

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.17

НОВЫЕ ТИЕНОПИРИМИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ С АКТИВНОСТЬЮ ПОЛНЫХ И ИНВЕРСИОННЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© 2019 г. К. В. Деркач¹, А. А. Бахтюков¹, Д. В. Дарьин², Н. Э. Голованова², А. О. Шпаков^{1,*}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 21.12.2018 г.

После доработки 25.03.2019 г.

Принята к публикации 26.04.2019 г.

Ключевые слова: тиенопиримидин, агонист, инверсионный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, аденилатциклаза, тестостерон

DOI: 10.1134/S004445291905005X

Используемые в настоящее время в медицине препараты гонадотропинов имеют ряд существенных недостатков, которые приводят к развитию побочных эффектов и ограничивают применение гонадотропинов в клинике как стимуляторов стероидогенеза, сперматогенеза и фолликулогенеза. Среди таких недостатков — гиперактивация рецепторов лютеинизирующего гормона (ЛГ), вызывающая их даун-регуляцию и способствующая развитию резистентности к гонадотропинам, необходимость исключительно парентерального введения гонадотропинов, гетерогенность препаратов хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), широко используемого в репродуктологии гомолога ЛГ, при его выделении из мочи беременных женщин, а также значительные отличия структуры и активности рекомбинантных форм ЛГ и ХГЧ от их природных форм [1]. Ключевой причиной развития резистентности к гонадотропинам является активация сразу нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов. Так ЛГ и ХГЧ, наряду с аденилатциклизной системой, включающей гетеротримерный G_s -белок, ферменты аденилатциклазы (АЦ) и протеинкиназу А, и контролирующей стероидогенез в клетках Лейдига, активируют аррестиновые пути, через посредство которых осуществляется эндотоз рецептора ЛГ и его последующая деградация в протеосомах [1, 2]. На протяжении последних лет ведется разработка низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ, наибольший интерес среди которых представляют тиенопиримидиновые производные (ТП). Показано, что низкомолекулярные агонисты взаимодействуют с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ, расположенным в его трансмембранном канале, и активируют целевой сигнальный

каскад, в то время как значительные по размеру гонадотропины связываются с ортостерическим сайтом, расположенным во внеклеточном домене рецептора ЛГ [3, 4].

Преимуществами ТП является не только селективность их действия по отношению к внутриклеточным эффекторам, но также отсутствие заметного влияния на чувствительность клеток-мишеней к гонадотропинам и сохранение активности при пероральном введении [5, 6]. Наряду с полными агонистами, в клинике востребованы инверсионные агонисты рецептора ЛГ, способные подавлять стимулированную гонадотропинами активность рецептора ЛГ и тем самым предотвращать стимулирующее влияние гонадотропинов на гормон-зависимые опухоли [1, 4]. Ранее нами была синтезирована и изучена серия ТП с активностью полных агонистов рецептора ЛГ, которые активировали АЦ в тестикулярных мембранах и повышали продукцию тестостерона (Т) при различных способах введения самцам крыс [1, 5, 6]. Цель настоящей работы состояла в изучении активности трех новых ТП с активностью как полных (ТП34 и ТП35), так и инверсионных (ТП33) агонистов рецептора ЛГ, а также в оценке их эффекта на продукцию Т при внутрибрюшинном и пероральном способах введения самцам крыс.

Синтез *N*-(3-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d'*]пиримидин-4-ил)фенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид (ТП33), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-(2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)ацетамидо)фенил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d'*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП34) и 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилсульфанил)-4-(3-(2-этоксиникотинамидо)фе-

нил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП35) проводили с помощью реакции ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид. Целевые продукты характеризовали с помощью масс-спектрометрического анализа, для чего использовали масс-спектрометр Bruker micrOTOF (ESI): ТР33 – HRMS m/z $[M+H]^+$ вычислено для $C_{23}H_{25}N_6O_3S_2^+$ 497.1424, найдено 497.1433; ТР34 – HRMS m/z $[M+H]^+$ вычислено для $C_{24}H_{25}N_7NaO_4S_2^+$ 562.1302, найдено 562.1278; ТР35 – HRMS m/z $[M+H]^+$ вычислено для $C_{26}H_{29}N_6O_3S_2^+$ 537.1737, найдено 537.1710.

