиэстеразы, и по 10 мкл субстрата люциферазы – 50 мкМ раствора коэлектрантина h (Promega). Планшет инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноте, вносили в лунки по 10 мкл необходимых разведений исследуемых соединений и инкубировали ещё 5 мин при комнатной температуре в темноте. Далее планшет помещали в микропланшетный ридер Mithras LB943 (Berthold Technologies), и регистрировали интенсивность люминесценции при длинах волн 535 и 480 нм. При проведении первичного скрининга соединения тестировались в дубликатах. Для веществ, показавших наибольший эффект при первичном скрининге, ставились отдельные опыты по оценке зависимости эффекта от концентрации (8 точек); при этом тестирование производилось в 3 повторах. В качестве положительных контролей применялись природные агонисты hTAAR1 тирамина гидрохлорид и/или фенилэтиламин (Sigma). Рассчитанные после вычитания бланковых проб значения Δ BRET использовались для построения кривых «концентрация-эффект» и вычисления медианной эффективной концентрации (EC_{50}) при помощи нелинейной регрессионной модели применяя специализированное ПО GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software).

2.2.1.3 Результаты

Всего было проверено 196 веществ. Полученные результаты сведены в Таблицу 1.

Таблица 1. Данные оценки активности новых соединений

| Compound ID | MW | E _{max} * at 1 μ M, % | EC ₅₀ , μ M |
|-------------|--------|------------------------------------|----------------------------|
| LK1813 | 414,86 | 90,91 | |
| LK1823 | 336,79 | 138,56 | |
| LK1820 | 376,85 | 66,79 | |
| LK1828 | 336,79 | 99,65 | |
| LK1844 | 401,86 | Inactive | |
| LK01771 | 350,81 | 94,75 | |
| LK1812 | 364,84 | Inactive | |
| LK1814 | 368,81 | Inactive | |
| LK1815 | 364,84 | Inactive | |

| Compound ID | MW | E_{max}* at 1 μM, % | EC₅₀, μM |
|--------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| LK1816 | 350,81 | 62,26 | |
| LK1817 | 388,26 | Inactive | |
| LK1818 | 368,81 | 104,88 | >10 |
| LK1821 | 380,84 | Inactive | |
| LK1822 | 380,84 | Inactive | |
| LK1823 | 336,79 | 138,56 | 0,003 |
| LK1824 | 322,76 | 97,88 | |
| LK1825 | 350,81 | Inactive | |
| LK1826 | 310,75 | 72,34 | |
| LK1827 | 350,81 | 78,68 | |
| LK1828 | 336,79 | 99,65 | 0,01 |
| LK1829 | 296,72 | 78,89 | |
| LK01757 | 364,84 | Inactive | |
| LK01758 | 336,79 | 62,42 | |
| LK01759 | 350,81 | Inactive | |
| LK01760 | 350,81 | 62,61 | |
| LK01761 | 350,81 | Inactive | |
| LK01762 | 336,79 | 111,81 | 1,05 |
| LK01763 | 336,79 | Inactive | |
| LK01764 | 364,84 | Inactive | |
| LK01765 | 352,83 | Inactive | |
| LK01766 | 338,8 | Inactive | |
| LK01767 | 378,87 | Inactive | |
| LK01768 | 394,87 | Inactive | |
| LK01769 | 364,84 | 72,03 | |
| LK01770 | 350,81 | Inactive | |
| LK01625 | 371,37 | Inactive | |
| LK01627 | 371,37 | 65,35 | |
| LK01630 | 357,39 | Inactive | |
| LK01632 | 311,7 | Inactive | |
| LK01633 | 375,77 | Inactive | |
| LK01636 | 482,52 | Inactive | |
| LK01637 | 335,71 | Inactive | |
| LK01639 | 425,34 | 125,11 | >10 |
| LK1855 | 419,96 | Inactive | |
| LK1856 | 384,78 | Inactive | |

| Compound ID | MW | E_{max}* at 1 μM, % | EC₅₀, μM |
|--------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| LK1857 | 305,25 | Inactive | |
| LK1858 | 470,27 | Inactive | |
| LK1859 | 321,25 | Inactive | |
| LK1860 | 367,32 | Inactive | |
| LK1861 | 434,8 | Inactive | |
| LK1862 | 335,27 | Inactive | |
| LK1863 | 289,38 | Inactive | |
| LK1864 | 313,23 | Inactive | |
| LK1865 | 264,55 | 57,16 | |
| LK1866 | 310,23 | Inactive | |
| LK1867 | 313,23 | Inactive | |
| LK1868 | 335,27 | Inactive | |
| Lk1869 | 406,78 | Inactive | |
| LK1870 | 282,77 | Inactive | |
| LK1871 | 370,46 | Inactive | |
| LK1872 | 361,47 | Inactive | |
| LK1873 | 334,39 | Inactive | |
| LK1874 | 293,32 | Inactive | |
| LK1875 | 314,22 | Inactive | |
| LK1876 | 383,5 | Inactive | |
| LK1877 | 332,45 | Inactive | |
| LK1878 | 372,45 | Inactive | |
| LK1879 | 309,41 | Inactive | |
| LK1880 | 328,84 | Inactive | |
| LK1881 | 306,24 | Inactive | |
| LK1882 | 418,8 | Inactive | |
| LK1883 | 307,35 | Inactive | |
| LK1884 | 317,82 | 73,86 | |
| LK1885 | 247,73 | 98,7 | |
| LK1886 | 309,8 | Inactive | |
| LK1887 | 314,82 | Inactive | |
| LK1888 | 336,27 | Inactive | |
| LK1889 | 334,83 | Inactive | |
| LK1890 | 286,76 | 61,11 | |
| LK1891 | 330,86 | 53,47 | |
| LK1892 | 217,7 | Inactive | |

| Compound ID | MW | E_{max}* at 1 μM, % | EC₅₀, μM |
|--------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| LK1893 | 297,76 | Inactive | |
| LK1894 | 287,79 | 79,12 | |
| LK1895 | 417,38 | 72,26 | |
| LK1896 | 248,26 | Inactive | |
| LK1897 | 265,72 | Inactive | |
| LK1898 | 284,72 | Inactive | |
| LK1899 | 337,83 | Inactive | |
| LK1900 | 257,76 | Inactive | |
| LK1901 | 247,7 | 100,13 | 0,046 |
| LK1902 | 221,66 | Inactive | |
| LK1903 | 287,79 | Inactive | |
| LK1904 | 341,82 | Inactive | |
| LK1905 | 327,86 | Inactive | |
| LK1906 | 287,79 | 70,43 | |
| LK1907 | 357,28 | Inactive | |
| LK1908 | 361,27 | Inactive | |
| LK1909 | 361,27 | Inactive | |
| LK1910 | 331,84 | 81,86 | |
| LK1911 | 283,73 | Inactive | |
| LK1912 | 316,83 | Inactive | |
| LK1913 | 372,34 | Inactive | |
| LK1914 | 392,76 | Inactive | |
| LK1915 | 247,73 | Inactive | |
| LK1916 | 344,26 | 69,48 | |
| LK1917 | 310,8 | 67,37 | |
| LK1918 | 392,76 | Inactive | |
| LK1919 | 372,34 | 53,27 | |
| LK1920 | 332,27 | Inactive | |
| LK1921 | 357,28 | Inactive | |
| LK1922 | 321,18 | Inactive | |
| LK1923 | 261,75 | Inactive | |
| LK1924 | 309,8 | 56,38 | |
| LK1925 | 277,75 | Inactive | |
| LK1926 | 286,76 | Inactive | |
| LK1927 | 281,36 | Inactive | |
| LK1928 | 300,79 | Inactive | |

| Compound ID | MW | Emax* at 1 μM, % | EC50, μM |
|--------------------|-----------|--|--------------------------------|
| LK1929 | 302,76 | 64,87 | |
| LK1930 | 277,73 | 48,22 | |
| Lk1931 | 368,78 | Inactive | |
| LK1932 | 273,34 | Inactive | |
| LK1933 | 234,23 | Inactive | |
| LK1934 | 272,74 | Inactive | |
| LK1935 | 273,76 | 78,17 | |
| Lk1936 | 322,82 | Inactive | |
| LK1937 | 306,17 | Inactive | |
| LK1938 | 273,76 | 96,29 | |
| Lk1939 | 300,79 | Inactive | |
| LK1940 | 338,24 | Inactive | |
| LK1941 | 310,8 | Inactive | |
| LK1942 | 296,78 | Inactive | |
| LK1943 | 374,36 | Inactive | |
| LK1944 | 297,23 | 50,25 | |
| Lk1945 | 336,84 | Inactive | |
| LK1946 | 322,82 | Inactive | |
| LK1947 | 274,75 | Inactive | |
| LK1949 | 360,33 | Inactive | |
| LK1950 | 296,8 | Inactive | |
| LK1951 | 284,23 | Inactive | |
| Lk1952 | 357,28 | Inactive | |
| LK1953 | 289,81 | Inactive | |
| Lk1954 | 346,88 | Inactive | |
| LK1955 | 289,81 | Inactive | |
| LK1956 | 312,8 | Inactive | |
| LK1957 | 332,27 | Inactive | |
| LK1958 | 260,72 | 62,65 | |
| Lk1959 | 346,3 | Inactive | |
| LK1960 | 308,21 | Inactive | |
| LK1961 | 356,3 | Inactive | |
| Lk1962 | 405,8 | Inactive | |
| LK1963 | 420,81 | Inactive | |
| LK1964 | 280,2 | Inactive | |
| LK1965 | 511,38 | Inactive | |

| Compound ID | MW | E_{max}* at 1 μM, % | EC₅₀, μM |
|--------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|
| LK1966 | 357,28 | Inactive | |
| LK1967 | 308,25 | Inactive | |
| LK1968 | 280,2 | Inactive | |
| LK1969 | 340,29 | Inactive | |
| LK1970 | 369,47 | 93,58 | |
| LK1971 | 360,71 | Inactive | |
| LK1972 | 378,73 | Inactive | |
| LK1973 | 392,76 | 67,11 | |
| LK1888 | 376,27 | 71,93 | |
| LK1889 | 336,21 | 90,25 | 0,017 |
| LK1890 | 376,27 | 93,49 | 0,099 |
| LK1891 | 376,27 | 67,01 | |
| LK1892 | 362,25 | 78,07 | |
| LK1893 | 336,21 | 66,04 | |
| LK1894 | 364,26 | 71,74 | |
| LK1895 | 378,29 | 70,46 | |
| LK1896 | 412,31 | 70,97 | |
| LK1897 | 390,3 | 75,64 | |
| LK1898 | 336,21 | 82,99 | |
| LK1899 | 362,25 | 83,56 | |
| LK01910A | 411,76 | 124,74 | |
| LK01911A | 397,74 | 122,7 | |
| LK01912A | 411,76 | 132,63 | 0,0011 |
| LK01913A | 383,71 | 106,54 | |
| LK01914A | 411,76 | 113,19 | |
| LK01915A | 357,67 | 116,77 | |
| LK01916A | 371,7 | 112,78 | |
| LK01917A | 413,78 | 132,06 | 0,012 |
| LK01918A | 447,8 | 125,81 | |
| LK01919A | 397,74 | 131,56 | |
| LK01921A | 425,79 | 136,5 | |
| LK01922A | 411,76 | 137,55 | 0,019 |
| LK01924A | 389,69 | 112,97 | |
| LK01925A | 373,23 | 112,5 | |
| LK01926A | 385,27 | 101,37 | |
| LK01927A | 391,22 | 90,65 | |

| Compound ID | MW | E _{max} * at 1 μM, % | EC ₅₀ , μM |
|-------------|--------|-------------------------------|-----------------------|
| LK01928A | 369,27 | 85,3 | |
| LK01929A | 369,27 | 122,38 | |
| LK01930A | 373,23 | 117,34 | |
| LK01931A | 371,7 | 76,2 | |
| LK01932A | 355,24 | 136,9 | 0,04 |
| LK01933A | 391,22 | 110,01 | |
| LK01934A | 423,24 | 87,18 | |

*активность исследованного соединения по отношению к активности 1 μM тирамина гидрохлорида (положительный контроль), принятой за 100%.

Как видно, не все изученные вещества оказались активными – большинство было отброшено при первичном скрининге, остающиеся показали эффект в большей или меньшей степени (Табл.1), из них 10 соединений имеют показатель EC₅₀ в пределах от 1 мкМ до 1 нМ (Табл.1). Кривые «концентрация-эффект» для четырёх наиболее активных соединений (LK01912A с EC₅₀=1,1 нМ; LK01917A с EC₅₀=11,8 нМ; LK01922A с EC₅₀=19,1 нМ и LK01932A с EC₅₀=39,9 нМ) представлены на рисунке 17.

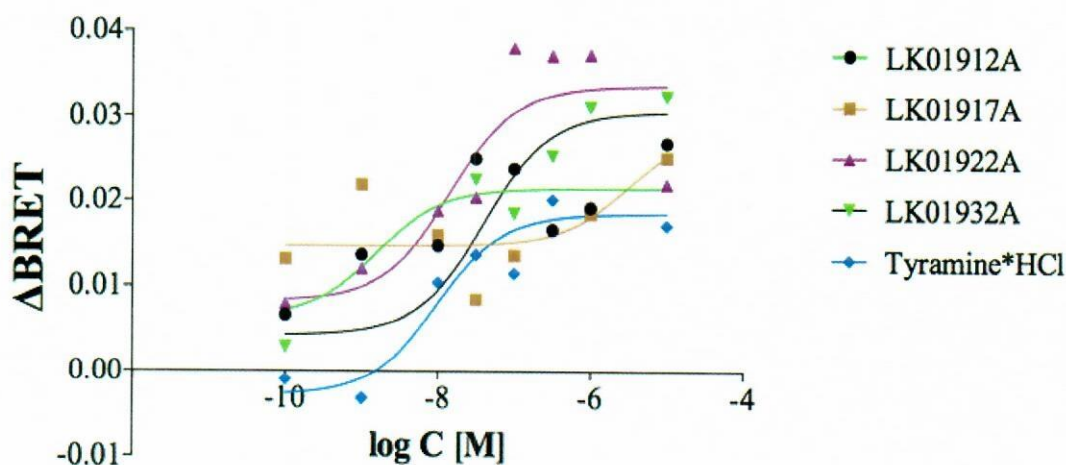


Рисунок 17. Кривые “концентрация-эффект” для веществ, показавших наибольший эффект, и тирамина гидрохлорида

Природные агонисты TAAR1 тирамина гидрохлорид и фенилэтиламин (PEA) показали свой обычно высокий эффект (Рис. 18), что указывает на адекватность используемой тест-системы.

