

УДК 577.17

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА С АКТИВНОСТЬЮ АНТАГОНИСТОВ

© 2020 г. К. В. Деркач<sup>а</sup>, Д. В. Дарьин<sup>б</sup>, А. О. Шпаков<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

<sup>б</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 05.12.2019 г.

Принята к публикации 22.12.2019 г.

В настоящее время ведется поиск селективных антагонистов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ), необходимых для подавления стероидогенеза при гормонозависимых опухолях и предотвращения синдрома гиперстимуляции яичников. Одним из подходов для решения этой проблемы является создание низкомолекулярных антагонистов аллостерического сайта этого рецептора, локализованного в его трансмембранном домене. Цель работы состояла в разработке гетероциклических соединений, производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина (ТР31), пиримидо[4,5,6-*de*][1,6]нафтиридина (РР10) и пиридо[3,4-*d*]пиримидина (РР17), и в изучении их способности влиять на функциональную активность рецептора ЛГ в условиях *in vitro* и *in vivo*. Показано, что соединение ТР31 в микромолярных концентрациях подавляет стимулирующие эффекты хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и ТР03, аллостерического агониста рецептора ЛГ, на активность аденилатциклазы в тестикулярных мембранах крысы, причем его действие в наибольшей степени проявлялось в отношении стимулирующих эффектов ТР03. Это обусловлено большей селективностью антагониста ТР31 в отношении сАМР-зависимых сигнальных каскадов, преимущественно активируемых ТР03 и реализуемых через G<sub>s</sub>-белки. Соединение РР17 в одинаковой степени ингибировало стимулирующие эффекты ХГЧ и ТР03 на активность аденилатциклазы, но было менее активным в сравнении с ТР31. При интратестикулярном (10 мг/кг) и внутривнутрибрюшинном (45 мг/кг) введении самцам крыс соединения ТР31 и РР17 снижали базовый уровень тестостерона в крови, а также подавляли продукцию тестостерона, стимулированную ХГЧ (100 МЕ/крысу), причем ингибирующий эффект ТР31 был выражен намного сильнее. В сравнении с ТР31 и РР17, соединение РР10 характеризовалось слабо выраженной антагонистической активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные указывают на то, что ТР31, наиболее активный функциональный антагонист среди изученных соединений, связываясь с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ, делает его малодоступным для аллостерических агонистов и нарушает передачу гормонального сигнала через рецептор ЛГ, что указывает на перспективность разработки ингибиторов ЛГ-зависимых путей и стероидогенеза на его основе.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный лиганд, рецептор лютеинизирующего гормона, антагонист, тестостерон, хорионический гонадотропин

**DOI:** 10.31857/S0233475520030032

### ВВЕДЕНИЕ

Основными регуляторами стероидогенеза у мужчин и женщин являются лютеинизирующий гормон (ЛГ), который вырабатывается гонадотрофами гипофиза, и его структурный и функциональный гомолог — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), гипофизарная форма которого, как и ЛГ, вырабатывается гонадотрофами, а плацентарная форма продуцируется у женщин в

первом триместре беременности. Все формы гонадотропинов специфично взаимодействуют с эктодоменом рецептора ЛГ, активируют его и запускают широкий спектр сигнальных каскадов в клетках Лейдига семенников или в клетках гранулезы и теки яичников, стимулируя процесс стероидогенеза [1–3]. Фармакологические препараты ЛГ и ХГЧ способны вызывать побочные эффекты, что обусловлено их низкой селективностью по отношению к внутриклеточным эффектор-

ным системам, развитием к ним резистентности клеток-мишеней, необходимостью парентерального введения, иммуногенностью и гетерогенностью. Вследствие этого ведется разработка низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ЛГ, способных стимулировать стероидогенез, не вызывая побочных эффектов, характерных для гонадотропинов [4, 5]. Наиболее эффективными среди них являются производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина, в том числе ранее разработанные нами соединения TP01, TP03, TP04 и TP23 которые при различных способах введения самцам крыс стимулируют тестикулярный стероидогенез и повышают уровень тестостерона в крови животных [6–10].

Наряду с активаторами рецептора ЛГ, в клинике востребованы и его антагонисты, снижающие функциональную активность ЛГ-зависимых сигнальных каскадов. Они нацелены на предотвращение гиперактивации этих каскадов при развитии синдрома гиперстимуляции яичников [11, 12], а также могут использоваться для лечения гормонозависимых опухолей, ингибируя ЛГ-зависимую сигнализацию и снижая продукцию стероидных гормонов [13, 14]. Для этого обычно используют антагонисты гонадолиберина, стероидные и нестероидные антиандрогенные препараты, что, однако, сопряжено с развитием острого дефицита стероидных гормонов и тяжелыми репродуктивными расстройствами [13–15]. Альтернативой может стать разработка низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецептора ЛГ с активностью антагонистов и(или) инверсионных агонистов. В 2009 году было получено соединение LUF5771, производное терфенила, наделенное активностью инверсионного агониста рецептора ЛГ, но оно до сих пор не используется в клинических условиях [16, 17]. Необходимо отметить, что, в отличие от рецептора ЛГ, разработано значительное число низкомолекулярных антагонистов и инверсионных агонистов для рецепторов тиреотропного (ТТГ) и фолликулостимулирующего гормонов (ФСГ), сходных по структурно-функциональной организации с рецептором ЛГ [5, 18–20].

