

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, 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 аденилатциклазной системой, включающей гетеротримерный G_s-белок, ферменты аденилатциклазу (АЦ) и протеинкиназу А, и контролирующей стероидогенез в клетках Лейдига, активируют аррестиновые пути, через посредство которых осуществляется эндцитоз 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-(*m*ре*m*-бутилкарбамоил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)-2-метилоксазол-4-карбоксамид (ТП33), 5-амино-*N*-(*m*ре*m*-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*-(*m*ре*m*-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*-(*m*рет-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/ЕЕС) 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 (рН 7.5), содержащем 5 мМ MgCl₂, 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 (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы (Sigma, США), 37 кБк [α -³²P]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 [³²P]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 [α -³²P]-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 EC₅₀ 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 эктодоменом 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 высококонсервативны 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. *Шпаков А.О.* Регуляция и молекулярные механизмы функционирования гипоталамо-гипофизарно-го-

надной оси. СПб: Изд-во Политехнического университета. 2017. [*Shpakov A.O.* Regulaciya i molekulyarnye mekhanizmy funkcionirovaniya gipotalamo-gipofizarno-gonadnoj osi. [Regulation and molecular mechanisms of the functioning hypothalamic-pituitary-gonadal axis]. SPb.: Izd-vo Politekhničeskogo universiteta. 2017 (in Russ)].

2. *Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., Poti 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., Bakhtyukov 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., Bakhtyukov 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. Bakhtyukov^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*