В экспериментах использовали трехмесячных самцов крыс Wistar, все процедуры выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. При изучении активности ТП в условиях *in vitro* осуществляли выделение тестикулярных мембран из семенников крыс и оценивали в них активность АЦ, как описано ранее [5]. Для этого крыс декапитировали под наркозом, забирали у них ткани семенников, измельчали их и гомогенизировали при +4°C в 40 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.5), содержащем 5 мМ $MgCl_2$, 10% сахарозу и ингибиторы протеаз. Гомогенат центрифугировали при 1500 *g* в течение 10 мин, супернатант центрифугировали при 20000 *g* в течение 30 мин, осадок ресуспендировали в буфере без сахарозы и повторно центрифугировали при 20000 *g* в течение 30 мин. Полученные мембраны ресуспендировали в том же буфере и использовали для определения АЦ.

Ферментативную реакцию проводили в смеси, которая содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы (Sigma, США), 37 кБк $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{АТФ}$ и 50–100 мкг мембранного белка. Инкубацию проводили в течение 12 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.5 М HCl. Образовавшийся в ходе реакции $[\text{}^{32}P]\text{цАМФ}$ отделяли от меченого субстрата, используя адсорбционную хроматографию на нейтральной окиси алюминия. Радиоактивность измеряли на счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (LKB, Швеция). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. ТП растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и преинкубировали с тестикулярными мембранами (4°C, 5 мин), после чего добавляли инкубационную смесь. Контрольные пробы преинкубировали с раствором ДМСО без ТП. В экспериментах использовали креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, АТФ, цАМФ и другие реактивы фирмы “Sigma” (США), а также $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{-АТФ}$

(“ОАО Всерегиональное объединение Изотоп”, Россия).

В экспериментах *in vivo* ТП вводили однократно в ДМСО, в/б или перорально, в дозах 25 и 50 мг/кг соответственно, ХГЧ – однократно, п/к, в дозе 50 МЕ/крысу. Контрольным крысам вместо препаратов вводили раствор ДМСО. Для оценки базального уровня Т кровь забирали в течение 6 ч (в 10.00, 12.00, 14.00 и 16.00). Для оценки уровня Т, стимулированного ТП и(или) ХГЧ (“Московский эндокринологический завод”, Россия), уровень Т измеряли до введения препаратов (10.00) и через 1, 3 и 5 ч после их введения (препараты вводили в 11.00). Для оценки влияния ТП на стероидогенный эффект ХГЧ низкомолекулярный агонист вводили в/б в дозе 25 мг/кг в 10.40, и спустя 20 мин (11.00) п/к вводили ХГЧ в дозе 50 МЕ/крысу. Уровень Т в крови крыс, взятой из хвостовой вены, определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (Алкор-Био, Россия).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007” (надстройки “AtteStat 12.5” и “Daniel’s XL Toolbox 6.52”). Данные представляли как среднее значение $\pm$ SD. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Данные, не удовлетворяющие критериям нормального распределения, обрабатывали с применением *U*-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

Соединения ТП34 и ТП35 в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-3} М повышали базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс, причем в концентрации 10^{-4} М их стимулирующий эффект составил 164 и 122% соответственно (табл. 1). Рассчитанные на основе кривых “доза-эффект” значения EC_{50} для стимулирующих АЦ эффектов соединений ТП34 и ТП35 составили 1.61 и 2.87 мкМ. Соединение ТП33 не влияло на базальную активность АЦ. После преинкубации мембран с 10^{-5} М ТП34 и ТП35 стимулирующий эффект 10^{-10} М ХГЧ усиливался, что указывает на частичную аддитивность эффектов ХГЧ и ТП, в то время как при обработке мембран ХГЧ в более высокой концентрации 10^{-8} М стимулирующий эффект гонадотропина сохранялся, но его усиления отмечено не было (табл. 1). Усиление эффекта ХГЧ в присутствии ТП34 и ТП35 было обусловлено различиями локализации в рецепторе ЛГ ортостерического сайта, с которым связывается значительная по размеру молекула ХГЧ, и аллостерического сайта, с которым связываются низкомолекулярные лиганды.