Целью работы были разработка и изучение механизмов действия различных по структуре гетероциклических соединений, производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина (TP31), пиримидо[4,5,6-*de*] [1,6]нафтиридина (PP10) и пиридо[3,4-*d*]пиримидина (PP17), с активностью антагонистов рецептора ЛГ и зависимых от него сигнальных каскадов в условиях *in vitro* и *in vivo*. Антагонистическую активность оценивали по влиянию исследуемых соединений на стимулированную ХГЧ активность аденилатциклазы (АЦ) в тестикулярных мембранах крысы, а также на базовый и стимулированный ХГЧ уровень тестостерона в крови самцов крыс. Для исследования также использовали

разработанное и изученное ранее тиено-[2,3-*d*]пиримидиновое производное TP03 с активностью полного аллостерического агониста рецептора ЛГ [7, 9, 10].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов были взяты самцы крыс Wistar (возраст 2.5–3 мес.), которых содержали в стандартных условиях вивария и на стандартном рационе. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и с правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

В биохимических экспериментах использовали креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, сАМР, АТР,  $\beta$ , $\gamma$ -имидогуанозин-5'-трифосфат (GppNHp) и другие реактивы производства фирмы Sigma (США). ХГЧ был производства Московского эндокринологического завода (Россия). Для определения активности АЦ использовали [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТР (150 ГБк/ммоль) производства “Изотоп” (Россия). Для разделения смеси меченых нуклеотидов использовали активированную нейтральную окись алюминия (Sigma). Структуру синтезируемых соединений подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения. Для регистрации спектров <sup>1</sup>H-ЯМР использовали спектрометр Bruker Avance III 400 (на ядрах <sup>1</sup>H с частотой 400.13 МГц). Химические сдвиги указывали в миллионных долях ( $\delta$ , м.д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточный сигнал ДМСО-*d*<sub>6</sub> (2.50 м.д.), константы спин-спинового взаимодействия (*J*) измеряли в приближении первого порядка и приводили в Гц. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали с помощью спектрометра Bruker micrOTOF (electrospray ionization – time of flight, ESI-TOF) (Германия).

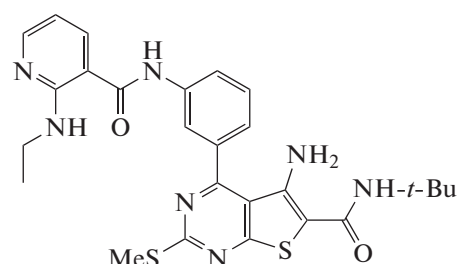
Соединение TP31, 5-амино-N-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-[3-(2-(этиламино)никотинамидо)-фенил]тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (рис. 1), синтезировали по той же схеме, что и соединение TP03, как описано ранее [7]. Для синтеза использовали реакцию ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-N-(*трет*-бутил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид в присутствии 1-[бис(диметиламино)метилен]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксида гексафторфосфата (НАТУ) и N,N-диизопропилэтиламина. Целевой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент: хлороформ–ацетон 10:1), перекристаллизовывали из метанола, выход составил 44%, т. пл. 149–150°C. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H ( $\delta$ , м. д. (*J*, Гц), ДМСО-*d*<sub>6</sub>) содер-

жал следующие сигналы: 1.16 (3H, т,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J$  7.1); 1.37 (9H, с,  $t\text{-Bu}$ ); 2.62 (3H, с, SMe); 3.44 (2H, к,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J$  7.1); 6.11 (2H, с,  $\text{NH}_2$ ); 6.64 (1H, дд,  $J$  4.8, 7.6); 6.97 (1H, с,  $\text{NH}-t\text{-Bu}$ ); 7.39 (1H, д,  $J$  7.6); 7.58 (1H, т,  $J$  7.9); 7.89–7.99 (2H, м); 8.02 (1H, с); 8.10 (1H, дд,  $J$  1.7, 7.6); 8.23 (1H, дд,  $J$  1.6, 4.8); 10.47 (1H, с). По данным масс-спектрометрии высокого разрешения, молекулярная масса TP31 составила 536.1899 (вычислено для  $[\text{M} + \text{H}^+] - 536.1897$ ;  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}_2$ ).

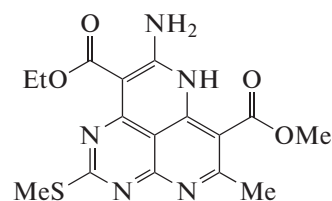
Соединение PP10, этиловый эфир 8-амино-5-метил-2-(метилсульфанил)-6-(метиксикарбонил)-7H-пиримидо[4,5,6-*de*] [1, 6]нафтиридин-9-карбоновой кислоты (рис. 1), было получено, как описано ранее [21]. Целевой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, перекристаллизацию проводили в смеси гексан–этилацетат 1 : 1. Выход реакции составил 63%, т. пл. 187–190°C (с разложением). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц), ДМСО- $d_6$ ) содержал следующие сигналы: 1.32 (т, 3H,  $J = 7.1$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.33 (с, 3H, SMe), 2.54 (с, 3H, 7-Me), 3.85 (с, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 4.28 (к, 2H,  $J = 7.1$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 7.74 (2H, ш.с.,  $\text{NH}_2$ ). По данным масс-спектрометрии высокого разрешения, молекулярная масса PP10 составила 376.1081 (вычислено для  $[\text{M} + \text{Na}^+] - 376.1074$ ;  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ ).

Соединение PP17, этиловый эфир 7-амино-4-(3-(этоксикарбонил)пиперидин-1-ил)-2-(метилсульфанил)пиридо[4,3-*d*]пиримидин-8-карбоновой кислоты (рис. 1), было получено нуклеофильным замещением активного атома хлора циклическим амином (этилникототатом) из этилового эфира 7-амино-2-метилсульфанил-4-хлорпиридо[4,3-*d*]пиримидин-8-карбоновой кислоты (соединение 1), синтез которого описан ранее [22].