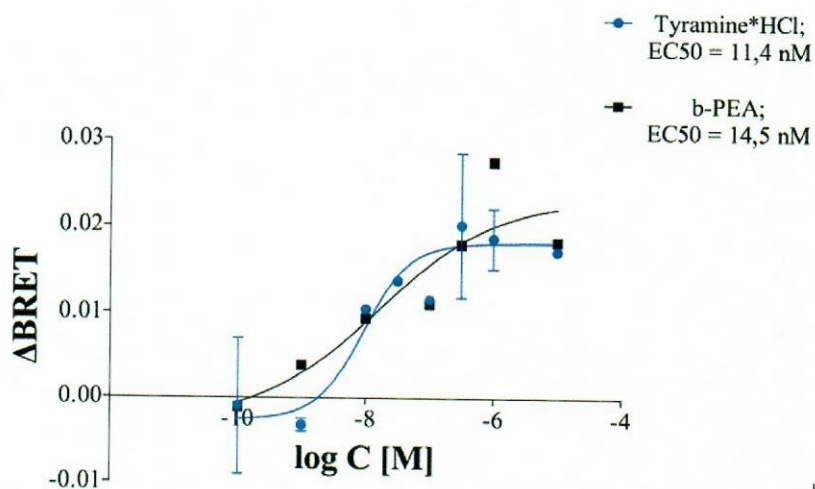


Рисунок 18. Кривые “концентрация-эффект” для положительных контролей: тирамина гидрохлорида и фенилэтиламина

2.2.1.4 Заключение и выводы

Проверено *in vitro* на агонизм в отношении человеческого TAAR1 196 вновь синтезированных соединений. Большинство было отброшено при первичном скрининге, остающиеся показали эффект в большей или меньшей степени (Табл.1), из них 10 соединений имеют показатель EC50 в пределах от 1 мкМ до 1 нМ (Табл.1). Четыре наиболее активных *in vitro* соединения (LK01912A, LK01917A, LK01922A и LK01932A) можно предложить проверить на специфическое действие *in vivo*.

2.2.2 Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) методом NanoBiT

2.2.2.1 Обоснование исследования

NanoBiT — это структурная комплементарная репортерная система, которая позволяет изучать белок-белковые взаимодействия в живых клетках. Она основана на использовании сплэтированной нанолуциферазы, разделенные части которой клонированы на разных векторах и прикреплены к нашим интересующим белкам. Эти две части называются большой субъединицей (LgBiT; 17,6 кДа) и малой субъединицей (SmBiT; пептид из 11 аминокислот). Когда оба вектора экспрессируются в клетках, субъединицы объединяются только если два белка взаимодействуют, образуя активный фермент и генерируя яркий люминесцентный сигнал в присутствии субстрата (рисунок 19).

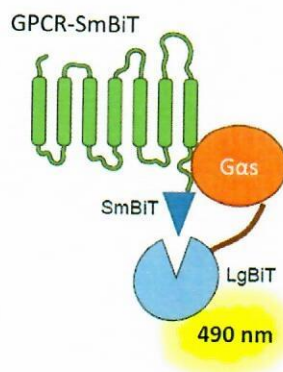


Рисунок 19. Схема репортерной системы NanoBiT, используемая в данной работе

Цель исследования:

Провести *in vitro* скрининг и фармакологическую характеристику вновь синтезированных соединений-потенциальных агонистов рецептора следовых аминов 1-го типа (TAAR1), выявленных методом BRET

Задача исследования:

Проверить способность ряда вновь синтезированных соединений-потенциальных агонистов *in vitro* активировать человеческий TAAR1 (hTAAR1), с помощью структурной комплементарной репортерной системы NanoBiT.

2.2.2.2 Материалы и методы исследования

В данной работе ген человеческого TAAR1 был клонирован с последовательностью SmBiT на C-конце, а Gs белок была слита с LgBiT на N-конце. В случае активации рецептора белок Gs подходит к нему и благодаря комплементации люцифераза становится активным холоферментом, испускающим свет при наличии окисляемого субстрата фуримазина. Эта люминесценция в свою очередь служит показателем активации рецептора TAAR1. Для увеличения поверхностной экспрессии на N-конец TAAR1 была добавлена последовательность 23 первых а.к. рецептора mGluR5, а также HA-таг для детекции. Для проведения NanoBiT культуру клеток HEK293T в чашке 10 см котрансфецировали двумя экспрессионными векторами Gs-LgBiT (0.5 мкг) и TAAR-SmBiT (5 мкг). Трансфекция длилась 17-18 часов. После инкубации рассеивали клетки в "белые" 96-луночные планшеты для тестирования из расчёта 50 000/лунка и инкубировали 24 часа. Через 24 часа после посева вносили в лунки исследуемые соединения и измеряли ответ. Данные представлены как среднее±SEM.

2.2.2.3 Результаты

Для валидации специфичности ответа и используемой конструкции использовали котрансфекцию TAAR-SmBiT с вектором-«пустышкой», несущим последовательность LgBiT. А также комбинацию Gs-LgBiT/вектор-«пустышка» SmBiT. При проверке на высокую концентрацию агониста тирамина специфический ответ наблюдался только в комбинации TAAR+Gs (рисунок 20).

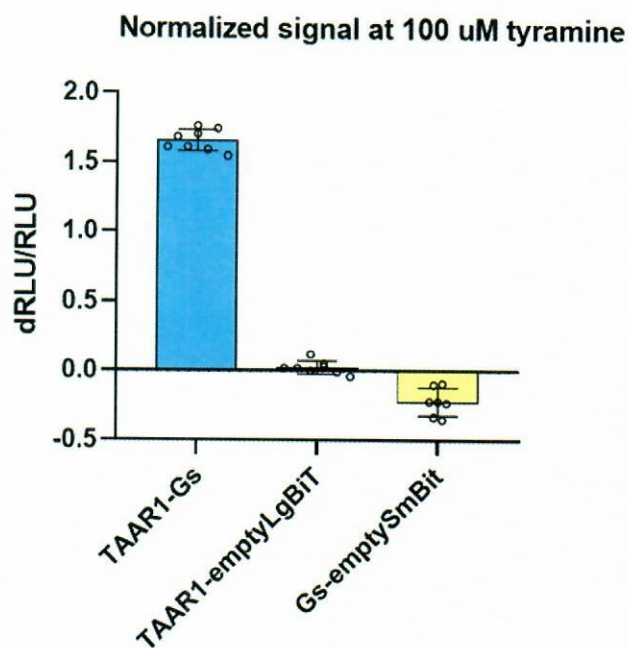


Рисунок 20. Проверка специфичности ответа в системе NanoBiT на тирамин (100 μM) - агонист TAAR1

Далее была построена кривая доза-эффект тирамина, а также RO5263397H, селективного агониста TAAR1, разработанного компанией Roche. Были получены значения EC_{50} , сходные с лит. данными: EC_{50} (Tyr) = 275 нМ, EC_{50} (RO5263397H) = 6 нМ (рисунок 21)

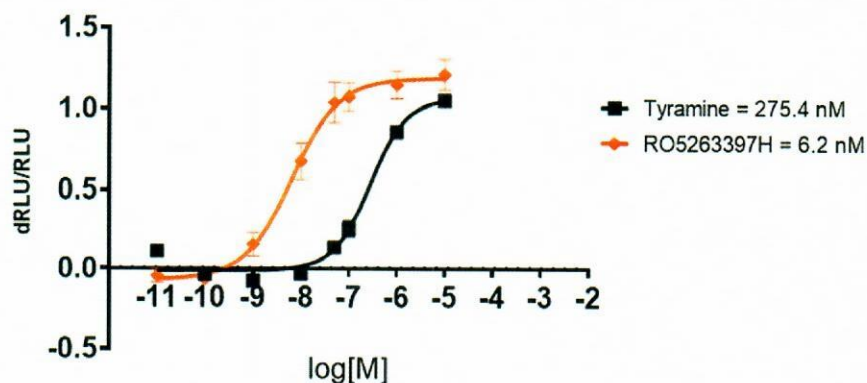


Рисунок 21. Кривые доза-эффект для известных агонистов TAAR1.

После валидации системы была проведена оценка EC50 разработанных в нашей лаборатории агонистов TAAR1: LK00764 (Lot#CC-11916), AP163, DS16 (рисунок 22).

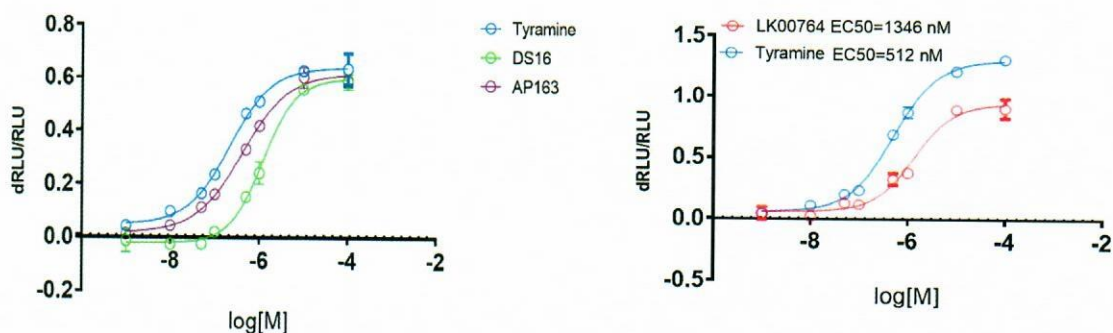


Рисунок 22. Кривые доза-эффект для агонистов TAAR1, разработанных в нашей лаборатории.

В соответствии с полученными данными, LK00764 является неполным агонистом TAAR1 с активностью 1,3 мкМ. Эти данные получили подтверждение в трех независимых экспериментах. EC50 (AP163) = 414 нМ, что соответствует данным, полученным ранее. EC50 (DS16) – 1.2 мкМ.

Далее был проведен скрининг серии веществ в концентрации 10 мкМ, синтезированных на основе формулы LK00764 (рисунок 23 и таблица 2).

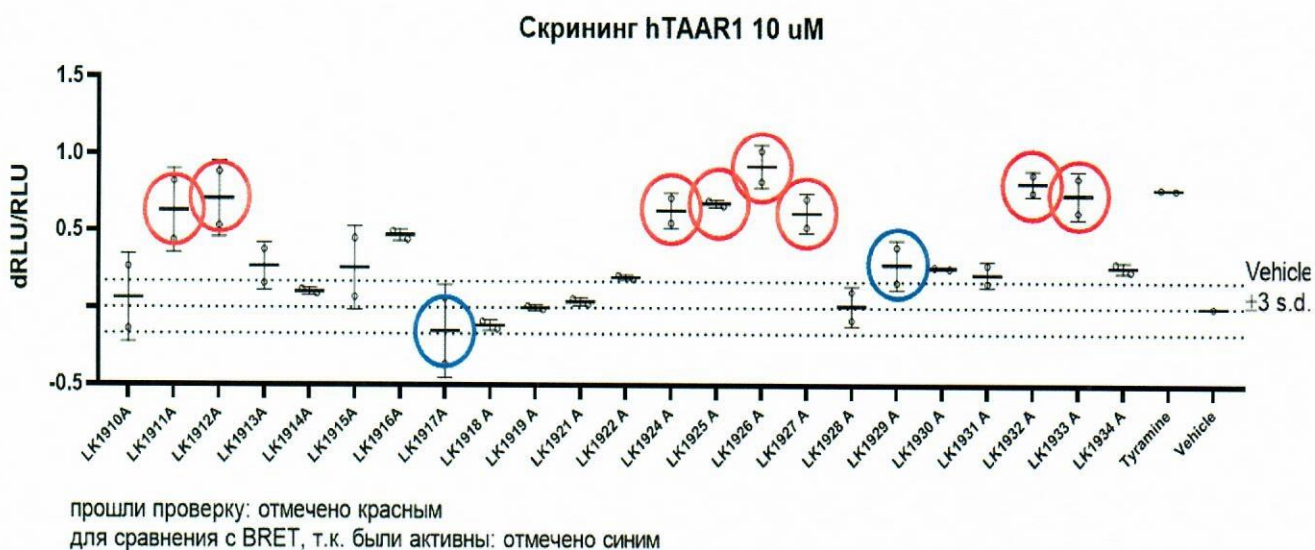


Рисунок 23. Результат скрининга серии LK.

Таблица 2. Результат скрининга серии LK

| | среднее, % от 10 мкМ тирамина |
|----------|-------------------------------|
| LK1932 A | 107 |
| LK1926 A | 87 |
| LK1929 A | 82 |
| LK1924 A | 67 |
| LK1912A | 63 |
| LK1933 A | 60 |
| LK1925 A | 59 |
| LK1911A | 51 |
| LK1930 A | 46 |
| LK1910A | 46 |
| LK1931 A | 40 |
| LK1934 A | 38 |
| LK1922 A | 34 |
| LK1918 A | 34 |
| LK1928 A | 29 |
| LK1927 A | 27 |
| LK1916A | 22 |
| LK1919 A | 19 |
| LK1913A | 12 |
| LK1921 A | 10 |
| LK1915A | 7 |
| LK1914A | 5 |
| LK1917A | - |

Наиболее активные вещества проверили на EC50, получив следующие данные (Таблица 3, рисунок 24):

Таблица 3. Оценка EC50 у наиболее активных соединений

| | М | μM | nM |
|----------|------------|--------|-------|
| Tyramine | 3.64E-07 | 0.3635 | 363.5 |
| LK1932A | 6.56E-07 | 0.6558 | 655.8 |
| LK1926A | 6.33E-07 | 0.6326 | 632.6 |
| LK1929A | 1.56E-05 | 15.62 | 15620 |
| LK1933A | 5.27E-06 | 5.273 | 5273 |
| LK1917A | не активно | - | - |

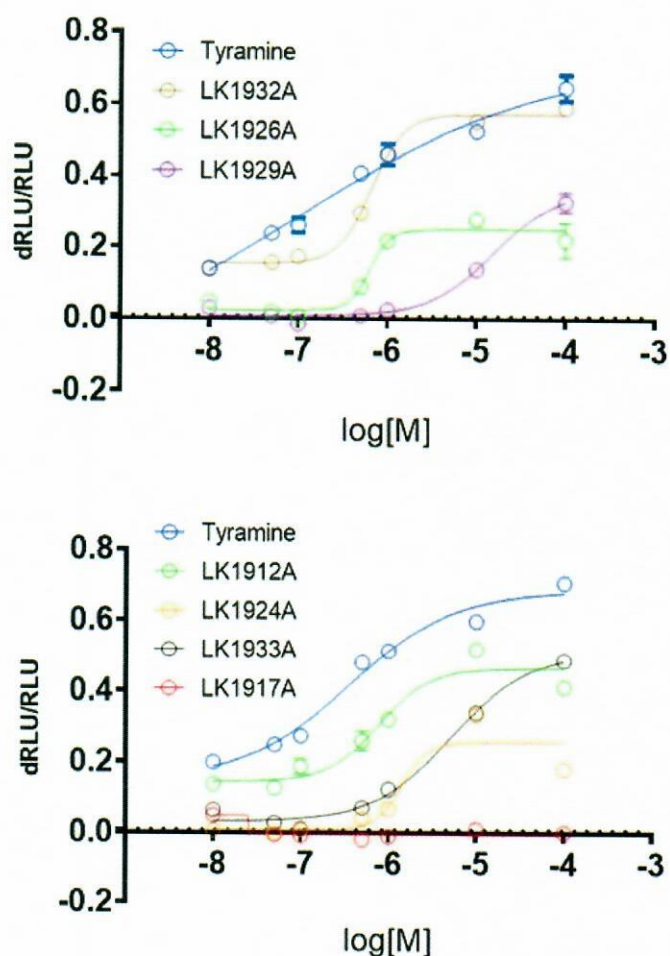


Рисунок 24. Данные доза-эффект веществ серии LK.

