

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**РАЗРАБОТКА ПОЗИТИВНЫХ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ  
РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ОСНОВЕ  
ТИЕНО[2,3-d]-ПИРИМИДИНОВОЙ СТРУКТУРЫ  
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС У КРЫС**

© 2025 г. К. В. Деркач<sup>1,\*</sup>, А. С. Печальнова<sup>1</sup>, И. Р. Назаров<sup>1</sup>, Е. А. Диденко<sup>1,2</sup>,  
В. Н. Сорокоумов<sup>1,2</sup>, А. О. Шпаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [derkatch\\_k@list.ru](mailto:derkatch_k@list.ru)

Поступила в редакцию 18.02.2025 г.

После доработки 28.02.2025 г.

Принята к публикации 04.03.2025 г.

Уровни тиреотропного гормона (ТТГ) при гипотиреозе аутоиммунной природы или вызванном инактивирующими мутациями в рецепторе ТТГ находятся в пределах нормы или повышены, что обусловлено усилением стимулированной тиротриберинном (ТРГ) продукции ТТГ в условиях дефицита тиреоидных гормонов (ТГ). Основной причиной гипотиреоза является ослабление ответа щитовидной железы на ТТГ. Это требует разработки подходов, направленных на повышение чувствительности тироцитов к ТТГ. Одним из них является применение положительных аллостерических модуляторов (ПАМ) рецептора ТТГ, усиливающих эффекты ТТГ на продукцию ТГ. Однако в настоящее время такие ПАМ отсутствуют. Цели настоящей работы – синтез новых тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных ТРУоx и ТРУmp с активностью ПАМ рецептора ТТГ и изучение их эффектов на базовые и стимулированные ТРГ концентрации ТГ в крови и экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ, в щитовидной железе крыс. При введении крысам ТРУоx и ТРУmp (20 мг/кг) слабо влияли на концентрации ТГ в крови и экспрессию генов синтеза ТГ, за исключением повышения концентрации tT3 и экспрессии гена *Dio2*, кодирующего дейодиназу 2-го типа, при использовании ТРУmp. В то же время, несмотря на отсутствие различий с контролем, в группе с обработкой ТРУоx снижались в сравнении с крысами, обработанными ТРУmp, концентрации ТГ в крови и экспрессия генов *Tg*, *Tpo*, *Dio2* и *Tshr*, что, как мы полагаем, обусловлено высокой реакционной способностью оксиганового цикла в ТРУоx и его ингибирующим влиянием на компоненты тиреоидной системы в щитовидной железе. Предварительная обработка крыс ТРУоx и ТРУmp сохраняла стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации ТГ и экспрессию тиреоидальных генов, а в ряде случаев их значимо усиливала. Однако динамика и выраженность потенцирующего влияния ТРУоx и ТРУmp различались. ТРУоx потенцировал стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации tT4, fT3 и tT3 в крови через 1.5 ч после обработки ТРГ, в то время как ТРУmp усиливал стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации fT3 и tT3 через 3 ч, когда потенцирующее влияние ТРУоx уже исчезало. В щитовидной железе ТРУоx усиливал ТРГ-индуцированную экспрессию гена *Tpo*, в то время как ТРУmp – экспрессию генов *Dio2* и *Nis*. На основании получен-

ных данных сделан вывод, что наиболее перспективным препаратом для повышения ответа рецептора ТТГ на эндогенный ТТГ является ТРУпр, 5-амино-N-(трет-бутил)-4-{4-[3-(2-гидрокси-3-морфолинопропокси)про-1-ин-1-ил]фенил}-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид, созданный нами первый функционально активный ПАМ рецептора ТТГ.

*Ключевые слова:* рецептор тиреотропного гормона, аллостерический модулятор, тиреоидный гормон, тиено[2,3-d]-пиримидин, тиролиберин, дейодиназа 2-го типа, тиреоидная система