Таблица 1. Прирост активности АЦ в тестикулярных мембранах крысы при действии ТП34 и ТП35 и совместно ТП и ХГЧ (пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка, $M \pm SD$, $n = 6$)

Концентрация ТП	ТП34	ТП35
ТП, 10^{-8} М	1.6 ± 0.9	—
ТП, 10^{-7} М	4.8 ± 1.2	2.2 ± 1.3
ТП, 10^{-6} М	12.2 ± 1.0	6.3 ± 1.1
ТП, 10^{-5} М	30.1 ± 1.8	19.7 ± 1.4
ТП, 10^{-4} М	35.5 ± 1.9	26.4 ± 2.2
ТП, 10^{-3} М	34.0 ± 1.9	28.0 ± 0.8
ТП, 10^{-4} М + ХГЧ, 10^{-10} М	61 ± 3	60 ± 4
ТП, 10^{-4} М + ХГЧ, 10^{-8} М	153 ± 3	157 ± 10

Примечание: Базальная активность АЦ составила 21.7 ± 1.8 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Приросты активности АЦ, вызванные ХГЧ в концентрациях 10^{-10} и 10^{-8} М, составили 45 ± 3 и 151 ± 7 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка.

Изучение влияния ТП33 на стимулирующий АЦ эффект ХГЧ показало, что в мембранах, преинкубированных с 10^{-5} М ТП33, стимуляция АЦ 10^{-10} и 10^{-8} М ХГЧ снижалась на 76 и 87% в сравнении с таковой в контрольных мембранах. Эти данные свидетельствуют о присущей ТП33 активности инверсионного агониста, который, связываясь с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ, препятствует стабилизации его активированного состояния, вызываемого связыванием гонадотропина с эктодомом рецептора.

При внутрибрюшинном введении самцам крыс ТП34 и ТП35 уровень Т повышался с одинаковой эффективностью, на что указывают значения $AUC_{10.00-16.00}$, представляющие собой интегрированную площадь под кривой зависимости “концентрация Т (нМ)—время(ч)”, которые составили 178 ± 35 и 164 ± 46 усл. ед. соответственно против 86 ± 29 усл. ед. в контроле ($p < 0.05$) (табл. 2). При пероральном введении стероидогенный эффект ТП34 был выше, чем у ТП35, что иллюстрируют более высокие значения $AUC_{10.00-16.00}$ у крыс, обработанных ТП34 (157 ± 21 и 124 ± 19 усл. ед., $p < 0.05$), (табл. 2). Стероидогенный эффект ХГЧ при его введении крысам, которым предварительно внутрибрюшинно вводили ТП34 и ТП35, сохранялся (данные не представлены). При изучении соединения ТП33 было показано, что при обоих способах введения самцам крыс оно не влияло на уровень Т. В то же время, предварительная обработка крыс с помощью ТП33 приводила к значительному снижению стимулирующего эффекта ХГЧ на продукцию Т, о чем свидетельствует достоверное снижение значений $AUC_{10.00-16.00}$ (416 ± 75 и 267 ± 37 усл. ед., $p < 0.05$) (табл. 2). Отмечено не только ослабление стероидогенного эффекта ХГЧ, но и изменение формы кривой. Так, через 5 ч ингибирующий эффект ТП33 на ХГЧ-индуцированную продукцию Т ослаблялся, что, как мы полагаем, обусловлено диссоциацией ТП33 из комплекса с рецептором и выведением этого ТП из организма. В этой связи необходимо отметить, что время полувыведения ТП, как правило, существенно меньше, чем таковое для ХГЧ и других гонадотропинов [7].

Таблица 2. Влияние внутрибрюшинного и перорального введения ТП на уровень Т в крови самцов крыс, а также вызываемое ТП33 ингибирование стероидогенного эффекта ХГЧ