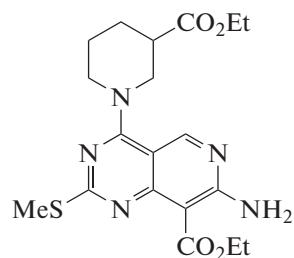
В соответствии с разработанной методикой, к раствору этилового эфира никотиновой кислоты (1.59 ммоль) и  $\text{N,N}$ -диизопропилэтиламина (2.0 ммоль) в сухом  $\text{N,N}$ -диметилформамиде (2 мл) добавляли соединение 1 (1.33 ммоль). Раствор перемешивали 15 мин при комнатной температуре, добавляли к нему охлажденную воду (12 мл, 4°C), продукт экстрагировали хлористым метиленом (дважды по 10 мл), органическую фазу промывали водой (дважды по 8 мл), высушивали над прокаленным  $\text{CaCl}_2$ , растворитель отгоняли в вакууме, остаток растирали с гексаном (10 мл), выдержали в течение 1 ч (+4°C), полученные кристаллы отфильтровали и высушивали. Выход реакции составил 66%, т. пл. 125–127°C. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц), дейтерированный хлороформ) содержал следующие сигналы: 8.76 (с, 1H), 6.69 (ш.с., 2H), 4.47 (кв,  $J = 7.1$ , 2H), 4.42–4.35 (м, 1H), 4.17 (кв,  $J = 7.1$ , 2H), 4.14–4.07 (м, 1H), 3.46 (дд,  $J = 13.3, 10.0$ , 1H), 3.39–3.30 (м, 1H),



TP31



PP10



PP17

Рис. 1. Структуры соединений TP31, PP10 и PP17, относящихся к классам тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, пиримидо[4,5,6-*de*] [1, 6]нафтиридинов и пиридо[3,4-*d*]пиримидинов.

2.78–2.69 (м, 1H), 2.62 (с, 3H), 2.21–2.13 (м, 1H), 1.94–1.66 (м, 4H), 1.46 (т,  $J = 7.1$ , 3H), 1.27 (т,  $J = 7.1$ , 3H). По данным масс-спектрометрии высокого разрешения, молекулярная масса PP17 составила 420.1712 (вычислено для  $[\text{M} + \text{Na}^+] - 420.1700$ ;  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ ).

Для определения активности соединений в условиях *in vitro* из тканей семенников крыс Wistar ( $n = 6$ ) выделяли фракции плазматических мембран. Животных наркотизировали, декапировали, иссекали у них ткани семенников, которые затем промывали в охлажденном до 4°C 40 mM Трис-НСl-буфере (рН 7.4), содержащем 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% сахарозу и ингибиторы протеаз (буфере А), измельчали и гомогенизировали в 10 объемах того же буфера. Гомогенат центрифугировали (1500 g, 10 мин), супернатант отделяли и повторно центрифугировали (20000 g, 30 мин). Осажденные мембраны ресуспендировали в бу-

фере А без сахарозы (содержание белка 1–2 мг/мл), замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , используя в дальнейшем для определения активности АЦ.

Активность АЦ (АТР-пирофосфаталиаза циклизующей, НФ 4.6.1.1) во фракциях тестикулярных мембран определяли, как описано ранее [7], для чего мембраны (50–80 мкг белка) инкубировали в течение 12 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  в смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСI (рН 7.5), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 мМ сАМР, 1 мМ АТР, 37 КБк  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ , 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы. Реакцию проводили в течение 12 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , начиная добавлением фракции мембран и останавливая добавлением в пробу 100 мкл 0.5 М НСI. Пробы кипятили в течение 6 мин, кислоту нейтрализовали 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{сАМР}$  отделяли от других меченых нуклеотидов на колонках с нейтральным оксидом алюминия (градация II по Брокману), используя в качестве элюента 8 мл 10 мМ имидазол-НСI буфера (рН 7.4). Радиоактивность измеряли на счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (LKB, Швеция). Активность АЦ оценивали по количеству сАМР, который получался в ходе реакции, и выражали в пмоль сАМР/мин/мг белка. Гидрофобные соединения ТР03, ТР31, РР10 и РР17 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). В контрольные пробы вместо соединений в том же объеме добавляли растворитель, рассматривая активность АЦ в них как базовую.

При изучении активности ТР31, РР10 и РР17 в условиях *in vivo* их растворяли в ДМСО и вводили самцам крыс интратестикулярно в дозе 10 мг/кг или внутривентриально в дозе 45 мг/кг. Контрольным крысам вместо препаратов интратестикулярно или внутривентриально вводили ДМСО в том же объеме. Инъекции проводили в 11.00, концентрацию тестостерона оценивали до введения (10.00) и через 1, 3 и 5 ч (12.00, 14.00, 16.00) после введения препаратов. Для изучения влияния соединений на стимулирующий эффект тестостерона эффект ХГЧ их вводили внутривентриально в дозе 45 мг/кг за 20 мин до введения гонадотропина (в 10.40 и 11.00, соответственно). ХГЧ вводили подкожно в дозе 100 МЕ/крысу. В каждой группе было по 5 животных. Образцы крови для определения уровня тестостерона получали из хвостовой вены, используя местный наркоз с помощью анестезии 2% раствором лидокаина (в расчете 2–4 мг/кг). Концентрацию тестостерона определяли с помощью наборов Тестостерон-ИФА (Алкор-Био, Россия), используя спектрофотометр Anthos Absorbance Reader 2020 (Anthos Labtec Instruments, Австрия).

Статистический анализ осуществляли, используя программу Microsoft Office Excel 2007. Нормальность распределения проверяли с помо-

щью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ , данные представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (mean  $\pm$  SEM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди серии синтезированных нами гетероциклических соединений были идентифицированы три, которые характеризовались способностью ингибировать стимулирующие эффекты ортостерических (ХГЧ) и аллостерических (ТР03) агонистов рецептора ЛГ на активность аденилатциклазной системы в тестикулярных мембранах. Два из них, производное тиено-[2,3-*d*]пиримидина ТР31 и производное пиридо[3,4-*d*]пиримидина РР17, были синтезированы и охарактеризованы нами впервые. В свою очередь, соединение РР10 является единственным известным в настоящее время представителем класса *перу*-конденсированных гетероциклов – пиримидо[4,5,6-*de*] [1, 6]нафтиридинов, а его синтез включает довольно редкую циклизацию путем окислительного нуклеофильного замещения в ароматическом ядре, впервые описанную нами ранее для такого рода субстратов [21].