**DOI:** 10.31857/S0869813925050074, **EDN:** TNRVNF

## ВВЕДЕНИЕ

Дефицит тиреоидных гормонов (ТГ) у взрослых пациентов приводит к развитию микседемы и широкому спектру функциональных нарушений со стороны различных систем организма, а в детском возрасте вызывает задержку умственного и физического развития [1, 2]. У взрослых наиболее распространенной причиной гипотиреоза является ослабление синтеза ТГ в тироцитах, что, как правило, обусловлено дефицитом йода и аутоиммунными процессами, которые приводят к выработке аутоантител на рецептор тиреотропного гормона (ТТГ) и основные компоненты синтеза ТГ в щитовидной железе (ЩЖ) и тем самым ингибируют синтез ТГ. В детском возрасте причинами тиреоидного дефицита могут быть нарушения в гипоталамических и гипофизарных звеньях тиреоидной оси. Для лечения гипотиреоза обычно используют заместительную терапию препаратами ТГ – левотироксином и лиотиронином или их комбинациями [3]. Однако такая терапия не всегда эффективна и сопровождается серьезными побочными эффектами, среди которых нарушение сердечного ритма и остеопороз [4, 5]. Другим направлением терапии гипотиреоза может быть применение тиромиметиков – селективных агонистов ядерных тиреоидных рецепторов  $\beta$ -типа, которые в меньшей степени, чем тиреоидные рецепторы  $\alpha$ -типа, вовлечены в развитие аритмий и дисфункций опорно-двигательного аппарата [6]. Однако и в этом случае имеются существенные ограничения, обусловленные отсутствием у  $\beta$ -селективных тиромиметиков способности активировать тиреоидные рецепторы  $\alpha$ -типа [6, 7]. Эндогенные стимуляторы продукции ТГ – тиролиберин, релизинг-фактор ТТГ (ТРГ) и ТТГ для лечения гипотиреоза в клинике используются крайне ограниченно, в основном в диагностических целях. Важно отметить, что продукция ТРГ и ТТГ при наиболее распространенном аутоиммунном гипотиреозе или гипотиреозе, вызванном инактивирующими мутациями в рецепторе ТТГ, находится в пределах нормы или повышена, что обусловлено запуском отрицательных обратных связей, приводящих к усилению продукции ТРГ и ТТГ в условиях дефицита ТГ. Причиной гипотиреоза в этом случае является ослабление функционального ответа щитовидной железы (ЩЖ) на эндогенный ТТГ, что требует разработки подходов, направленных на повышение чувствительности тироцитов к этому гормону [8–10].

Одним из перспективных подходов для повышения ответа тироцитов на ТТГ и нормализацию тиреоидного статуса при гипотиреозе является применение положительных аллостерических модуляторов (ПАМ) рецептора ТТГ, которые, не оказывая значимых эффектов на базовые показатели тиреоидного статуса, усиливают стимулирующее воздействие ТТГ на продукцию ТГ [11–13]. Рецептор ТТГ, относящийся к семейству G-белок-сопряженных рецепторов, функционально взаимодействует с различными типами гетеротримерных G-белков и  $\beta$ -аррестинов. Структурно он включает внеклеточный домен, в котором локализован ортостерический сайт для высокоаффинного свя-

звания как ТТГ, так и аутоантител к рецептору ТТГ [14], а также трансмембранный тоннель, образованный семью пронизывающими мембрану гидрофобными участками, через который ТТГ-индуцированный сигнал передается на G-белки и эффекторные компоненты клетки-мишени [15, 16]. Среди аллостерических регуляторов рецептора ТТГ наибольший интерес представляют гидрофобные низкомолекулярные соединения, в том числе тиено[2,3-*d*]-пиримидиновые производные (ТП), способные проникать в трансмембранный тоннель рецептора и специфично связываться с локализованным там аллостерическим сайтом. Поскольку ортостерический и аллостерический сайты пространственно разделены, связывание низкомолекулярных регуляторов с аллостерическим сайтом не нарушает связывания ТТГ с ортостерическим сайтом [17, 19]. В то же время аллостерические регуляторы индуцируют конформационные изменения в трансмембранном тоннеле, влияя на передачу через него гормонального сигнала к G-белкам и  $\beta$ -аррестинам и тем самым модифицируя эффекты ТТГ на внутриклеточные мишени [19].

Ранее нами были разработаны ТП (ТР48, ТРУ1, ТРУ5) с активностью аллостерических антагонистов и инверсионных агонистов рецептора ТТГ, снижающие стимулированную ТРГ и (или) базовую продукцию ТГ [20–22], а также ТП (ТРУ3m, ТРУ7) с активностью аллостерических прямых агонистов, стимулирующих рецептор ТТГ при сохранении или небольшом усилении эффекта ТРГ [23–25]. Другими авторами были разработаны аллостерические агонисты и антагонисты рецептора ТТГ на основе как ТП [26, 27], так и других гетероциклических соединений [17, 18, 27–29]. Однако до настоящего времени был описан лишь один ПАМ для рецептора ТТГ (NCGC00379308), селективный в отношении  $\beta$ -аррестиновых каскадов, способный потенцировать ТТГ-индуцированную стимуляцию дифференцировки остеобластов и предотвращать остеопороз, но не активный в отношении G-белков и регуляции синтеза ТГ [30]. Соответственно, целями работы были синтез и физико-химическая характеристика новых ТП, ТРУох и ТРУmp, наделенных активностью ПАМ рецептора ТТГ, и изучение их эффектов на стимуляцию продукции ТГ с помощью ТТГ, секретируемого в ответ на обработку крыс ТРГ. Исследовали влияние ТРУох и ТРУmp на базовые и стимулированные ТРГ концентрации ТГ в крови и на экспрессию тиреоидных генов, вовлеченных в синтез ТГ.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Синтез и физико-химическая характеристика соединений ТРУох и ТРУmp*