2.2.2.4 Заключение

Таким образом, разработанная в данной работе тест-система NanoBiT подходит для дополнительного подтверждения активности агонистов hTAAR1, так как построена на другом принципе. Однако, существуют разночтения с ранее используемой для скрининга системе BRET и биосенсоре EPAC, направленной на молекулу цАМФ, особенно в случае с LK00764, который согласно данным NanoBiT обладает более низкой аффинностью к рецептору, чем тирамин. Тем не менее данная система подтвердила, что соединения AP163 и DS16, синтезированные на предыдущем этапе являются полными агонистами TAAR1, причем AP163 обладает сходным значением EC50 при сравнении с имеющимися данными. Был проведен скрининг серии “LK”, наиболее активным соединением оказалось в-во LK1932A.

2.3 Исследование активности LK00764 в физиологических тестах *in vivo*

2.3.1 Острое интрагастральное введение LK00764 для оценки его действия на модели двигательной гиперактивности у крыс, нокаутных по гену DAT

2.3.1.1 Обоснование исследования

Дофаминовый транспортёр (dopamine transporter, DAT), обеспечивающий обратный захват дофамина из синаптической щели в пресинаптический нейрон, является одним из ключевых белков дофаминергической нейротрансмиссии (Leo et al., 2018). В 2018 году с помощью метода редактирования генома с использованием нуклеаз с «цинковыми пальцами» (zinc fingers) были созданы крысы, нокаутные по гену DAT (DAT knockout, DAT-KO). Такие крысы характеризуются высокой внеклеточной концентрацией дофамина в полосатом теле, а также характерным фенотипом: в первую очередь для DAT-KO крыс свойственна выраженная двигательная гиперактивность по сравнению с особями «дикого типа» (wild type, WT) (Vengeliene et al., 2017; Leo et al., 2018; Reinwald et al., 2022). Ранее показано, что агонисты TAAR1 способны снижать двигательную гиперактивность DAT-KO животных (Revel et al., 2011; Leo et al., 2018).

Целью настоящего исследования было оценить влияние LK00764 на двигательную активность DAT-KO крыс при пероральном введении.

2.3.1.2 Материалы и методы исследования

Животные

Эксперименты выполнены на самках DAT-KO крыс (KO – n=14, WT – n=7) возрастом – 4-5 месяцев) из локальной колонии Отдела психофармакологии Института фармакологии им. А.В. Вальдмана. Крыс содержали в группах сиблингов (3-5 особей) в клетках TIV (Tecniplast, Италия) со свободным доступом к фильтрованной водопроводной воде (Водоочиститель АКВАФОР В150 Фаворит, Санкт-Петербург, Россия) и пище (полнорационный экструдированный корм для лабораторных животных, формула ПК 120-1, ООО «Лабораторкорм», Россия) в помещении #3-10 с контролируемыми условиями: температура воздуха — $21 \pm 1^\circ\text{C}$; влажность — $50 \pm 20\%$; световой цикл — 12 ч. свет/ 12 ч. темнота

В течение трёх дней перед тестом животных приучали к рукам экспериментатора и пероральному (п/о): крыс брали в руки, мягко фиксировали и через гаважную иглу вводили в желудок 0,9% раствора NaCl в объеме 1 мл/кг. В зависимости от индивидуальной реакции животных манипуляции осуществляли в течение 1-3 мин ежедневно.

После окончания эксперимента эвтаназию животных выполняли в камере с CO₂.

Вещества

Растворы LK00764 (0; 20; 40; 80 мг/мл) в 10% растворе Tween 80 в дистиллированной воде приготавливали в день выполнения тестов и вводили п/о в объеме 2 мл/кг (в соответствии с рекомендациями разработчика исследованных соединений и Спонсора исследования).

Экспериментальные процедуры

Дизайн исследования

В исследовании был применен within-subject дизайн, предусматривающий использование одной группы животных. Крысы получали дозы LK00764 (0; 40; 80; 160 мг/кг) по схеме «Латинский квадрат», один раз в неделю.

Экспериментальная установка

Для регистрации двигательной активности крыс использовали выполненную по заказу установку «Актометр», состоящую из 2-х освещаемых тусклым светом (30–40 лк) звукоизоляционных камер с принудительной приточной вентиляцией и подсветкой, в каждой из которых в гнездах стойки может быть размещено до пяти боксов (25 x 35,5 x 34 см) из прозрачного оргстекла. В гнезде стойки для каждого бокса находятся 3 фотодатчика на высоте 5 см для измерения горизонтальной активности и 8 датчиков на высоте 14 см — для измерения вертикальной активности. Камеры подключены к компьютеру, и с помощью программного обеспечения MED-PC (MED Associates, Inc., East Fairfield, VT, США) производится регистрация перекрываний фотодатчиков нижнего (отдельно - последовательные пересечения) и верхнего рядов. Использовали 4 камеры установки, при этом распределение животных каждой экспериментальной группы по камерам было сбалансировано (по 2 в каждой из 4-х камер). Длительность теста составляла 60 минут (12 пятиминутных интервалов).

Ранее данная установка была использована в отделе психофармакологии для выполнения ряда исследований (Dravolina et al., 2006; Chistyakov et al., 2010; Radchenko et al., 2015; Belozertseva et al., 2016; Piotrovskiy et al., 2016; Белозерцева и соавт., 2016, 2017; Sukhanov et al., 2018, 2019).

Регистрируемые показатели поведения

Показатели горизонтальной двигательной активности:

- Количество последовательных перекрываний датчиков нижнего ряда.

Экспериментальная процедура

Во время каждого теста крысы помещали в экспериментальную установку на 30 минут, затем доставали, вводили вещество в соответствующей дозе и возвращали в экспериментальную установку ещё на 120 минут.

Статистический анализ

Для статистической обработки использовали пакет статистических программ IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Нью-Йорк, США). Различия считали значимыми при $P < 0,05$. Межгрупповые сравнения выполняли с использованием теста Бонферрони.

2.3.1.3 Результаты

В полном соответствии с предшествующими результатами (Leo et al., 2018) КО крысы, после введения растворителя, демонстрировали более чем на порядок повышенный уровень горизонтальной активности, чем WT животные в аналогичном состоянии ($2584,3 \pm 525,62$ vs $202,3 \pm 45,47$). Различия между группами достигали уровня статистической значимости (тест Манн-Уитни: $P < 0,001$).

Как видно на рисунке 25А,С, во все тестовые дни крысы экспериментальной и контрольной группы не различались по суммарному уровню горизонтальной активности за первые 30 минут до введения вещества или его растворителя (тест Фридмана: WT – $X^2 = 0,43$ df = 3, $P = 0,93$; КО – $X^2 = 1,46$, df = 3, $P = 0,69$).

Как видно на рисунке 25В,Г, введение LK00764 в любой из протестированных доз не сопровождалось изменением суммарного уровня двигательной активности за 120 минут теста ни в контрольной, ни в экспериментальной группе (тест Фридмана: WT – $X^2 = 5,16$ df = 3, $P = 0,16$; КО – $X^2 = 3,86$, df = 3, $P = 0,28$)

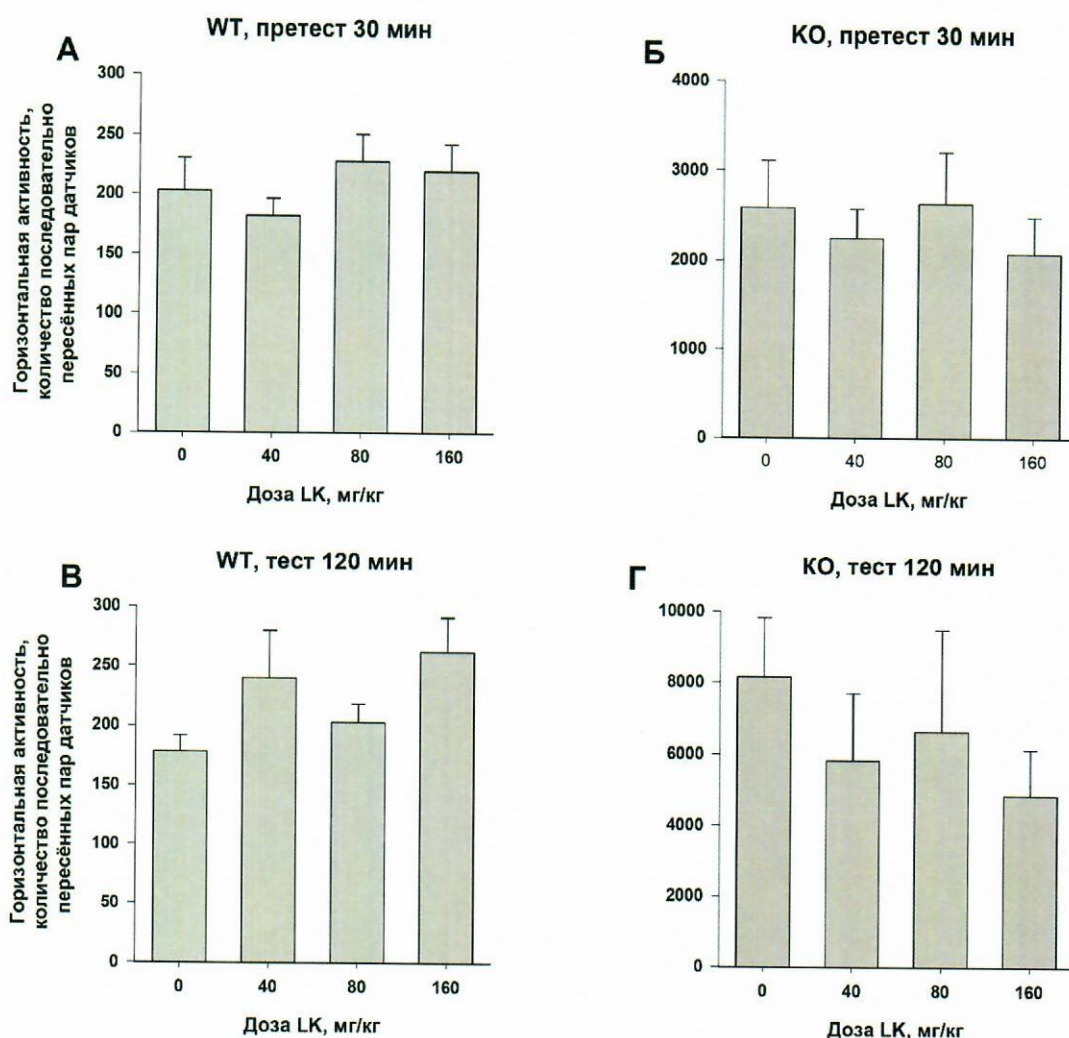


Рисунок 25. Базальная горизонтальная двигательная активность и влияние введения LK00764 (40; 80 и 160 мг/кг) или 10% раствора Tween 80 в дистиллированной воде на горизонтальную двигательную активность WT (А,В) и DAT-КО (Б,Г) крыс. Данные представлены в виде средних \pm средняя ошибка средней; $n=7$ для каждой группы.

2.3.1.4 Выводы

В соответствие с предшествующими работами (Leo et al., 2018; Vengelin et al., 2011) крысы без или со значительно сниженным уровнем экспрессии дофаминового транспортера демонстрируют повышенный уровень горизонтальной двигательной активности (Vengeliene et al., 2017; Leo et al., 2018; Reinwald et al., 2022). При этом введение LK00764 не оказывало влияния на двигательную активность крыс как контрольной, так и экспериментальной группы.

2.3.2 Острое интрагастральное введение LK00764 для оценки его действия на крыс, находящихся под действием ингибитора рецепторов NMDA - МК-801

2.3.2.1 Обоснование исследования

Известно, что антагонисты глутаматных рецепторов NMDA-подтипа (фенциклидин, МК-801) обладают выраженными психостимулирующими свойствами и в высоких дозах повышают двигательную активность крыс и мышей (Danysz et al., 1994; Ford et al., 1989). Способность фармакологических агентов уменьшать вызванную введением NMDA-антагонистов двигательную активацию у грызунов активно используют для поиска новых соединений с антипсихотическими свойствами. Ранее также было показано, что агонисты TAAR1 способны блокировать гипоглутаматергическую гиперактивность (Dedic et al., 2019; Revel et al., 2011; Revel et al., 2013).

2.3.2.2 Материалы и методы исследования

Животные

Эксперименты выполнены на взрослых (возраст > 2 месяцев) самцах крыс стока Wistar (массой > 200 г) из колонии Отдела психофармакологии Института фармакологии им. А.В. Вальдмана. Экспериментальных животных содержали в группах сиблингов (3-5 особей) в клетках TIV (Tecniplast, Италия) со свободным доступом к фильтрованной водопроводной воде (Водоочиститель АКВАФОР В150 Фаворит, Санкт-Петербург, Россия) и пище (полнорационный экструдированный корм для лабораторных животных, формула ПК 120-1, ООО «Лабораторкорм», Россия) в помещении #3-10 с контролируемыми условиями: температура воздуха — $21\pm 1^\circ\text{C}$; влажность — $50\pm 20\%$; световой цикл — 12 ч. свет/ 12 ч. темнота

В течение трёх дней перед тестом животных приучали к рукам экспериментатора и внутрижелудочному введению: крыс брали в руки, мягко фиксировали и внутрижелудочно вводили 0,9% раствор NaCl в объеме 1 мл/кг. В зависимости от индивидуальной реакции животных манипуляции осуществляли в течение 1-3 мин ежедневно.

После окончания эксперимента эвтаназию животных выполняли в камере с CO₂.

Вещества

Информация о фармакологических агентах представлена в Таблице 4. Растворы LK00764 160 мг/кг приготавливали в день выполнения тестов и вводили внутрижелудочно в объёме 2 мл/кг (в соответствии с рекомендациями разработчика исследованных соединений и Спонсора исследования). МК-801 вводили внутрибрюшинно в объёме 1 мл/кг. Раствор готовили на основе матричного (1 мг/мл), приготовленного в первый день эксперимента.

Таблица 4. Вещества в эксперименте

| Вещество (производитель) | Растворитель | Время введения до теста, мин |
|--------------------------|------------------|------------------------------|
| МК-801 | 0,9% р-р NaCl | 15 |
| LK00764 | 10% р-р Tween 80 | 30 |
| | Циклодекстрин | |
| | Кремофор | |

Экспериментальные процедуры*Дизайн исследования*

В исследовании применен “between-subject” дизайн. Крыс разделили на семь групп, фармакологические агенты, которые получали животные каждой группы, представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Группы животных в эксперименте

| Группа | Иньекция 1 | Иньекция 2 |
|--------|---|------------|
| 1 | 0,9% NaCl | МК-801 |
| 2 | 10% Tween 80 | МК-801 |
| 3 | 10% кремофор | МК-801 |
| 4 | 3,2% раствор бета-циклодекстрина | МК-801 |
| 5 | LK00764 в 10% Tween 80 | МК-801 |
| 6 | LK00764 в 10% кремофоре | МК-801 |
| 7 | LK00764 в 3,2% растворе бета-циклодекстрина | МК-801 |

Экспериментальная установка

Для регистрации двигательной активности крыс использовали выполненную по заказу установку «Актометр», состоящую из 2-х освещаемых тусклым светом (30–40 лк) звукоизоляционных камер с принудительной приточной вентиляцией и подсветкой, в каждой из которых в гнездах стойки может быть размещено до пяти боксов (25 x 35,5 x 34 см) из прозрачного оргстекла. В гнезде стойки для каждого бокса находятся 3 фотодатчика на высоте 5 см для измерения горизонтальной активности. Камеры подключены к компьютеру, и с помощью программного обеспечения MED-PC (MED Associates, Inc., East Fairfield, VT, США) производится регистрация последовательного перекрытия фотодатчиков нижнего. Длительность теста составляла 60 минут (12 пятиминутных интервалов).