Соединения ТР31, РР10 и РР17 в концентрациях  $10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М существенно не влияли на базовую активность АЦ в тестикулярных мембранах, в то время как ХГЧ ( $10^{-9}$  М) и соединение ТР03 ( $10^{-5}$  М) ее повышали, причем АЦ эффект ХГЧ существенно превышал таковой ТР03 (табл. 1). При совместном действии ХГЧ и ТР03 стимулирующее влияние гонадотропина на активность АЦ не только сохранялось, но и в небольшой степени усиливалось. Активность фермента при совместной обработке ХГЧ и ТР03 составила  $151.0 \pm 2.5$  пмоль сАМР/мин/мг белка и была достоверно выше, чем при добавлении одного ХГЧ ( $p < 0.05$ ). В тестикулярных мембранах, которые преинкубировали (5 мин,  $+4^{\circ}\text{C}$ ) с  $10^{-4}$  М ТР31, РР10 и РР17, стимулирующий АЦ эффект ХГЧ ослаблялся, причем ТР31 подавлял его в значительной степени. В концентрации  $10^{-6}$  М только соединение ТР31 достоверно снижало эффект ХГЧ (табл. 1). Преинкубация мембран с РР10 в обеих концентрациях достоверно снижала, хотя и в небольшой степени, стимулирующее воздействие ТР03 на активность АЦ, в то время как в случае преинкубации с соединениями ТР31 и РР17 эффективной была только концентрация  $10^{-4}$  М (табл. 1). В ней ТР31 снижал стимулирующий эффект ТР03, оцениваемый по приросту активности АЦ над ее базовым уровнем, на 84%, в

**Таблица 1.** Влияние преинкубации фракций тестикулярных мембран с соединениями TR31, PP10 и PP17 на вызываемую ХГЧ и TR03 стимуляцию активности аденилатциклазы

Преинкубация	Активность АЦ, пмоль сАМР/мин/мг белка, М ± SEM		
	контроль	ХГЧ, 10 <sup>-9</sup> М	TR03, 10 <sup>-5</sup> М
ДМСО	23.7 ± 1.1	135.2 ± 4.3 <sup>a</sup>	64.7 ± 2.9 <sup>a</sup>
TR31, 10 <sup>-6</sup> М	24.9 ± 0.9	110.2 ± 4.1 <sup>a, b</sup>	57.3 ± 2.9 <sup>a</sup>
TR31, 10 <sup>-4</sup> М	23.1 ± 1.0	68.5 ± 3.2 <sup>a, b</sup>	29.7 ± 1.8 <sup>b</sup>
PP10, 10 <sup>-6</sup> М	22.7 ± 0.8	124.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	55.3 ± 1.1 <sup>a, b</sup>
PP10, 10 <sup>-4</sup> М	20.5 ± 0.6	105.0 ± 2.4 <sup>a, b</sup>	52.3 ± 1.6 <sup>a, b</sup>
PP17, 10 <sup>-6</sup> М	22.4 ± 0.5	122.3 ± 2.1 <sup>a</sup>	57.0 ± 1.9 <sup>a</sup>
PP17, 10 <sup>-4</sup> М	21.5 ± 1.0	88.7 ± 3.1 <sup>a, b</sup>	42.8 ± 1.5 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Различия по сравнению с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup>Различия по сравнению с ХГЧ- или TR03-стимулированной активностью в пробах с добавлением ДМСО статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 6$ .

**Таблица 2.** Рассчитанные значения интегрированной площади под кривыми “Концентрация тестостерона (нМ) – время (12.00–16.00)” при интратестикулярном и внутрибрюшинном введении самцам крыс соединений TR31, PP10 и PP17, в том числе в условиях стимуляции стероидогенеза с помощью ХГЧ

Соединение	AUC <sub>12.00–16.00</sub> , усл. ед.		
	интратестикулярное введение	внутрибрюшинное введение	внутрибрюшинное введение совместно с ХГЧ
ДМСО	54.3 ± 6.9	76.8 ± 4.9	393.6 ± 22.8
TR31	27.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	31.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	196.9 ± 13.4 <sup>a</sup>
PP10	45.0 ± 3.9	50.6 ± 6.9	310.3 ± 22.4
PP17	35.2 ± 6.1	42.4 ± 4.9 <sup>a</sup>	260.0 ± 15.6 <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Различия по сравнению с группой, получавшей ДМСО (контроль), статистически значимы при  $p < 0.05$ .

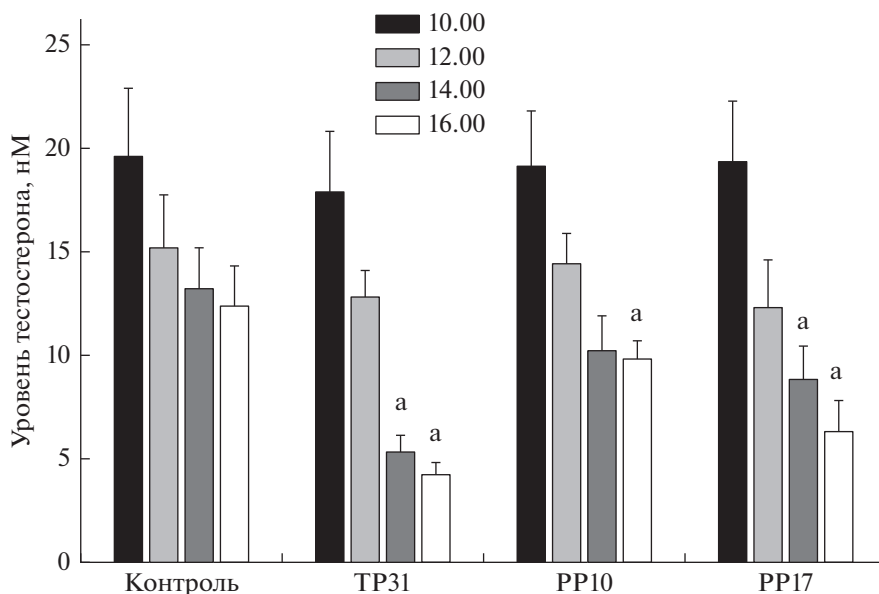
<sup>b</sup>Различия между группами крыс, обработанных TR31 + ХГЧ и PP17 + ХГЧ, статистически значимы при  $p < 0.05$ .