Время суток	Уровень тестостерона в крови крыс (нмоль/л), $M \pm SD$			
	10.00	12.00	14.00	16.00
Внутрибрюшинное введение				
Контроль (ДМСО)	8.1 ± 3.3	14.7 ± 5.4	16.9 ± 7.6	15.1 ± 5.6
ТП33, 25 мг/кг	10.4 ± 3.3	17.4 ± 6.7	15.4 ± 7.5	13.4 ± 5.1
ТП34, 25 мг/кг	10.3 ± 3.2	$26.5 \pm 5.5^*$	$39.9 \pm 8.9^*$	$35.2 \pm 7.7^*$
ТП35, 25 мг/кг	8.2 ± 3.5	22.2 ± 8.3	$37.5 \pm 10.3^*$	$36.3 \pm 8.0^*$
ХГЧ, 50 МЕ/крысу	7.7 ± 2.8	$55.7 \pm 14.8^*$	$102.3 \pm 21.1^*$	$92.4 \pm 17.6^*$
ХГЧ, 50 МЕ/крысу + ТП33, 25 мг/кг	11.8 ± 3.7	$31.9 \pm 8.2^{* \#}$	$60.4 \pm 13.8^{* \#}$	$70.3 \pm 12.6^{* \#}$
Пероральное введение				
Контроль (ДМСО)	11.5 ± 2.8	17.7 ± 5.3	17.3 ± 5.1	13.3 ± 3.1
ТП33, 50 мг/кг	9.7 ± 3.3	15.4 ± 5.2	15.3 ± 7.2	14.0 ± 5.3
ТП34, 50 мг/кг	10.2 ± 4.4	22.6 ± 4.4	$33.2 \pm 4.9^*$	$35.0 \pm 3.8^*$
ТП35, 50 мг/кг	9.2 ± 2.1	20.1 ± 5.1	24.7 ± 5.8	$25.3 \pm 4.4^*$

Примечание: Все ТП вводили крысам в 11.00. Различия между контролем и группами крыс, которым вводили ТП34, ТП35 и ХГЧ (*), и между группами крыс, которым вводили ХГЧ и совместно ТП33+ХГЧ ($\#$), достоверны при $p < 0.05$.

Таким образом, нами разработаны новые низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, производные тиенопиримидинов, которые активны как *in vitro*, так и *in vivo*, усиливая стероидогенез в клетках Лейдига и в значительной степени повышая уровень Т в крови самцов крыс. Разработан инверсионный агонист рецептора ЛГ, ингибирующий стимулирующий эффект ХГЧ на аденилатциклязную систему в тестикулярных мембранах и подавляющий стероидогенный эффект ХГЧ при их совместном введении крысам. Разработанные соединения могут стать прототипами лекарственных препаратов, предназначенных для регуляции зависимых от ЛГ репродуктивных функций. Поскольку рецепторы ЛГ и их аллостерические сайты высоко консервативны в эволюции позвоночных животных, то разработанные низкомолекулярные лиганды рецептора ЛГ могут оказывать стимулирующее влияние на стероидогенез, сперматогенез и фолликулогенез у крупного рогатого скота, лошадей, свиней и птиц, что открывает широкие перспективы для их применения в животноводстве и в селекции домашних животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-04-00126) и частично госзадания (№ АААА-А18-118012290427-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шпак А.О. Регуляция и молекулярные механизмы функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. СПб: Изд-во Политехнического университета. 2017. [Shpakov A.O. Regulatsiya i molekulyarnye mekhanizmy funkcionirovaniya gipotalamo-gipofizarno-gonadnoj osi. [Regulation and molecular mechanisms of the functioning hypothalamic-pituitary-gonadal axis]. SPb.: Izd-vo Politekhicheskogo universiteta. 2017 (in Russ)].
2. 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. Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15 (1): 2. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
3. Anderson R.C., Newton C.L., Anderson R.A., Millar R.P. Gonadotropins and their analogs: Current and potential clinical applications. *Endocr. Rev.* 39 (6): 911–937. 2018. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00052>
4. Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6: 142 2015. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
5. Derkach K.V., Bakhtuykov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor. *Cell Tissue Biol.* 11 (6): 475–482. 2017. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17060037>
6. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtuykov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O. *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: Membrane and Cell Biology.* 10 (4): 294–300. 2016. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
7. van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., Timmers C.M., Mulders S.M., Hanssen R.G. Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology.* 152 (11): 4350–4357. 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>

Novel Thienopyrimidine Derivatives with an Activity of Full and Inverse Agonists of the Luteinizing Hormone Receptor

K. V. Derkach^a, A. A. Bakhtuykov^a, D. V. Dar'in^b, N. E. Golovanova^b, and A. O. Shpakov^{a,*}

^a Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: alex_shpakov@list.ru