Ранее данная установка была использована в отделе психофармакологии для выполнения ряда исследований (Dravolina et al., 2006; Chistyakov et al., 2010; Radchenko et

al., 2015; Belozertseva et al., 2016; Piotrovskiy et al., 2016; Белозерцева и соавт., 2016, 2017; Sukhanov et al., 2018, 2019).

2.3.2.3 Результаты

В соответствие с предшествующими работами введение NMDA антагониста приводило к повышению двигательной активности. Уровень горизонтальной двигательной активности (число последовательно пересечённых пар датчиков) крыс из в группы 1, которым ввели 0,9% изотонический раствор NaCl и МК-801 в дозе 0,1 мг/кг, составлял примерно $277,3 \pm 55,91$ за час.

Как можно видеть на рисунке 26 введение любого из растворителей (10% раствора кремофора, 3,2% раствора бета-циклодекстрина, 10% раствора Tween 80) не влияло на эффекты МК-801, уровни горизонтальной двигательной активности за час составляли: $313,1 \pm 28,35$; $248,5 \pm 32,56$ и $241,5 \pm 37,34$, соответственно. Также нам не удалось обнаружить существенного угнетающего действия LK00764 160 мг/кг ни в одном из протестированных растворителей (10% раствора кремофора, 3,2% раствора бета-циклодекстрина, 10% раствора Tween 80): уровни горизонтальной двигательной активности за час составляли: $195,1 \pm 36,15$; $262,3 \pm 30,46$ и $227,3 \pm 49,70$, соответственно.

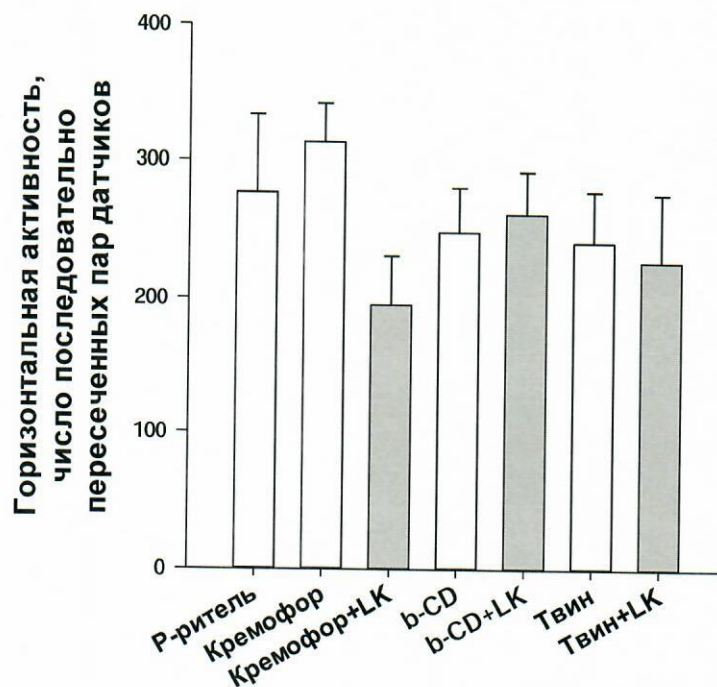


Рисунок 26. Уровень двигательной активности крыс, находящихся под действием МК-801 (0,1 мг/кг, в/б), после введения различных вариантов растворов LK00764 160 мг/кг, п/о.

При статистической обработке дисперсионный анализ на данных после ранговых преобразований с двумя межгрупповыми факторами, установлено отсутствие статистически значимого влияния межгрупповых факторов «тип растворителя» ($F(4,44)=0,40$, $p=0,81$) и «LK00764/растворитель» ($F(1,47)=2,39$, $p=0,13$), а также их взаимодействия ($F(2,33)=1,16$, $p=0,33$).

2.3.2.4 Выводы

Пероральное введение растворов LK00764 ни в одном из протестированных растворителей не сопровождалось снижением стимулированной двигательной активности крыс.

2.4 Исследование активности новых выявленных агонистов TAAR1 в физиологических тестах *in vivo*

2.4.1 Острое внутрибрюшинное введение LK1932A, AP163 и DS16 для оценки их действия на модели двигательной гиперактивности у крыс, нокаутных по гену DAT

2.4.1.1 Обоснование исследования

Дофаминовый транспортёр (dopamine transporter, DAT), обеспечивающий обратный захват дофамина из синаптической щели в пресинаптический нейрон, является одним из ключевых белков дофаминергической нейротрансмиссии. В 2018 году с помощью метода редактирования генома с использованием нуклеаз с «цинковыми пальцами» (zinc fingers) были созданы крысы, нокаутные по гену DAT (DAT knockout, DAT-KO). Такие крысы характеризуются высокой внеклеточной концентрацией дофамина в полосатом теле, а также характерным фенотипом: в первую очередь для DAT-KO крыс свойственна выраженная двигательная гиперактивность по сравнению с особями «дикого типа» (wild type, WT) (Leo et al., 2018; Reinwald et al., 2022). Ранее показано, что агонисты TAAR1 способны снижать двигательную гиперактивность DAT-KO животных (Revel et al., 2011; Leo et al., 2018).

Целью настоящего исследования было оценить влияние LK1932A, а также выявленных ранее соединений AP163 и DS16 на двигательную активность DAT-KO крыс при внутрибрюшинном введении.

2.4.1.2 Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные

В данном эксперименте использовали 40 самцов мышей линии C57Black. Животных содержали в соответствии с правилами использования лабораторных животных в научных исследованиях согласно рекомендациям Ассоциации специалистов по лабораторным животным (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). В данной работе использовались мыши из вивария Санкт-Петербургского государственного университета, содержащиеся группами в вентилируемых боксах при температуре 22 ± 1 °C, относительной влажности воздуха 50-70% и 12-часовом цикле света/темноты (свет с 8 утра до 8 вечера), пище и воде *ad libitum*. За неделю до начала эксперимента животных рассаживали по одному в боксе. За 2 суток до эксперимента животных в течение 90 мин габитуировали в используемых для оценки двигательной активности локомоторных боксах. Животных использовали в эксперименте 2-3 раза с промежутком не менее 5 суток между экспериментальными группами.

Введение препаратов

Животным интраперитонеально вводили растворы препаратов AP163 (15, 30 и 45 мг/кг), DS16 (30 мг/кг), LK1932 (15 и 30 мг/кг). Для того, чтобы вызвать увеличение двигательной активности вследствие дофаминергии животным интраперитонеально вводили GBR12909 (10 мг/кг) (Sigma, США) непосредственно после введения препаратов. В качестве растворителя использовали фосфатно-солевой буфер (NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, Na₂HPO₄ 10 мМ, KH₂PO₄ 1,76 мМ, pH 7,4) с 10% Tween-80 (K&M, Индия). Все используемые соединения растворяли таким образом, чтобы вводить 0,1 мл раствора на 25 г веса животных, растворитель также вводили 0,1 мл на 25 г веса животных.

Экспериментальные группы

Таблица 6. Распределение животных по группам

| № | Название группы | Кол-во животных (N) | GBR 12909 | Вещество | Концентрация |
|----|---------------------|---------------------|-----------|--------------|--------------|
| 1 | Контроль негативный | 12 | - | Растворитель | - |
| 2 | Контроль позитивный | 16 | 10 мг/кг | Растворитель | - |
| 3 | AP163-15 контроль | 3 | - | AP163 | 15 мг/кг |
| 4 | AP163-30 контроль | 3 | - | AP163 | 30 мг/кг |
| 5 | AP163-45 контроль | 3 | - | AP163 | 45 мг/кг |
| 6 | DS16-30 контроль | 6 | - | DS16 | 30 мг/кг |
| 7 | LK1932-15 контроль | 4 | - | LK1932 | 15 мг/кг |
| 8 | LK1932-30 контроль | 4 | - | LK1932 | 30 мг/кг |
| 9 | AP163-15 опыт | 8 | 10 мг/кг | AP163 | 15 мг/кг |
| 10 | AP163-30 опыт | 3 | 10 мг/кг | AP163 | 30 мг/кг |
| 11 | AP163-45 опыт | 6 | 10 мг/кг | AP163 | 45 мг/кг |
| 12 | DS16-30 опыт | 9 | 10 мг/кг | DS16 | 30 мг/кг |
| 13 | LK1932-15 опыт | 3 | 10 мг/кг | LK1932 | 15 мг/кг |
| 14 | LK1932-30 опыт | 6 | 10 мг/кг | LK1932 | 30 мг/кг |

Оценка локомоторной активности животных

Локомоторную активность оценивали непосредственно после введения препаратов в квадратных боксах 40x40 см в течение 90 мин. Видеозаписи поведения животных в тесте анализировали при помощи программы EthoVision. Рассчитывали пройденное животными расстояние за 90 мин, а также за каждые 10 мин теста.

Измерение температуры животных

Измерение температуры проводили при помощи ректального термометра (BioSeb) перед экспериментом (T_0), а также после оценки двигательной активности (через ~100 мин после введения препаратов) (T_{100})

Статистическая обработка полученных результатов

Данные для групп контроль и GBR12909 из разных экспериментальных серий были объединены в общие выборки. Статистический анализ проводили при помощи программы GraphPad Prizm 8. Для сравнения суммарной двигательной активности животных в тесте в течение 90 мин после введения использовали двусторонний анализ дисперсии с множественным сравнением с использованием критерия Тьюки. Для сравнения двигательной активности животных в 10-мин интервалы использовали анализ смешанных эффектов в двустороннем анализе дисперсии с множественным сравнением с использованием критерия Тьюки. Сравнение выборок значений температуры тела животных разных групп при стресс-индуцированной гипертермии было проведено при помощи одностороннего дисперсионного анализа с множественным сравнением по критерию Сидака.

2.4.1.3 Результаты

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в 2,9 раза по сравнению с контрольной группой при оценке суммарной двигательной активности животных в течение 90 мин после введения ($p < 0.05$) (Рис. 27). Интраперитонеальное введение 15 мг/кг, 30 мг/кг и 45 мг/кг AP163 совместно с 10 мг/кг GBR12909 не вызывало изменения суммарной двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в течение 90 мин после введения (Рис. 27). Одно животное погибло через 5 мин после введения по невыясненной причине.

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в интервале 20 мин – 90 мин после введения относительно группы контроль ($p < 0,05$). Введение 15 мг/кг AP163 совместно с 10 мг/кг GBR12909 не вызывало изменения двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в течение на всех 10-минутных промежутках после введения (Рис. 28).

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в интервале 20 мин – 90 мин после введения относительно группы контроль ($p < 0,05$). 45 мг/кг AP163 вызывало уменьшение

двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в промежутке 0 – 30 мин после введения ($p < 0,05$) (Рис. 29).

Таким образом, 45 мг/кг AP163 снижает вызываемое 10 мг/кг GBR12909 увеличение двигательной активности животных в течение 30 мин после введения.

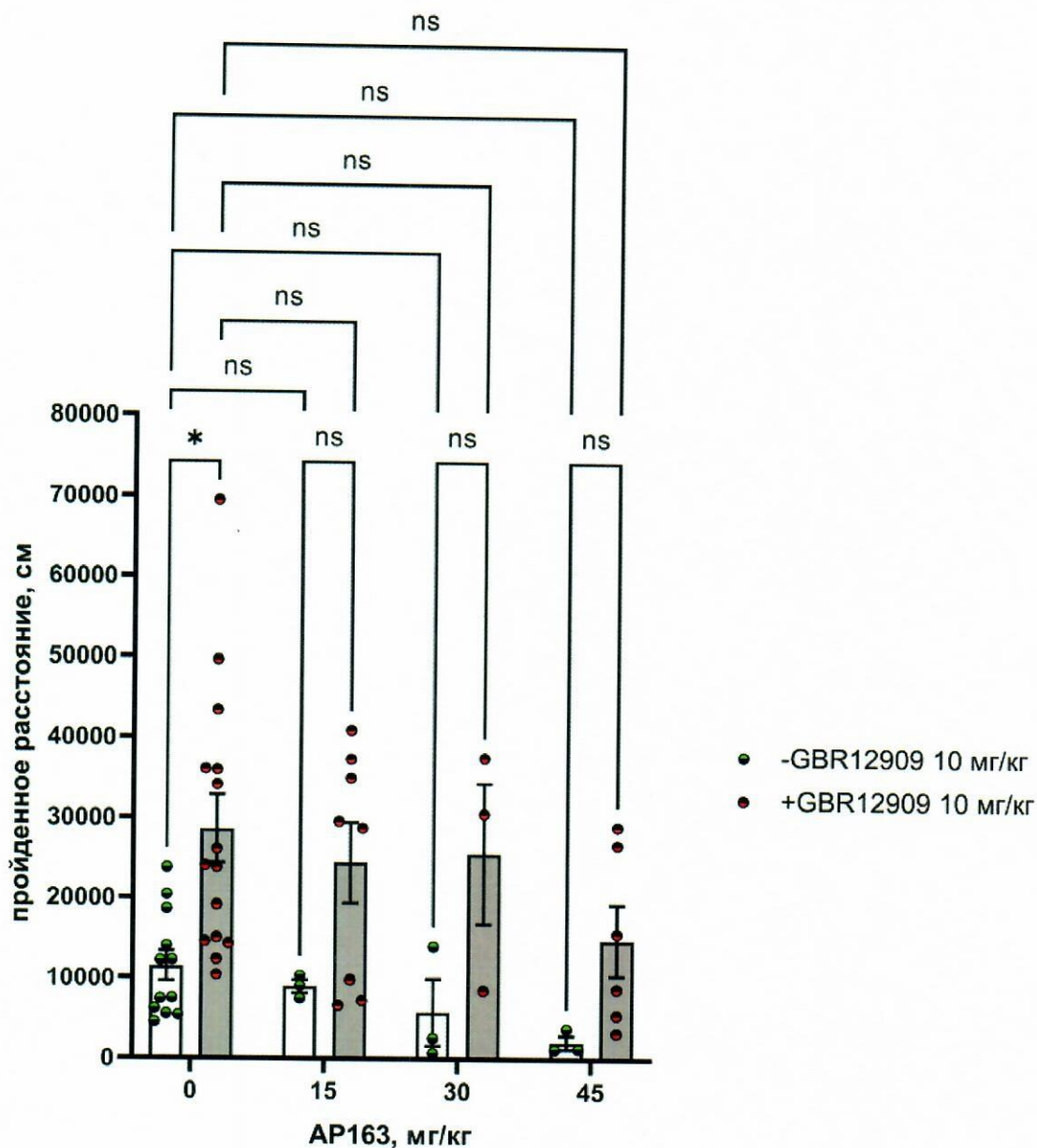


Рисунок 27. Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-15 (N=3), AP163-30 (N=3), AP163-45 (N=3), AP163-15+GBR (N=8), AP163-30+GBR (N=3), AP163-45+GBR (N=6). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см ±SEM. * - $p < 0,05$.