то время как PP17 – на 48%. Таким образом, среди исследуемых соединений тиено-[2,3-*d*]пиримидин TR31 оказывает наиболее выраженное ингибирующее влияние на стимулированную ХГЧ и TR03 активность АЦ, причем его влияние в наибольшей степени выражено в отношении аллостерического агониста TR03. Ингибирующее влияние PP17 менее выражено и неселективно в отношении TR03, в то время как PP10 характеризовалось сравнительно низкой антагонистической активностью.

Интратестикулярное введение крысам TR31, PP10 и PP17 в дозе 10 мг/кг приводило к снижению уровня тестостерона в крови, в наибольшей степени в случае TR31 (рис. 2). Ингибирующий эффект нарастал во времени, и через 5 ч во всех исследуемых группах уровень тестостерона был достоверно снижен в сравнении с его начальным уровнем. Значения AUC<sub>12.00–16.00</sub>, представляю-

щие собой интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ) – время (12.00–16.00, ч)”, для крыс, обработанных TR31 и PP17, были ниже в сравнении с контролем ( $p < 0.05$ ) (табл. 2).

Внутрибрюшинное введение крысам TR31 и PP17 в дозе 45 мг/кг снижало уровни тестостерона через 3 и 5 ч, в то время как в случае PP10 отмечали тенденцию к снижению, но различия с начальным уровнем тестостерона не были статистически значимыми на всем протяжении эксперимента (рис. 3). Введение TR31 и PP17 за 20 мин до инъекции ХГЧ в значительной степени снижало стимулированный гонадотропином уровень тестостерона, причем ингибирующее влияние TR31, как и при его воздействии на базовые уровни тестостерона, было выражено сильнее. Так, индуцированный гонадотропином прирост уровня



**Рис. 2.** Влияние интратестикулярного введения соединений TP31, PP10 и PP17 самцам крыс на уровень тестостерона в плазме крови. Соединения TP31, PP10 и PP17 вводили в 11.00. <sup>a</sup> – различия с начальным уровнем тестостерона статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 5$ .

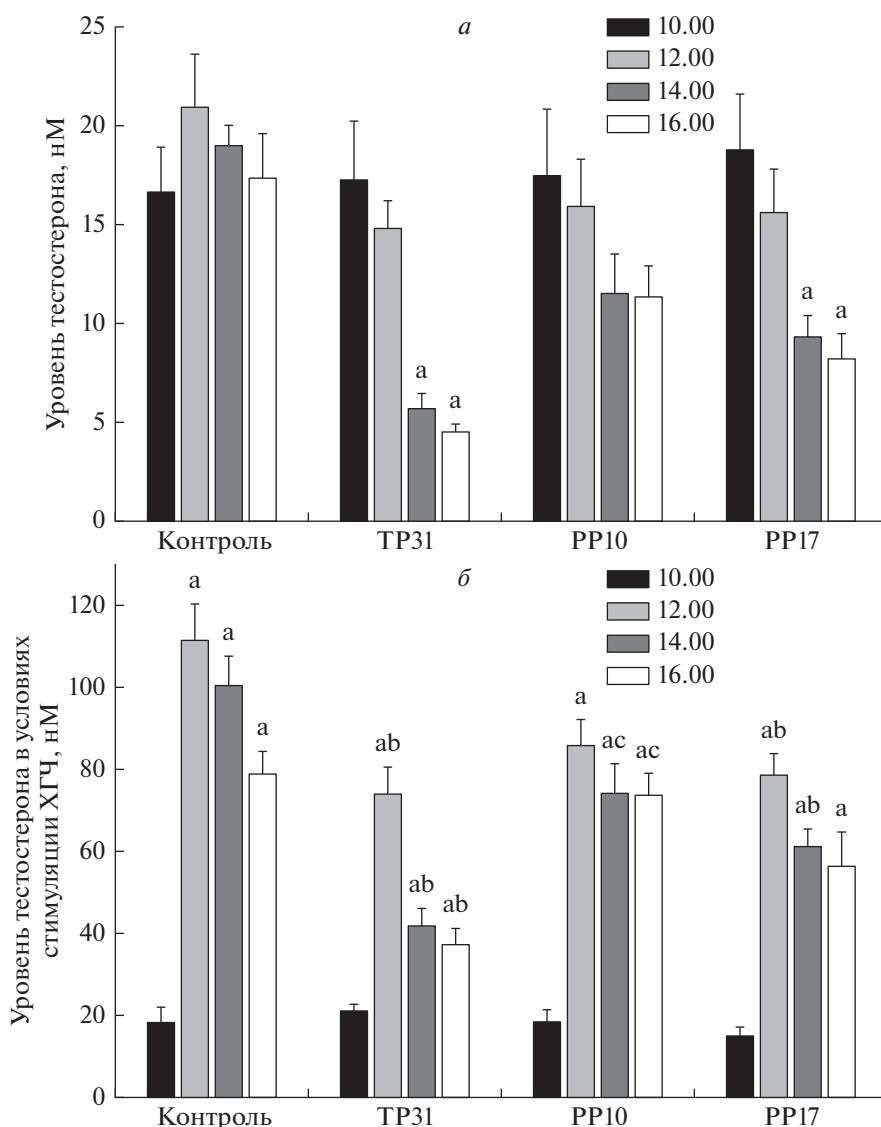
гормона в группе, обработанной TP31, через 3 и 5 ч снижался в среднем в 4 раза, а значение  $AUC_{12.00-16.00}$  для этой группы было снижено в 2 раза (рис. 3, табл. 2). Более того, значение  $AUC_{12.00-16.00}$  для группы TP31 + ХГЧ было достоверно ниже в сравнении с таковым для группы PP17 + ХГЧ (табл. 2). Соединение PP10 при введении самцам крыс в дозе 45 мг/кг слабо влияло на стимулированную ХГЧ продукцию тестостерона (рис. 3, табл. 2). Таким образом, соединение TP31 при различных способах введения самцам крыс снижало как базовую, находящуюся под контролем эндогенного ЛГ, так и стимулированную экзогенным ХГЧ продукцию тестостерона и превосходило по этому показателю пиридо[3,4-*d*]пиримидиновое производное PP17, в то время как пиримидо[4,5,6-*de*] [1, 6]нафтиридиновое производное PP10 в условиях *in vivo* было малоактивным.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на острую необходимость разработки селективных регуляторов рецептора ЛГ с активностью антагонистов, такие работы единичны. Среди таких регуляторов разработанное голландскими учеными соединение LUF5771, производное терфенила, которое подавляло стимуляцию рецептора ЛГ/ХГЧ гонадотропинами и низкомолекулярными аллостерическими агонистами [16, 17]. В концентрации 10 мкМ оно в 3 раза ускоряло скорость диссоциации производного тиено-[2,3-*d*]пиримидина Org 43553 от рецептора ЛГ/ХГЧ и в 2–3 раза снижало стимулирующие

эффекты ХГЧ и Org 43553 на сигнальные каскады, зависящие от гонадотропинов [16]. Значительно большее число низкомолекулярных соединений с активностью антагонистов и инверсионных агонистов, относящихся к различным классам органических соединений, включая тиено-[2,3-*d*]пиримидины, разработано для рецепторов ФСГ и ТТГ. Как и в случае LUF5771, их ингибирующий эффект реализуется вследствие их специфического взаимодействия с аллостерическим сайтом рецепторов ФСГ и ТТГ, который сформирован высококонсервативными участками трансмембранного домена и, как следствие, структурно близок аллостерическому сайту рецептора ЛГ [5, 18–20].

На основе данных литературы и собственных результатов по изучению тиено-[2,3-*d*]пиримидиновых производных нами была разработана, а затем и изучена активность серии гетероциклических соединений по их способности ингибировать стимулирующие эффекты ХГЧ и аллостерического агониста TP03 на активность аденилатциклазной сигнальной системы в тестикулярных мембранах. В клетках Лейдига эта система включает три основных компонента – рецептор ЛГ, гетеротримерный  $G_s$ -белок и фермент АЦ, и отвечает за большинство физиологических и биохимических эффектов ЛГ и ХГЧ, в том числе за стимуляцию ими стероидогенеза [1]. В результате проведенного скрининга были идентифицированы три соединения с различной гетероциклической структурой, в том числе впервые синтезированные нами TP31 и PP10, которые снижали сти-



**Рис. 3.** Влияние внутрибрюшинного введения самцам крыс соединений TP31, PP10 и PP17 на уровень тестостерона в крови животных (*а*) и на его стимуляцию хорионическим гонадотропином (*б*).

В опытах без введения ХГЧ соединения TP31, PP10, PP17 вводили в 10.40, в то время как подкожную инъекцию гонадотропина (100 МЕ/крысу) осуществляли в 11.00.

<sup>a</sup> – различия по сравнению с стартовыми концентрациями тестостерона в группах крыс (10.00) статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия по сравнению с группой ДМСО + ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия между группами TP31 + ХГЧ и PP10 + ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 5$ .

мулированную ХГЧ и TP03 активность АЦ в тестикулярных мембранах. Наибольшей активностью обладало производное тиено-[2,3-*d*]пиримидина TP31, которое в концентрации 100 мкМ практически полностью подавляло стимулирующий эффект TP03 на активность АЦ и в значительной степени снижало стимулирующий АЦ эффект ХГЧ (табл. 1).

Поскольку соединение TP31 в наибольшей степени предотвращает стимулирующее влияние TP03 на аденилатциклазную систему, можно предположить, что оно взаимодействует с алло-

стерическим сайтом рецептора ЛГ, делая его недоступным для TP03. Сходный механизм, состоящий в блокировании аллостерического сайта, лежит в основе действия большого числа созданных в настоящее время низкомолекулярных антагонистов рецепторов ФСГ и ТТГ, родственных рецептору ЛГ. Среди них содержащие гидрофобные бифенильные радикалы производные аминокламов, пиперазинов, пиррол[2,1-*c*]-бензодиазепинов и индола с активностью аллостерических антагонистов и(или) негативных аллостерических модуляторов рецептора ФСГ [4, 5, 20, 23],

а также различные гетероциклические соединения NCGC00229600, NCGC00242595, NCGC00242364 и S37a с активностью нейтральных аллостерических антагонистов рецептора ТТГ [5, 18, 19, 24, 25].

Соединение PP17 уступало TP31 по способности снижать стимулирующие АЦ эффекты ХГЧ и TP03. В свою очередь, ингибирующее влияние PP10 на эти эффекты ХГЧ и TP03 было выражено слабо и практически не зависело от концентрации этого соединения, что свидетельствует об особенностях фармакологического профиля PP10 и может указывать на аллостерическую природу регуляции им рецептора ЛГ. Так, например, ADX61623, аллостерический регулятор рецептора ФСГ, в клетках с экспрессированным в них рецептором ФСГ подавлял индуцированную гонадотропином продукцию сАМР и прогестерона, но в высоких концентрациях, напротив, усиливал стероидогенез и повышал продукцию эстрадиола [26].

В условиях *in vivo* соединения TP31 и PP17 снижали как базовую, так и стимулированную ХГЧ продукцию тестостерона. Соединение TP31 было одинаково эффективным как при интратестикулярном, так и при внутрибрюшинном способах введения, в то время как ингибирующие эффекты PP17 при его внутрибрюшинном введении ослаблялись, что, вероятно, обусловлено частичной деградацией этого соединения в кровотоке и (или) сниженной его биодоступностью для клеток Лейдига. Снижение базового уровня тестостерона в условиях *in vivo* при отсутствии влияния TP31 на базовую активность АЦ в условиях *in vitro* указывает на то, что при введении самцам крыс TP31 подавляет стероидогенез, вызываемый эндогенным ЛГ. При этом соединение TP31 лишь частично снижает стероидогенный эффект ХГЧ, что может быть обусловлено сохранением части рецепторов ЛГ в активной, свободной от TP31 форме, способной активироваться гонадотропином. Поскольку регуляторы, наделенные активностью аллостерических антагонистов и негативных аллостерических модуляторов, с относительно низкой аффинностью связываются с аллостерическим сайтом рецептора, то даже при длительном воздействии их субмаксимальных концентраций, вследствие установления динамического равновесия между свободными и связанными формами рецепторов, часть рецепторов сохраняет способность к активации агонистами. Это является важным преимуществом аллостерических регуляторов, поскольку они не вызывают тотального подавления активности рецепторов, что характерно для антагонистов высокоаффинного ортостерического сайта [27, 28]. Имеются все основания полагать, что TP31 лишь частично ингибирует функции рецепторов ЛГ и, как следствие, не вызывает остро андрогенного дефицита. Это является их важным преимуществом, поскольку сильно выраженное подавление функций гипота-