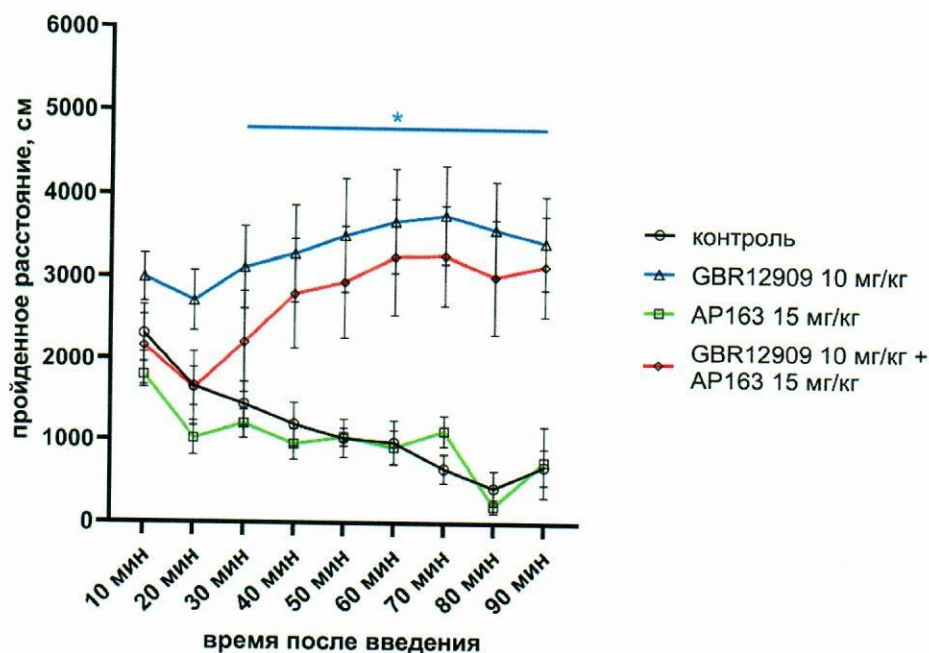


Рисунок 28. Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-15 (N=3), AP163-15+GBR (N=8). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см \pm SEM. * - $p < 0,05$ (синий – отличие между группами контроль и GBR12909).

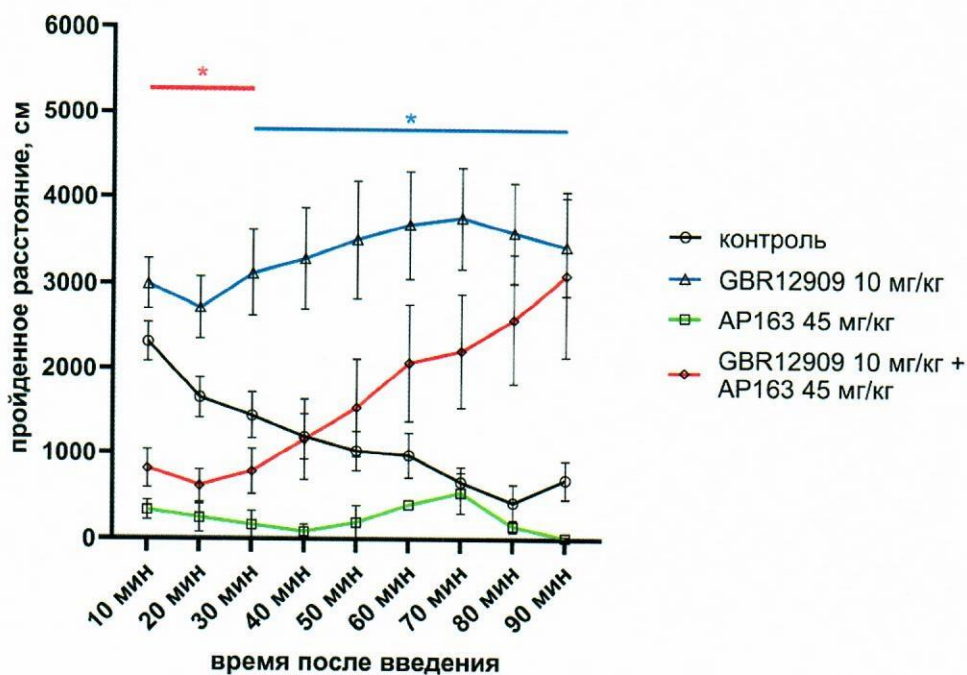


Рисунок 29. Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), AP163-45 (N=3), AP163-45+GBR (N=6). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см \pm SEM. * - $p < 0,05$ (синий – отличие между группами контроль и GBR12909, красный – отличие между группами GBR12909 и AP163-45+GBR).

Влияние DS16 на вызываемую GBR12909 гиперактивность мышей линии C57Black

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в 2,9 раза по сравнению с контрольной группой при оценке суммарной двигательной активности животных в течение 90 мин после введения ($p < 0,001$) (Рис. 30). Интраперитонеальное введение 30 мг/кг DS16 совместно с 10 мг/кг GBR12909 вызывало уменьшение суммарной двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в 2,9 раза в течение 90 мин после введения ($p < 0,001$) (Рис. 30).

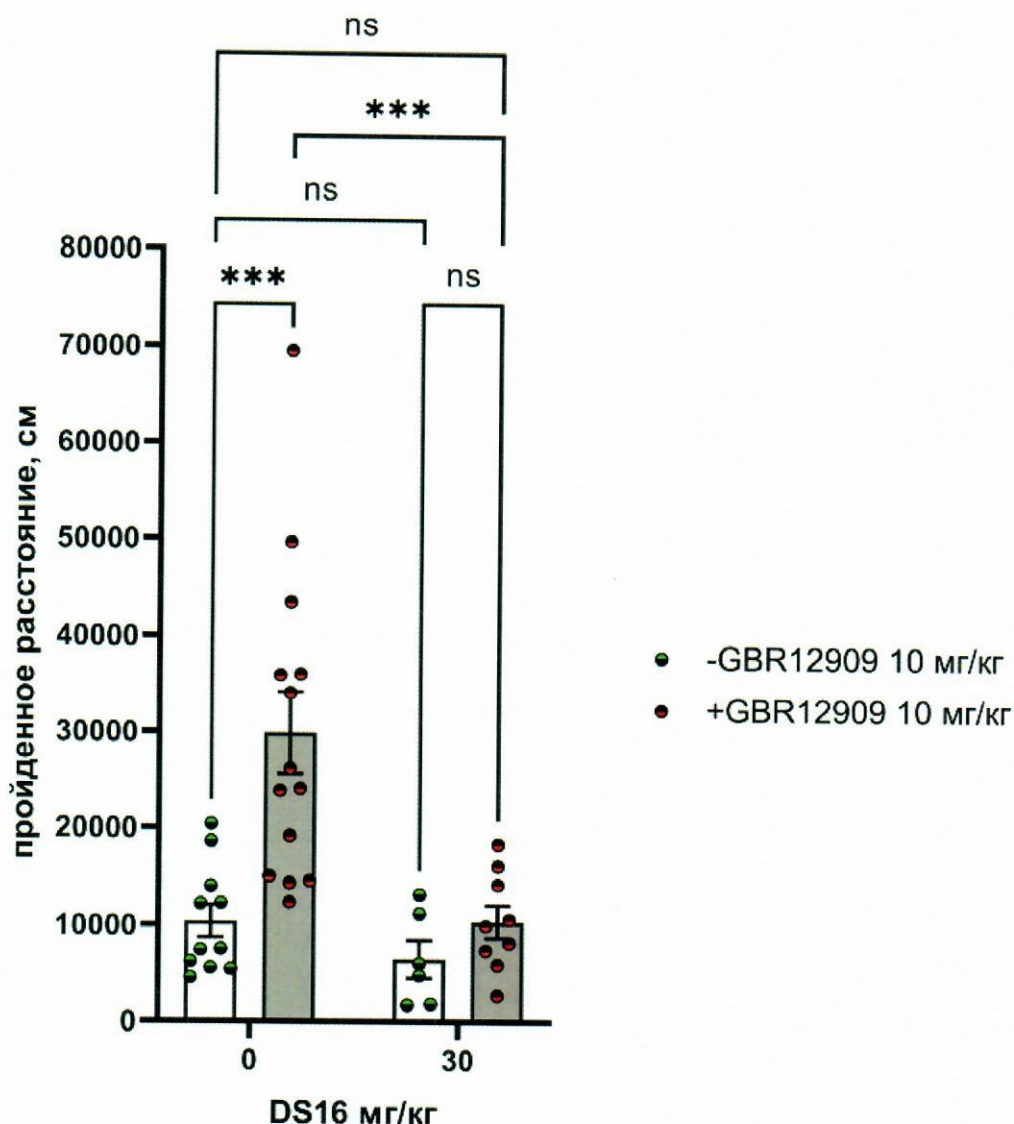


Рисунок 30. Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), DS16-30 (N=6), DS16-30+GBR (N=9). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см ±SEM. *** - $p < 0,001$.

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в интервале 20 мин – 90 мин после введения относительно группы контроль ($p < 0,05$). 30 мг/кг DS16 вызывало уменьшение двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в промежутке 0 – 70 мин после введения ($p < 0,05$) (Рис. 31).

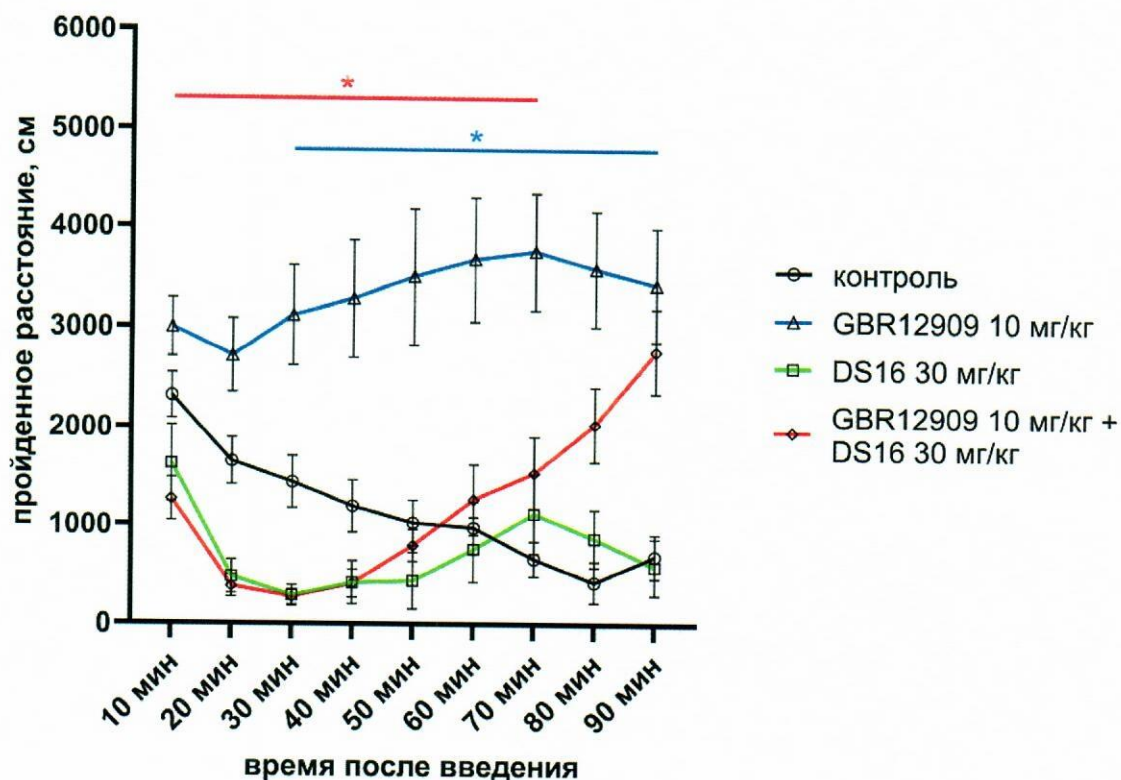


Рисунок 31. Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), DS16-30 (N=6), DS16-30+GBR (N=9). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см \pm SEM. * - $p < 0,05$ (синий – отличие между группами контроль и GBR12909, красный – отличие между группами GBR12909 и DS16-30+GBR).

Таким образом, 45 мг/кг AP163 снижает вызываемое 10 мг/кг GBR12909 увеличение двигательной активности животных в течение 70 мин после введения.

Влияние LK1932 на вызываемую GBR гиперактивность мышей линии C57Black

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в 2,9 раза по сравнению с контрольной группой при оценке суммарной двигательной активности животных в течение 90 мин после введения ($p < 0.01$) (Рис. 32). Интраперитонеальное введение 15 мг/кг и 30 мг/кг LK1932 совместно с 10 мг/кг GBR12909 не вызывало изменения суммарной двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в течение 90 мин после введения (Рис. 32).

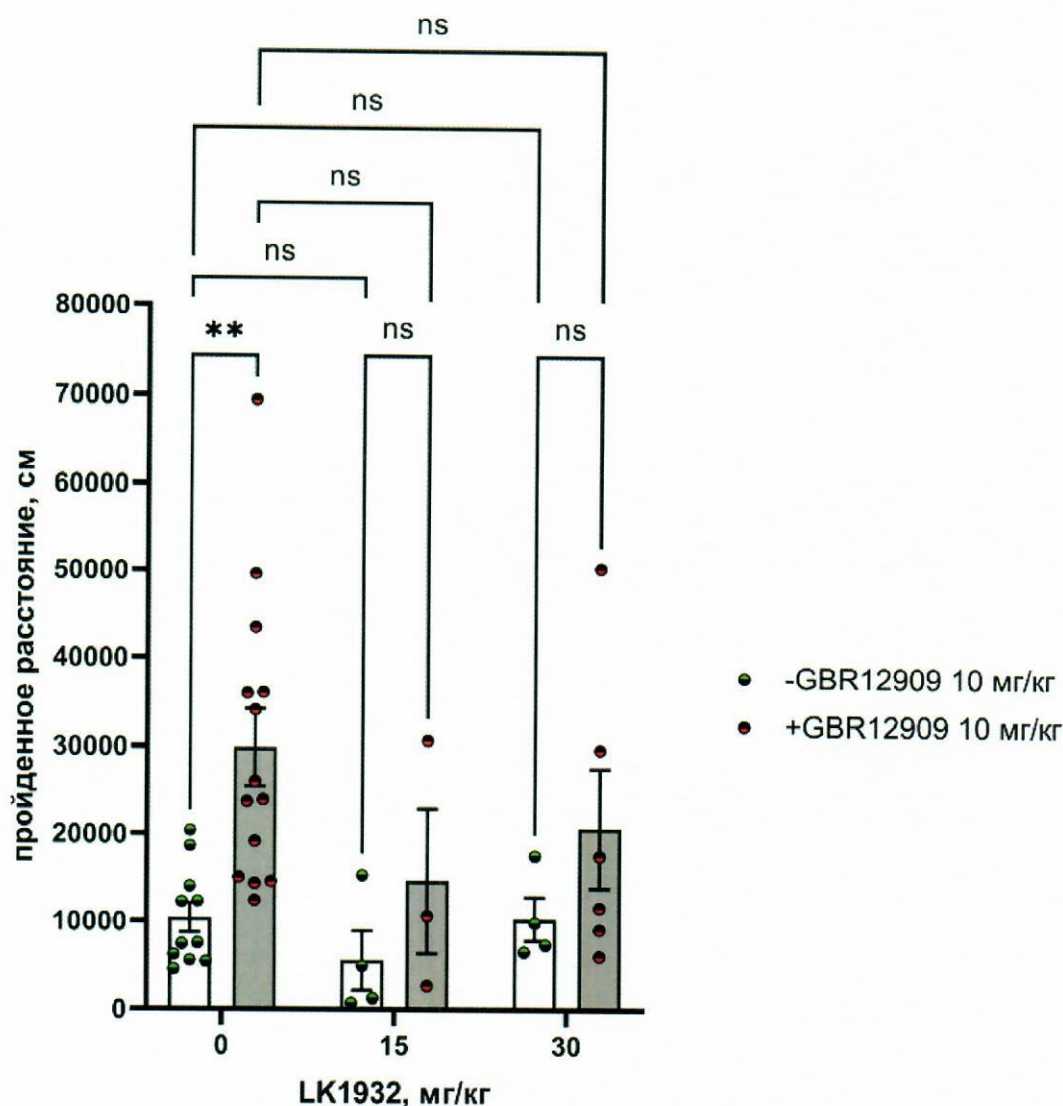


Рисунок 32. Сравнение локомоторной активности в течение 90 мин групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-15 (N=4), LK1932-30 (N=4), LK1932-15+GBR (N=3), LK1932-15+GBR (N=3), LK1932-30+GBR (N=6). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см \pm SEM. ** - $p < 0,01$.