ламо-гипофизарно-гонадной оси и контролируемого ею стероидогенеза – крайне нежелательный побочный эффект при использовании антиандрогенных препаратов и высоких доз аналогов гонадолиберина [13–15].

Сравнение структуры TP31 с ранее разработанным тиено-[2,3-*d*]пиримидиновыми производными с активностью агонистов показывает, что основной причиной появления у TP31 свойств функционального антагониста является введение во второе положение гетероциклического кольца остатка никотиновой кислоты дополнительной этиламинной группы. Это меняет объем и заряд варьруемого заместителя в 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*m*ре*m*-бутил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамиде, используемом в качестве каркасной молекулы. У соединений TP01, TP03, TP04 и TP23 с активностью полных агонистов рецептора ЛГ в качестве такого заместителя выступают незамещенные остатки изоникотиновой и никотиновой кислот (TP01 и TP03), а также 1-метил-1*H*-пиразольная (TP04) и 2-хлорникотиновая группы (TP23) [6–8]. Важно отметить, что даже небольшие изменения структуры каркасной молекулы приводят к полной потере полученными в результате таких модификаций тиено-[2,3-*d*]пиримидиновыми производными активности агонистов в отношении рецептора ЛГ, в то время как на антагонистическую активность такие модификации не влияют. На это указывает то, что соединение PP17, которое имеет отличающуюся от тиено-[2,3-*d*]пиримидина гетероциклическую систему и в котором отсутствуют *m*ре*m*-бутиламидная группа и варьруемый заместитель, имеет активность функционального антагониста рецептора ЛГ. В то же время оно с меньшей эффективностью, в сравнении с TP31, подавляет стимулирующие эффекты аллостерических агонистов этого рецептора, что позволяет предположить негативное влияние перечисленных выше структурных изменений в молекуле PP17 на его способность взаимодействовать с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ.

Таким образом, нами впервые показано, что соединения TP31 и PP17, производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина и пиридо[3,4-*d*]пиримидина, действуют как функциональные антагонисты рецептора ЛГ, препятствуя его стимуляции гонадотропином и аллостерическим агонистом TP03. По антагонистическому действию TP31 превосходит PP17, что обусловлено его более эффективным связыванием с аллостерическим сайтом рецептора. Причиной этого является большее соответствие тиено-[2,3-*d*]пиримидиновых производных пространственной структуре этого сайта. В сравнении с TP31 и PP17, соединение PP10, производное пиримидо[4,5,6-*de*] [1, 6]нафтиридина, характеризуется низкой антагонистической актив-



ностью в отношении рецептора ЛГ и зависимого от него стероидогенеза. Наиболее активное соединение ТРЗ1 может быть использовано в качестве прототипа для создания препаратов, предназначенных для подавления стероидогенной функции при лечении рака предстательной железы и некоторых других гормонозависимых опухолей, а также для коррекции и предотвращения синдрома гиперстимуляции яичников.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). ЯМР-исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Магнитно-резонансные методы исследования», масс-спектры высокого разрешения получены на оборудовании ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., Potì F., Giva L.B., Marino M., Tagliavini S., Trenti T., Fanelli F., Mezzullo M., Pagotto U., Simoni M., Casarini L. 2017. Human LH and hCG stimulate differently the early signaling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **15** (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
- Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gallay N., Combarrous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A. 2017. Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* **7** (1), 940. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01078-8>
- Шпаков А.О. 2018. *Гонадотропины – от теории к клинической практике*. СПб.: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 347 с.
- van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R.G. 2009. Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum. Reprod.* **24** (3), 640–648. <https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
- Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. 2015. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 142. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
- Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S. 2014. The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenyl cyclase systems in the rat testes. *Dokl. Biochem. Biophys.* **456** (1), 104–107. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
- Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O. 2016. In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membr. Cell. Biol.* **10** (4), 294–300. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
- Derkach K.V., Legkodukh A.S., Dar'in D.V., Shpakov A.O. 2017. The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats. *Cell Tissue Biol.* **11** (1), 73–80. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17010035>
- Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. 2019. Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* **484** (1), 78–81. <https://doi.org/10.1134/S1607672919010216>
- Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepochkina A.M., Shpakov A.O. 2019. A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membr. Cell. Biol.* **13** (4), 301–309. <https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
- Xing W., Lin H., Li Y., Yang D., Wang W., Zhang Q. 2015. Is the GnRH antagonist protocol effective at preventing OHSS for potentially high responders undergoing IVF/ICSI? *PLoS One.* **10** (10), e0140286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140286>
- Morgante G., Massaro M.G., Di Sabatino A., Cappelli V., De Leo V. 2018. Therapeutic approach for metabolic disorders and infertility in women with PCOS. *Gynecol. Endocrinol.* **34** (1), 4–9. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1370644>
- Engel J.B., Schally A.V. 2007. Drug insight: Clinical use of agonists and antagonists of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3** (2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0399>
- Godbole A.M., Njar V.C. 2011. New insights into the androgen-targeted therapies and epigenetic therapies in prostate cancer. *Prostate Cancer.* 2011, **918707**. <https://doi.org/10.1155/2011/918707>
- Lizneva D., Gavrilova-Jordan L., Walker W., Azziz R. 2016. Androgen excess: Investigations and management. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **37**, 98–118. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.05.003>
- Heitman L.H., Narlawar R., de Vries H., Willemsen M.N., Wolfram D., Brussee J., Ijzerman A.P. 2009. Substituted terphenyl compounds as the first class of low molecular weight allosteric inhibitors of the luteinizing hormone receptor. *J. Med. Chem.* **52** (7), 2036–2042. <https://doi.org/10.1021/jm801561h>
- Heitman L.H., Kleinau G., Brussee J., Krause G., Ijzerman A.P. 2012. Determination of different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse drug-like low molecular weight ligands. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351** (2), 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.010>