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в интервале 20 мин – 90 мин после введения относительно группы контроль ($p < 0,05$). Введение 15 мг/кг LK1932 совместно с 10 мг/кг GBR12909 не вызывало изменения двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в течение на всех 10-минутных промежутках после введения (Рис. 33).

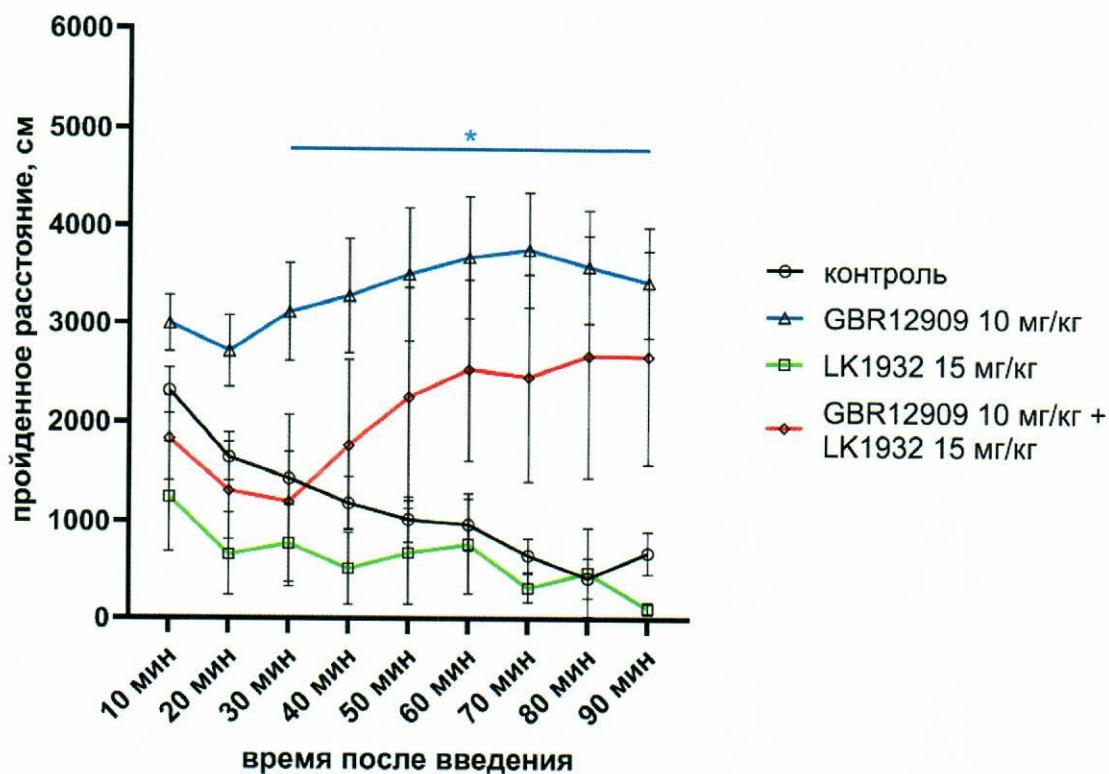


Рисунок 33. Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин тесте групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-15 (N=4), LK1932-15+GBR (N=3). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см ±SEM. * - $p < 0,05$ (синий – отличие между группами контроль и GBR12909).

Интраперитонеальное введение 10 мг/кг GBR12909 вызывало увеличение локомоторной активности животных в интервале 20 мин – 90 мин после введения относительно группы контроль ($p < 0,05$). Введение 30 мг/кг LK1932 совместно с 10 мг/кг GBR12909 не вызывало изменения двигательной активности животных относительно группы GBR12909 в течение на всех 10-минутных промежутках после введения (Рис. 34).

Таким образом, LK1932 в дозах 15 мг/кг и 30 мг/кг не оказывал влияния на вызываемое 10 мг/кг GBR12909 увеличение двигательной активности животных. Также выявлено воздействие DS16 на стресс-индуцированную гипертермию животных (Рис. 35).

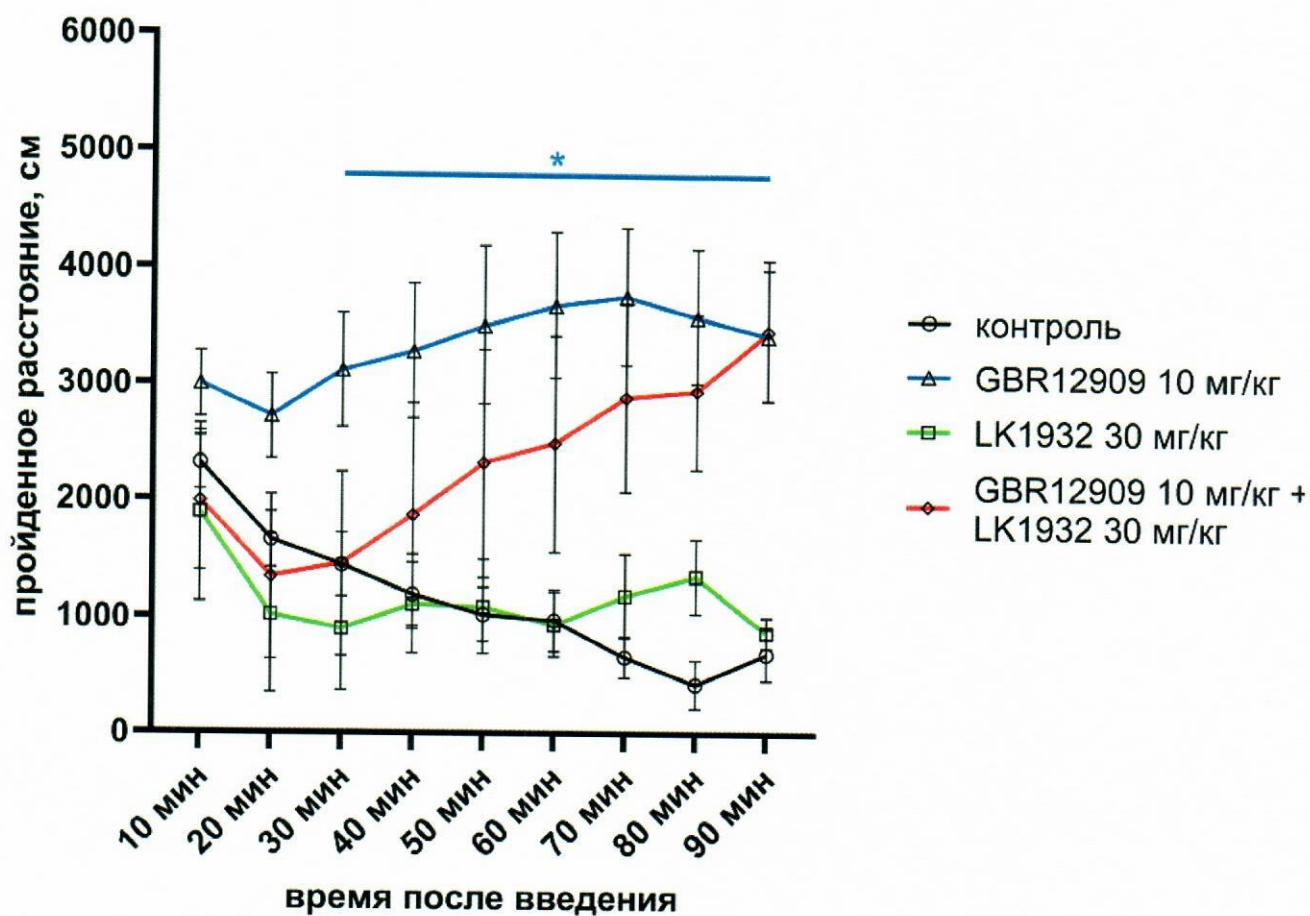


Рисунок 34. Сравнение локомоторной активности в течение 10-минутных интервалов 90 мин теста групп: контроль (N=12), GBR12909 (N=16), LK1932-30 (N=4), LK1932-30+GBR (N=6). Данные представлены в виде среднего пройденного расстояния в см \pm SEM. * - $p < 0,05$ (синий – отличие между группами контроль и GBR12909).

Влияние DS16 и GBR12909 на выраженность стресс-индуцированной гипертермии мышей линии C57Black

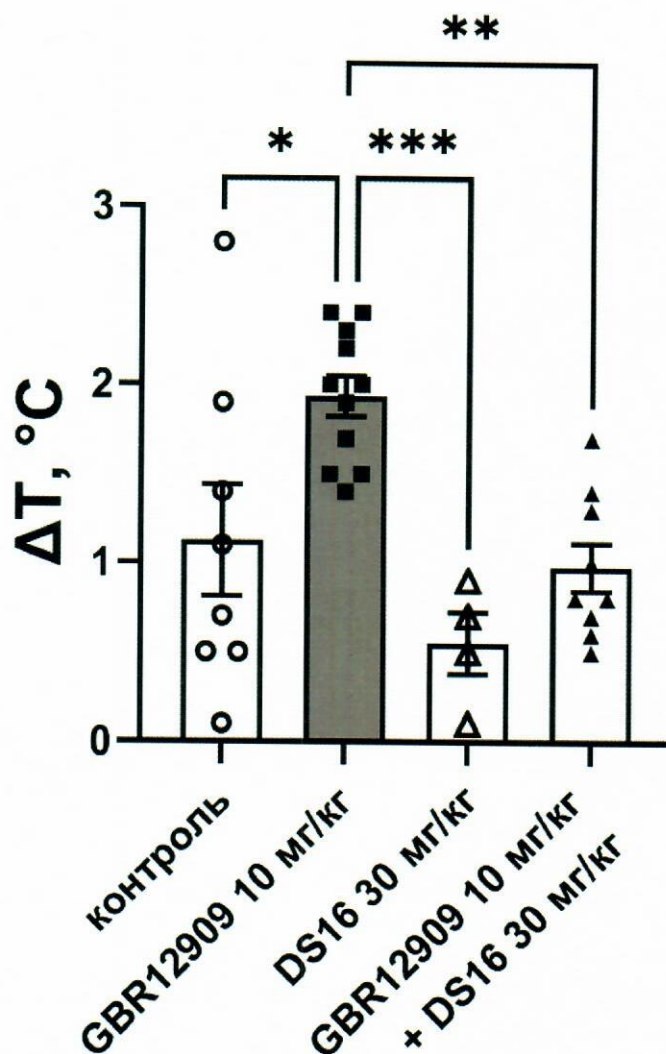


Рисунок 35. Различия между температурой тела мышей до эксперимента и через 100 мин после введения 10 мг/кг GBR12909 и 30 мг/кг DS16. Сравнение групп: контроль (N=9), GBR12909 (N=11), DS16-30 (N=4), DS16-30+GBR (N=9). Данные представлены в виде среднего значения $\Delta T^{\circ}\text{C} \pm \text{SEM}$. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

2.4.1.4 Выводы

Применение AP163 подтвердило ранние исследования, при этом новая итерация соединения (DS16) показала высокую активность. Препарат LK1932A не показал активности в выбранных тестах и на данный момент не рассматривается для продвижения в исследования по пероральному введению.

2.4.2 Острое интрагастральное введение AP163 и DS16 для оценки его действия на модели двигательной гиперактивности, вызванной DAT-ингибитором GBR-12909

2.4.2.1 Обоснование исследования

Дофаминовый транспортёр (dopamine transporter, DAT), обеспечивающий обратный захват дофамина из синаптической щели в пресинаптический нейрон, является одним из ключевых белков дофаминергической нейротрансмиссии (Leo et al., 2018). Введение ингибиторов DAT, кокаина, амфетамина, GBR12909, приводит к увеличению двигательной активности у крыс и мышей (Stanhope et al., 2001; Sukhanov et al., 2016; Lam et al., 2018; Bastos et al., 2018). Животные под действием ингибиторов DAT широко используются как тест-система для скрининга новых веществ с антипсихотическим действием, так как введение фармакологических агентов, блокирующих D₂-подобные рецепторы к дофамину, сопровождается снижением гиперактивности у крыс и мышей.

Целью настоящего исследования было оценить влияние фармакологических агентов DS16 и AP163 на двигательную активность мышей, находящихся под действием GBR12909, при пероральном введении.

2.4.2.2 Материалы и методы исследования

Животные

Эксперименты выполнены на самцах белых беспородных мышей (n=40) возрастом — 2 месяца) из НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ (Всеволожский район, Ленинградская область, д. Рапполово). Мышей содержали в группах сиблингов (11 особей) в клетках ТШН (Tecniplast, Италия) со свободным доступом к фильтрованной водопроводной воде (Водоочиститель АКВАФОР В150 Фаворит, Санкт-Петербург, Россия) и пище (полнораціонный экструдированный корм для лабораторных животных, ИП Курицын Игорь Константинович, Россия, г. Саратов) в помещении #3-9 с контролируемыми условиями: температура воздуха — 21±1°C; влажность — 50±20%; световой цикл — 12 ч. свет/ 12 ч. Темнота. После окончания эксперимента эвтаназию животных выполняли в камере с CO₂.

Вещества

Растворы веществ приготавливали непосредственно в день выполнения тестов и вводили в/б (GBR12909, 10 мг/кг, растворитель — раствор Tween 80 1% в фосфатном буфере (предоставлен заказчиком)) или п/о (DS16 и AP163, 10 мг/кг, растворитель — раствор, содержащий 10% (по массе) Tween 80 и 10% ДМСО (по массе) в дистиллированной воде) в объёме 10 мл/кг (в соответствии с рекомендациями Спонсора исследования). Все

вещества или их растворители вводили за 30 минут до помещения животных в экспериментальную установку.

Экспериментальные процедуры

Дизайн исследований

Проведено 3 эксперимента, во всех использован between-subject дизайн (таблица 7).