18. Turcu A.F., Kumar S., Neumann S., Coenen M., Iyer S., Chiriboga P., Gershengorn M.C., Bahn R.S. 2013. A small molecule antagonist inhibits thyrotropin receptor antibody-induced orbital fibroblast functions involved in the pathogenesis of Graves ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98** (5), 2153–2159. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1149>
19. Neumann S., Nir E.A., Eliseeva E., Huang W., Marugan J., Xiao J., Dulcey A.E., Gershengorn M.C. 2014. A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. *Endocrinology.* **155** (1), 310–314. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1835>
20. Anderson R.C., Newton C.L., Millar R.P. 2019. Small molecule follicle-stimulating hormone receptor agonists and antagonists. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **9**, 757. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00757>
21. Bakulina O.Yu., Ivanov A.Yu., Dar'in D.V., Lobanov P.S. 2014. New transformations of 2-methylsulfanyl-4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde involving enamines: Synthesis of condensed azines. *Mendeleev Commun.* **24**, 163–164. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2014.04.013>
22. Ryazanov S.G., Selivanov S.I., Dar'in D.V., Lobanov P.S., Potekhin A.A. 2008. Chemoselective cyclocondensation of  $\alpha$ -acylacetamides with 2-methylsulfanyl-4,6-dichloropyrimidine-5-carbaldehyde. *Russ. J. Org. Chem.* **44** (2), 288–291.
23. Heitman L.H., Ijzerman A.P. 2008. G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: A case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med. Res. Rev.* **28** (6), 975–1011. <https://doi.org/10.1002/med.20129>
24. Neumann S., Eliseeva E., McCoy J.G., Napolitano G., Giuliani C., Monaco F., Huang W., Gershengorn M.C. 2011. A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96** (2), 548–554. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1935>
25. Marcinkowski P., Hoyer I., Specker E., Furkert J., Rutz C., Neuenschwander M., Sobottka S., Sun H., Nazare M., Berchner-Pfannschmidt U., von Kries J.P., Eckstein A., Schüle R., Krause G. 2019. A new highly thyrotropin receptor-selective small-molecule antagonist with potential for the treatment of Graves' orbitopathy. *Thyroid.* **29** (1), 111–123. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
26. Ayoub M.A., Yvinec R., Jégot G., Dias J.A., Poli S.M., Poupon A., Crépieux P., Reiter E. 2016. Profiling of FSHR negative allosteric modulators on LH/CGR reveals biased antagonism with implications in steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **436**, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.013>
27. Lindsley C.W., Emmitte K.A., Hopkins C.R., Bridges T.M., Gregory K.J., Niswender C.M., Conn P.J. 2016. Practical strategies and concepts in GPCR allosteric modulator discovery: Recent advances with metabotropic glutamate receptors. *Chem. Rev.* **116** (11), 6707–6741. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00656>
28. Foster D.J., Conn P.J. 2017. Allosteric modulation of GPCRs: New insights and potential utility for treatment of schizophrenia and other CNS disorders. *Neuron.* **94** (3), 431–446. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.016>

## Low-Molecular-Weight Ligands of Luteinizing Hormone Receptor with Antagonistic Activity

K. V. Derkach<sup>1</sup>, D. V. Dar'in<sup>2</sup>, A. O. Shpakov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 194223 Russia*

<sup>2</sup>*St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, 199034 Russia*

*\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru*

Currently, a search for selective antagonists of luteinizing hormone (LH) receptor, which are necessary to suppress steroidogenesis in hormone-dependent tumors and to prevent the ovarian hyperstimulation syndrome, is carried out. One approach to solving this problem is the development of low-molecular-weight antagonists of the allosteric site of this receptor located in its transmembrane domain. The aim of this work was to develop the heterocyclic compounds, the derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidine (TP31), pyrimido[4,5,6-*de*][1,6]naphthyridine (PP10), and pyrido[3,4-*d*]pyrimidine (PP17), and to study their ability to influence the functional activity of the LH receptor in the *in vitro* and *in vivo* conditions. It was shown that at micromolar concentrations TP31 suppressed stimulating effects of human chorionic gonadotropin (hCG) on the adenylyl cyclase activity in rat testicular membranes. Yet more pronounced was the suppressing effect of TP31 on the stimulating effect of TP03, an allosteric agonist of the LH receptor. This was due to a higher selectivity of the TP31 antagonist with respect to the cAMP-dependent signaling cascades, predominantly activated by TP03 and realized through G<sub>s</sub> proteins. PP17 inhibited stimulatory effects of hCG and TP03 on the adenylyl cyclase activity to a similar extent but was less potent than TP31. Upon intratesticular (10 mg/kg) or intraperitoneal (45 mg/kg) administration to male rats, TP31 and PP17 decreased the baseline plasma level of testosterone and inhibited the testosterone production stimulated by hCG (100 IU/rat); the inhibitory effect of

TP31 was much more pronounced than that of PP17. PP10 exhibited a weaker antagonistic activity than TP31 and PP17 in the *in vitro* and *in vivo* conditions. The data obtained indicate that TP31, the most active functional antagonist among the studied compounds, by binding to the allosteric site of the LH receptor, makes it less accessible to allosteric agonists and impairs the hormonal signal transduction through the LH receptor. This suggests the prospects of the development of TP31-based inhibitors of LH-dependent pathways and steroidogenesis.

**Keywords:** low-molecular-weight ligand, receptor of luteinizing hormone, antagonist, testosterone, chorionic gonadotropin