Таблица 7. Дизайн исследования

| Экспер. # | Группа | GBR12909/Растворитель | DS16/AP163/Растворитель |
|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Контрольная | Растворитель | — |
| | Экспериментальная | GBR12909 | — |
| 2 | Контрольная | GBR12909 | Растворитель |
| | Экспериментальная | GBR12909 | DS16 |
| 3 | Контрольная | GBR12909 | Растворитель |
| | Экспериментальная | GBR12909 | AP163 |

Экспериментальная установка

Для регистрации двигательной активности мышей использовали выполненную по заказу установку «Актометр», состоящую из 2-х освещаемых тусклым светом (30–40 лк) звукоизоляционных камер с принудительной приточной вентиляцией и подсветкой, в каждой из которых в гнездах стойки может быть размещено до пяти боксов (25 x 35,5 x 34 см) из прозрачного оргстекла. В гнезде стойки для каждого бокса находятся 3 фотодатчика на высоте 5 см для измерения горизонтальной активности и 8 датчиков на высоте 14 см — для измерения вертикальной активности. Камеры подключены к компьютеру, и с помощью программного обеспечения MED-PC (MED Associates, Inc., East Fairfield, VT, США) производится регистрация перекрываний фотодатчиков нижнего (отдельно - последовательные пересечения) и верхнего рядов. Использовали 2 камеры установки, при этом распределение животных каждой экспериментальной группы по камерам было сбалансировано. Длительность нахождения животных в установке составляла 30 (Эксперимент 1) или 60 минут (Эксперименты 2 и 3). Сессии были автоматически разделены на 6 или 12 пятиминутных интервалов.

Ранее данная установка была использована в отделе психофармакологии для выполнения ряда исследований (Dravolina et al., 2006; Chistyakov et al., 2010; Radchenko et al., 2015; Belozertseva et al., 2016; Piotrovskiy et al., 2016; Белозерцева и соавт., 2016, 2017; Sukhanov et al., 2018, 2019).

Регистрируемые показатели поведения

Показатели горизонтальной двигательной активности:

- Количество последовательных перекрываний датчиков нижнего ряда;
- Количество перекрываний датчиков нижнего ряда.

Статистический анализ

Для статистической обработки использовали программу SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc, Калифорния, США) и пакет статистических программ IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Нью-Йорк, США). В соответствии с рекомендациями по статистической обработке данных малых выборок для анализа использовали непараметрические методы тест Манна — Уитни и дисперсионный анализ смешанного типа (случайные факторы: «номер мыши» и «номер локомоторного бокса», межгрупповой фактор «экспериментальная/контрольная группа» и внутригрупповой фактор «номер пятиминутного интервала») после рангового преобразования исходных результатов. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

2.4.2.3 Результаты

В Эксперименте 1 (как видно на Рисунке 36А и В) в полном соответствии с предшествующими результатами (Bastos et al., 2018) мыши после введения GBR12909 демонстрировали повышенный уровень горизонтальной активности по сравнению с животными, получившими инъекцию растворителя (тест Манна — Уитни: $P < 0,01$). При анализе изменений эффектов GBR12909 во времени (Рисунок 36Б и Г) видно, что в первые пять минут животные контрольной и экспериментальной группы показывают близкий уровень горизонтальной двигательной активности, но затем двигательная активность мышей, получивших растворитель, уменьшается, а животных под действием GBR12909 остаётся примерно на одном уровне. При проведении дисперсионного анализа нам удалось подтвердить различия между контрольной и экспериментальной группами (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(1,13)=15,11$, $P=0,002$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(1,14)=19,47$, $P=0,001$). Также статистически значимым было влияние фактора «номер пятиминутного интервала» (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(5,18)=3,39$, $P=0,025$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(5,19)=2,98$, $P=0,04$). Влияние взаимодействия двух этих факторов на горизонтальную активность было незначимым (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(5,18)=1,34$, $P=0,29$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(5,19)=1,50$, $P=0,24$), поэтому дальнейшие попарные сравнения не проводили.

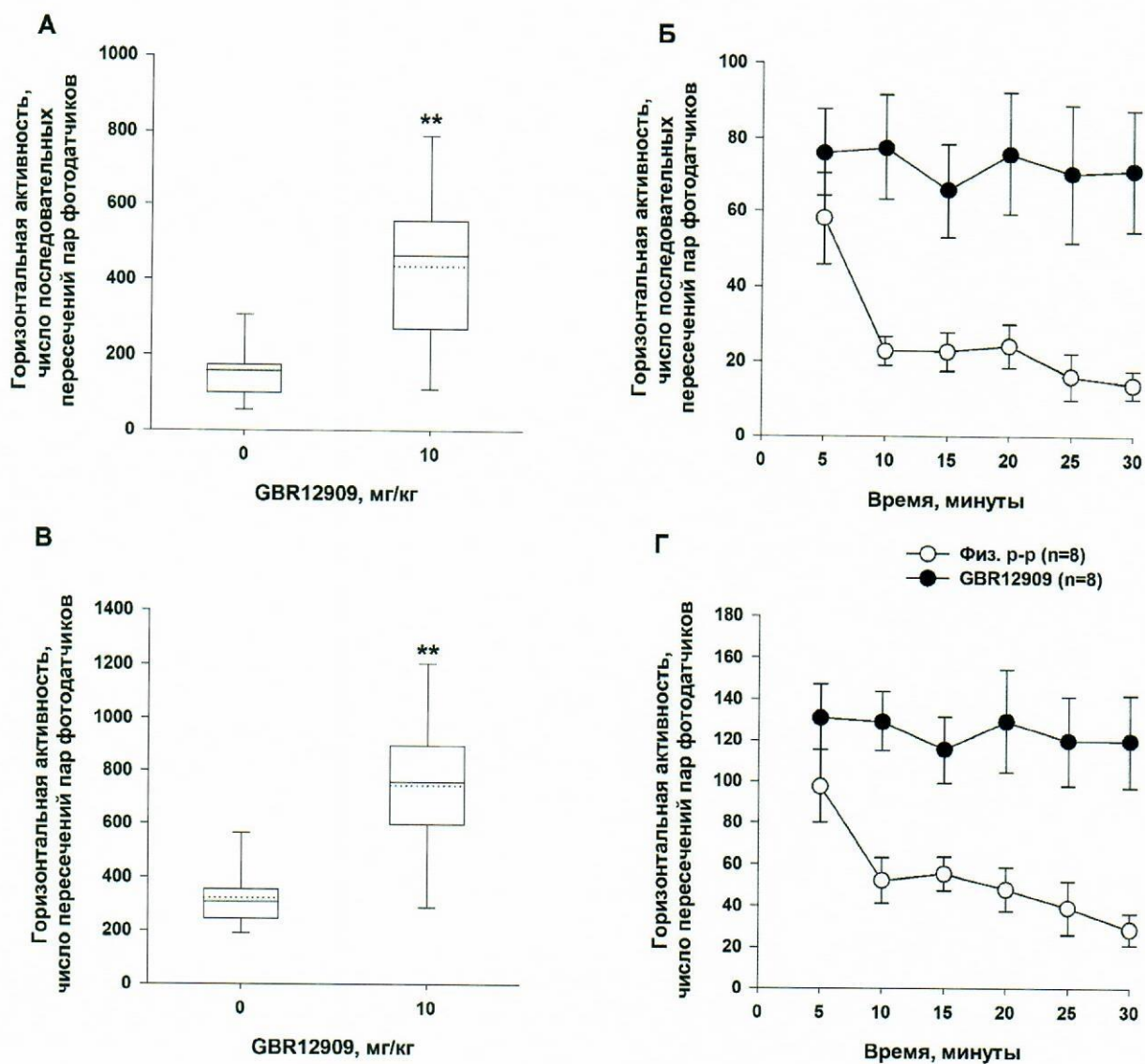


Рисунок 36. Действие GBR12909 10 мг/кг внутрибрюшинно на горизонтальную двигательную активность мышей. Данные представлены в виде (А, В) средних \pm средняя ошибка средней или (Б и Г) блочных диаграмм — «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). $n=8$ для каждой группы. ** — $P<0,01$, тест Манна — Уитни.

В Эксперименте 2 (как видно на Рисунке 37А и В), введение DS16 в дозе 100 мг/кг перорально снижало уровень горизонтальной двигательной активности у мышей, находящихся под действием GBR12909, относительно животных контрольной группы. Однако различия между мышами двух групп не достигли уровня статистической значимости (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $P=0,49$; число пересечений пар фотодатчиков — $P=0,13$). Горизонтальная двигательная активность мышей экспериментальной группы была ниже, чем у животных, получивших растворитель в комбинации с GBR12909, в течение всех 60 минут эксперимента (Рисунок 37Б и Г), но межгрупповые различия не достигли уровня статистической значимости (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(1,10)=0,944$, $P=0,36$), хотя нам удалось обнаружить статистический тренд в случае числа пересечений пар датчиков ($F(1,11)=4,28$, $P=0,06$). Статистически значимым было влияние фактора «номер пятиминутного интервала» (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(11,15)=2,82$, $P=0,03$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(11,14)=6,18$, $P=0,001$). Влияние взаимодействия двух этих факторов на горизонтальную активность было незначимым (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(11,15)=0,65$, $P=0,76$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(11,14)=0,32$, $P=0,97$), поэтому дальнейшие попарные сравнения не проводили.

В Эксперименте 3 (как видно на Рисунке 38А и В), группа мышей, получивших AP163 в дозе 100 мг/кг перорально, характеризовались очень большой гетерогенностью по уровню двигательной активности (число последовательных пересечений пар фотодатчиков за 60 минут: наименьшее значение — 7, наибольшее значение — 1901; число пересечений пар фотодатчиков за 60 минут: наименьшее значение — 18, наибольшее значение — 2567). Возможно, это связано с раздражающим действием AP163 на слизистую оболочку желудка (экспериментаторы не отмечали развития стереотипий у животных, поэтому маловероятно, что вещество обладает собственным стимулирующим действием на двигательную активность мышей). Различия между мышами двух групп не достигли уровня статистической значимости (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $P=1,0$; число пересечений пар фотодатчиков — $P=1,0$). Хотя средняя горизонтальная двигательная активность мышей экспериментальной группы была выше, чем у животных, получивших растворитель в комбинации с GBR12909, в течение 45–50 минут эксперимента (Рисунок 38Б и Г), но межгрупповые различия не достигли уровня статистической значимости (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(1,9)=0,04$, $P=0,845$; (число пересечений пар фотодатчиков — $F(1,9)=0,12$, $P=0,74$), и вероятнее связаны с гетерогенностью группы, описанной выше. Статистически значимым было влияние

фактора «номер пятиминутного интервала» (число последовательных пересечений пар фотодатчиков — $F(11,13)=3,63$, $P=0,02$; число пересечений пар фотодатчиков — $F(11,13)=3,02$, $P=0,03$). Влияние взаимодействия двух этих факторов на горизонтальную активность достигло уровня статистической значимости в случае числа пересечений пар фотодатчиков — $F(11,13)=2,94$, $P=0,04$; тест Бонферрони — n.s.), но не в случае числа последовательных пересечений пар фотодатчиков ($F(11,13)=1,94$, $P=0,76$).

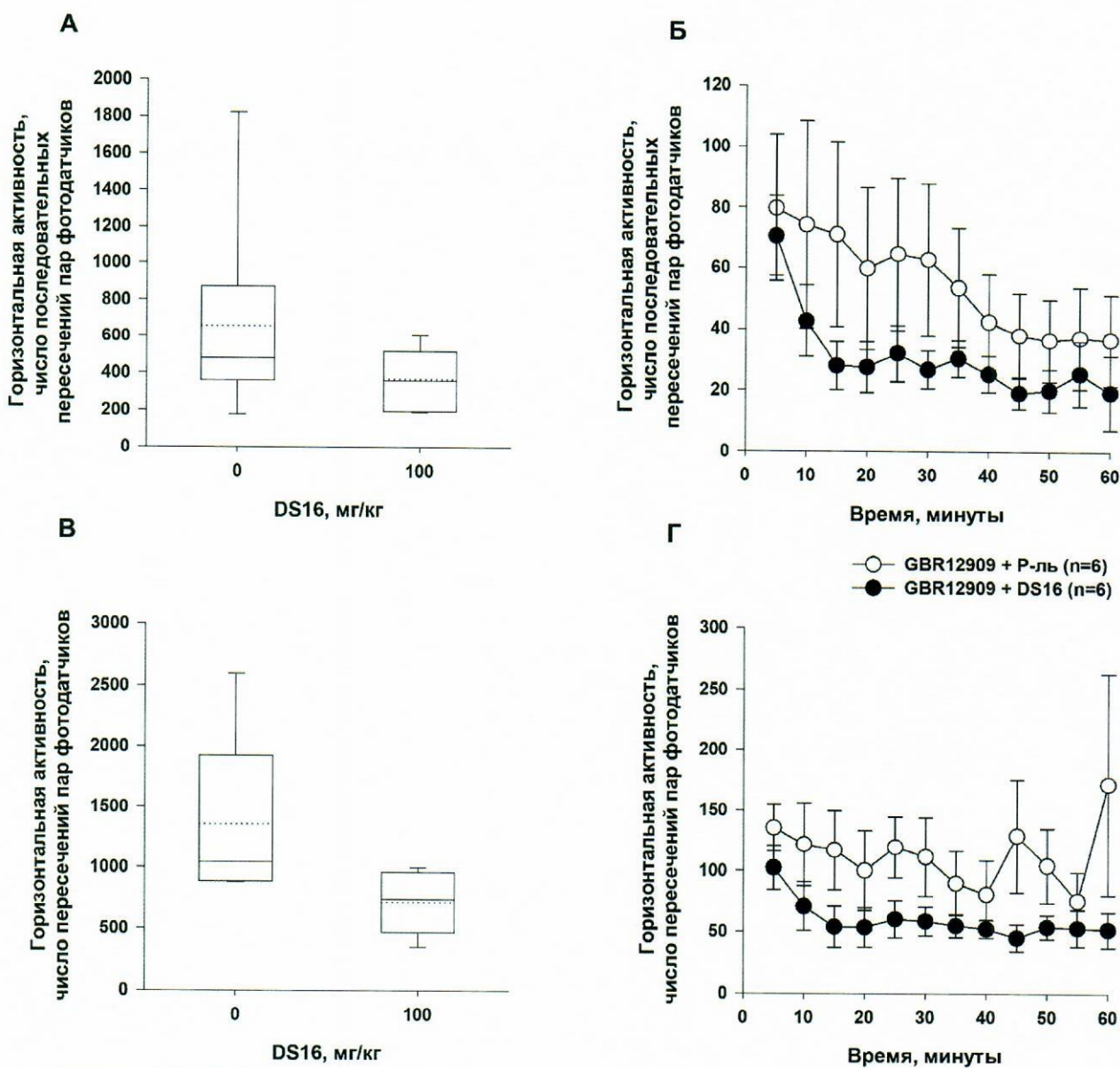


Рисунок 37. Действие DS16 100 мг/кг перорально на горизонтальную двигательную активность мышей

Данные представлены в виде (А, В) средних \pm средняя ошибка средней или (Б и Г) блочных диаграмм — «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). $n=6$ для каждой группы.

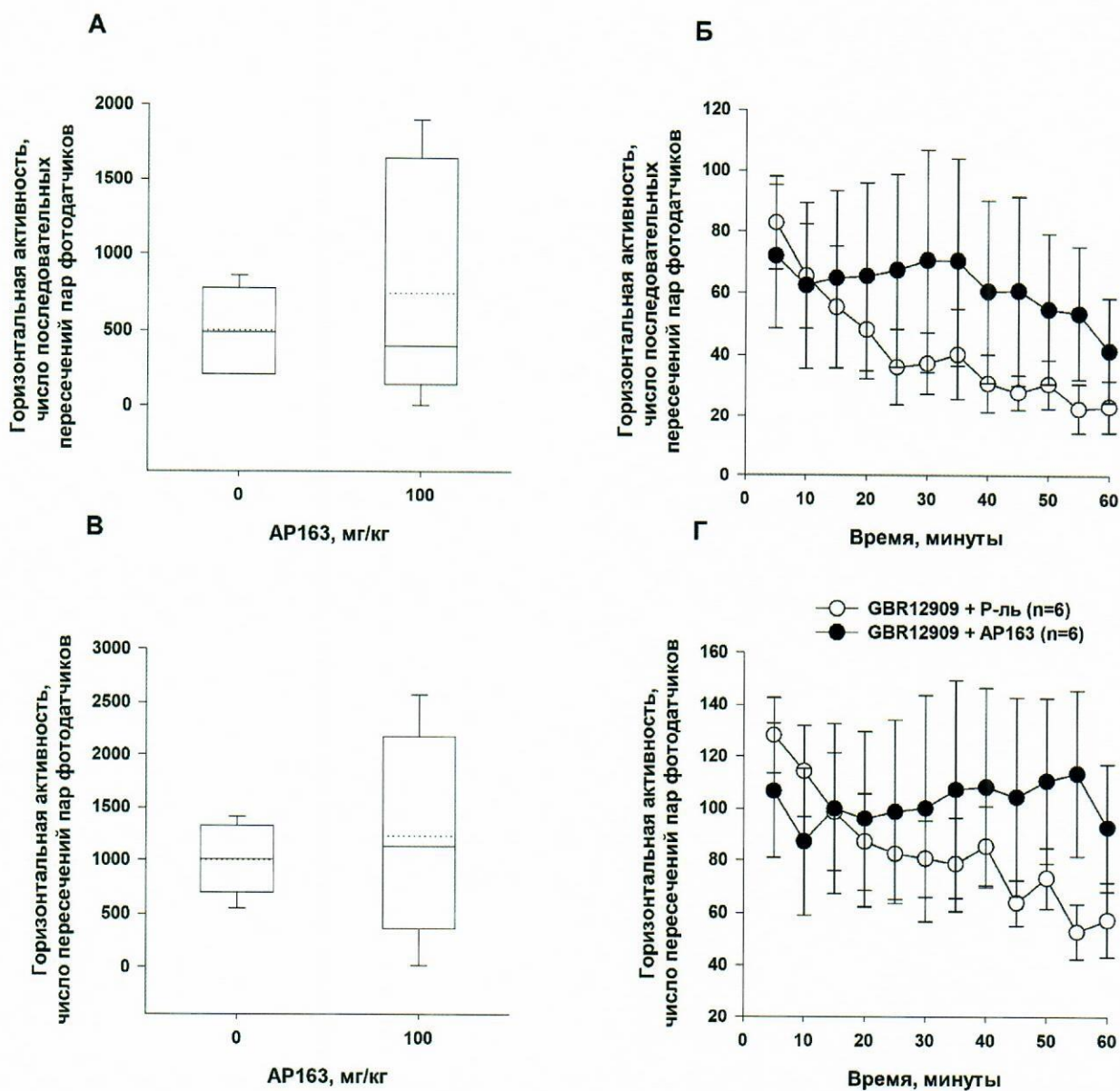


Рисунок 38. Действие AP163 100 мг/кг перорально на горизонтальную двигательную активность мышей

Данные представлены в виде (А, В) средних \pm средняя ошибка средней или (Б и Г) блочных диаграмм — «ящичков с усами», отражающих в центре ящичков среднее значение (пунктирная линия) и медиану (сплошная линия); 25%/75% квантили (нижняя и верхняя кромки ящичка), 10-й и 90-й процентиля (нижняя и верхняя засечки усов). $n=6$ для каждой группы.

2.4.2.4 Выводы

Результаты полученных исследований указывают, что для дальнейшей разработки возможно использовать вещество DS16, введение которого сопровождалось снижением двигательной гиперактивности, вызванной введением GBR12209.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате научно-исследовательской работы разработан синтез библиотеки химических соединений – потенциальных агонистов TAAR1 на основе ранее разработанных ядер соединений замещенных 2-(5-арил-4H-1,2,4-триазол-3-ил)этанаминов, (азациклоалкил)метокси-замещенных бензамидов и замещенных 2,3,4,5-тетрагидробензо[f][1,4]оксазепинов.

Проведено *in vitro* тестирование активности потенциальных агонистов TAAR.

- c) Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) в тест-системе BRET.
- d) Проверка способности к активации человеческого рецептора следовых аминов 1-го типа (hTAAR1) в тест-системе NanoBiT.

В рамках исследований были определены 4 кандидата для исследований *in vivo*, на данный момент произвели оценку препарата LK1932A, а также двух ранее открытых вещества-кандидата AP163 и DS16.

Проведены дополнительные исследования активности LK00764 в физиологических тестах *in vivo* при интрагастральном введении. В рамках тестов по снижению гиперактивности у модельных животных пероральное введение LK00764 биологической активности не продемонстрировало.

Соединения LK1932A, AP163 и DS16 показали разный уровень эффективности при интраперитонеальном введении. На основании данных тестов было принято решение в выборе AP163 и DS16 в качестве кандидатов на тесты эффективности при интрагастральном введении *in vivo*.

DS16 продемонстрировал наибольший потенциал в химической модели гиперактивности, тем не менее, требуются дополнительные исследования дозо-зависимости на большем количестве животных

4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Белозерцева, И.В. Послеоперационные изменения поведения крыс, получавших анестезию севофлюраном / И.В. Белозерцева, О.А. Драволина, В.О. Кривов, М.А. Тур, Л.В. Мус, Ю.С. Полушин // Вестник анестезиологии и реаниматологии. — 2017. — Т. 14, № 2. — С. 55–63.
2. Белозерцева, И.В. Экспериментальное моделирование послеоперационных когнитивных расстройств / И.В. Белозерцева, О.А. Драволина, В.О. Кривов, М.А. Тур, Ю.С. Полушин // Вестник анестезиологии и реаниматологии. — 2016. — Т. 13, № 5. — С. 37–49.
3. Bastos, J.R. Inhibition of the dopamine transporter as an animal model of bipolar disorder mania: Locomotor response, neuroimmunological profile and pharmacological modulation [Text] / J.R. Bastos, K.M. Perico, É.L. Marciano Vieira, A.L. Teixeira, F.S. Machado, A.S. de Miranda, F.A. Moreira // J Psychiatr Res. — 2018. — Vol. 102. — P. 142–149.
4. Belozertseva, I.V. Morphine-induced Straub tail reaction in mice treated with serotonergic compounds / I.V. Belozertseva, O.A. Dravolina, M.A. Tur, M.G. Semina, E.E. Zvartau, A.Y. Beshpalov // Eur. J. Pharmacol. — 2016. — Vol. 791. — P. 1–7.
5. Berry M.D. et al. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges // Pharmacol Ther. — 2017. — Vol. 180. P. 161–180.
6. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators // J Neurochem. — 2004. — Vol. 90, № 2. P. 257–271.
7. Borowsky B. et al. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America — 2001. — Vol. 98, № 16. P. 8966–8971.
8. Caron M.G., Gainetdinov R.R. Dopamine: from pharmacology to molecular biology and back // Wiener klinische Wochenschrift. — 2006. — Vol. 118, № 19–20. P. 565–568.
9. Chistyakov V. Nicotine exposure throughout early development promotes nicotine self-administration in adolescent mice and induces long-lasting behavioural changes / V. Chistyakov, N. Patkina, A. Tammimäki, R. Talka, O. Salminen, I. Belozertseva, T. Galankin, R. Tuominen, E. Zvartau // Eur. J. Pharmacol. — 2010. — Vol. 640. — P. 87–93.
10. Dravolina, O. Group I metabotropic glutamate receptor antagonists attenuate the behavioral sensitization to motor effects of cocaine in rats [Text] / O. Dravolina, W. Danysz, A. Beshpalov // Psychopharmacology (Berl). — 2006. — Vol. 187. — P. 397–404.

11. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace Amines and Their Receptors // *Pharmacol Rev.* – 2018. – Vol. 70, № 3. P. 549–620.
12. Galley G. et al. Discovery and Characterization of 2-Aminooxazolines as Highly Potent, Selective, and Orally Active TAAR1 Agonists // *ACS Med Chem Lett.* – 2016. – Vol. 7, № 2. P. 192–197.
13. Galley G. et al. Optimisation of imidazole compounds as selective TAAR1 agonists: discovery of RO5073012 // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2012. – Vol. 22, № 16. P. 5244–5248.
14. Guariento S. et al. Rational design, chemical synthesis and biological evaluation of novel biguanides exploring species-specificity responsiveness of TAAR1 agonists // *Eur J Med Chem.* – 2018. – Vol. 146. P. 171–184.
15. Koblan K.S. et al. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia // *N Engl J Med.* – 2020. – Vol. 382, № 16. P. 1497–1506.
16. Krasavin M. et al. Discovery of Trace Amine Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 2-(5-(4'-Chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine (LK00764) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12, № 11. P. 1650.
17. Lam, V.M. Behavioral Effects of a Potential Novel TAAR1 Antagonist [Text] / V.M. Lam, C.A. Mielnik, C. Baimel, P. Beerepoot, S. Espinoza, I. Sukhanov, W. Horsfall, R.R. Gainetdinov, S.L. Borgland, A.J. Ramsey, A. Salahpour // *Front Pharmacol.* — 2018. — Vol. 4. №9. — A. 953.
18. Leo D. et al. Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: Role of D2 dopamine autoreceptors // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 81. P. 283–291.
19. Leo, D. Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats [Text] / D. Leo, I. Sukhanov, F. Zoratto, P. Illiano, L. Caffino, F. Sanna, G. Messa, M. Emanuele, A. Esposito, M. Dorofeikova, E.A. Budygin, L. Mus, E.V. Efimova, M. Niello, S. Espinoza, T.D. Sotnikova, M.C. Hoener, G. Laviola, F. Fumagalli, W. Adriani, R.R. Gainetdinov // *J Neurosci.* — 2018. — Vol. 38, №8. — P. 1959–1972.
20. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature* – 2006. – Vol. 442, № 7103. P. 645–650.
21. Piotrovskiy, L.B. Enhanced brain penetration of hexamethonium in complexes with derivatives of fullerene C60 [Text] / L.B. Piotrovskiy, E.V. Litasova, M.A. Dumpis, D.N. Nikolaev, E.E. Yakovleva, O.A. Dravolina, A.Y. Bernalov // *Dokl. Biochem. Biophys.* — 2016. — Vol. 468, №1. — P. 173–175.

22. Radchenko, E.V. Agonist and antagonist effects of cytisine in vivo [Text] / E.V. Radchenko, O.A. Dravolina, A.Y. Besspalov // *Neuropharmacology*. — 2015. — Vol. 95. — P. 206–214.
23. Reinwald, J.R. Dopamine transporter silencing in the rat: systems-level alterations in striato-cerebellar and prefrontal-midbrain circuits [Text] / J.R. Reinwald, N. Gass, A.S. Mallien, A. Sartorius, R. Becker, M. Sack, C. Falfan-Melgoza, C. Clemm von Hohenberg, D. Leo, N. Pfeiffer, A. Middelman, A. Meyer-Lindenberg, J.R. Homberg, W. Weber-Fahr, P. Gass // *Mol Psychiatry*. — 2022. — Vol. 27, №4. — P. 2329-2339.
24. Revel, F.G. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity [Text] / F.G. Revel, J.-L. Moreau, R.R. Gainetdinov, A. Bradaia, T.D. Sotnikova, R. Mory, S. Durkin, K.G. Zbinden, R. Norcross, C.A. Meyer, V. Metzler, S. Chaboz, L. Ozmen, G. Trube, B. Pouzet, B. Bettler, M.G. Caron, J.G. Wettstein, M.C. Hoener // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2011. — V. 108, №20. — P. 8485–8490.
25. Stanhope, K.J., The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat [Text] / K.J. Stanhope, N.R. Mirza, M.J. Bickerdike, J.L. Bright, N.R. Harrington, G.A. Hesselink, M.B. Kennett, S. Lightowler, M.J. Sheardown, R. Syed, R.L. G. Upton, S.M. Wadsworth, S.M. Weiss, A. Wyatt // *J Pharmacol Exp Ther*. — 2001. — Vol. 299, №2. — P. 782–792.
26. Sukhanov, I. Activation of trace amine-associated receptor 1 attenuates schedule-induced polydipsia in rats [Text] / I. Sukhanov, A. Dorotenko, A. Dolgorukova, M.C. Hoener, R.R. Gainetdinov, A.Y. Besspalov // *Neuropharmacology*. — 2019. — Vol. 144. — P. 184–192.
27. Sukhanov, I. Increased context-dependent conditioning to amphetamine in mice lacking TAAR1 [Text] / I. Sukhanov, L. Caffino, E.V. Efimova, S. Espinoza, T.D. Sotnikova, L. Cervo, F. Fumagalli, R.R. Gainetdinov // *Pharmacol Res*. — 2016. — Vol. 103. — P. 206–214.
28. Sukhanov, I. Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates the Locomotor and Sensitization Effects of Nicotine [Text] / I. Sukhanov, M. Dorofeikova, A. Dolgorukova, A. Dorotenko, R.R. Gainetdinov // *Frontiers Pharmacology*. — 2018, — A. 9:329.
29. Wolf M.E., Mosnaim A.D. Phenylethylamine in neuropsychiatric disorders // *Gen Pharmacol*. — 1983. — Vol. 14, № 4. P. 385–390.

5 ПРИЛОЖЕНИЯ

5.1 ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»**

**Этический комитет в области
исследований на животных
СПбГУ**

Заключение № 131-03-4 от 11 октября 2022 г.

**на рассмотрение исследовательского проекта Ефимовой Евгении
Викторовны «Изучение действия агонистов TAAR1 рецепторов на животных
моделях психических заболеваний».**

Планируемый проект «Изучение действия агонистов TAAR1 рецепторов на животных моделях психических заболеваний» соответствует современным международным и национальным нормам этичного проведения исследований с использованием животных. Этический комитет в области исследований на животных СПбГУ одобряет проведение исследования в заявленные в проекте сроки (октябрь 2022 – август 2023).

Председатель



Г.О.Черепанов

Ответственный секретарь



Е.А.Вейхер

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»**

**Этический комитет в области
исследований на животных
СПбГУ**

Заключение № 131-03-3 от 13 марта 2024 г.

**на рассмотрение исследовательского проекта Гайнетдинова Рауля
Радиковича «Разработка инновационных лекарственных средств на
основе TAAR рецепторов следовых аминов».**

Планируемый проект «Разработка инновационных лекарственных средств на основе TAAR рецепторов следовых аминов» соответствует современным международным и национальным нормам этичного проведения исследований с использованием животных. Этический комитет в области исследований на животных СПбГУ одобряет проведение исследования в планируемые сроки (март 2024 – декабрь 2024 г.).

Председатель



Г.О. Черепанов

Ответственный секретарь



Е.А. Вейхер