Синтез ТРУох, 5-амино-N-(трет-бутил)-2-(метилтио)-4-{4-[3-(оксиран-2-илметокси)проп-1-ин-1-ил]фенил}тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид осуществляли путем взаимодействия 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-иодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (1.4 ммоль) с 2-[(проп-2-ин-1-илокси)метил]оксираном (1.6 ммоль) в диметилформамиде (15 мл) в присутствии трифенилфосфина ( $\text{PPh}_3$ , (5%),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (3%),  $\text{CuI}$  (10%) и триэтиламина (3 мл) в атмосфере аргона при комнатной температуре (рис. 1а). Продукт экстрагировали с помощью этилацетата, последовательно промывали водой и насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , после чего растворитель упаривали, а целевой продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле в системе этилацетат–гексан 1 : 3 с добавлением 3% (по объему) триэтиламина. Выход продукта составил 43%. Для наработки необходимых количеств ТРУох осуществляли масштабирование представленной выше методики синтеза.

Получены следующие спектры протонного и  $^{13}\text{C}$ -ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и данные масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) для соединения ТРУох: (1)  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.59 (s, 4H), 5.90 (s, 2H), 5.23 (s, 1H), 4.47 (dd, 2H), 3.91 (dd,  $J = 11.3, 3.1$  Hz, 1H), 3.56 (dd,  $J = 11.3, 5.8$  Hz, 1H), 3.22 (m, 1H),

2.83 (dd,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 2.67 (dd,  $J = 5.0, 2.7$  Hz, 1H), 2.63 (s, 3H), 1.44 (s, 9H); (2)  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.89, 167.56, 165.09, 161.79, 144.53, 136.36, 132.21, 129.19, 125.04, 117.77, 97.25, 87.26, 85.80, 70.72, 59.33, 52.25, 50.69, 44.43, 29.22, 14.56; (3) HRMS (ESI+, 100 V, MeOH), найдено  $m/z$  483.1515  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; вычислено для  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2^+$  483.1519.

Синтез ТРУмр, 5-амино-*N*-(трет-бутил)-4-{4-[3-(2-гидрокси-3-морфолинопрокси)про-1-ин-1-ил]фенил}-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид осуществляли путем взаимодействия 5-амино-4-(4-бромфенил)-*N*-(трет-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (0.27 ммоль) с 1-морфолино-3-(про-2-ин-1-илокси)пропан-2-олом (0.44 ммоль) в тетрагидрофуране (3 мл) в присутствии  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (5%),  $\text{CuI}$  (10%),  $\text{PPh}_3$  (20%) и триэтиламина (1 мл) в атмосфере аргона при 45 °С (рис. 1б). Полученный продукт экстрагировали с помощью дихлорметана, промывали насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , водой и затем насыщенным раствором  $\text{NaCl}$ , после чего растворитель упаривали. Очистку целевого соединения осуществляли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле сначала в системе растворителей этилацетат–гексан 1 : 2, затем в системе этилацетат–метанол 12 : 1. Выход продукта составил 63%. Для наработки необходимых количеств ТРУмр представленную выше методику синтеза масштабировали.

Получены следующие спектры протонного и  $^{13}\text{C}$ -ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и данные масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS) для соединения ТРУмр: (1)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.59 (s, 4H), 5.91 (s, 2H), 5.23 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.00–3.93 (m, 1H), 3.76–3.66 (m, 5H), 3.60 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.70–2.39 (m, 7H), 1.44 (s, 9H); (2)  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.89, 167.56, 165.09, 161.79, 144.53, 136.33, 132.20, 129.19, 125.11, 117.77, 97.25, 87.52, 85.69, 72.46, 67.11, 65.99, 61.16, 59.57, 53.86, 52.26, 29.23, 14.58; (3) HRMS (ESI+, 100 V, MeOH), найдено  $m/z$  570.2196  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; вычислено для  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2^+$  570.2203.

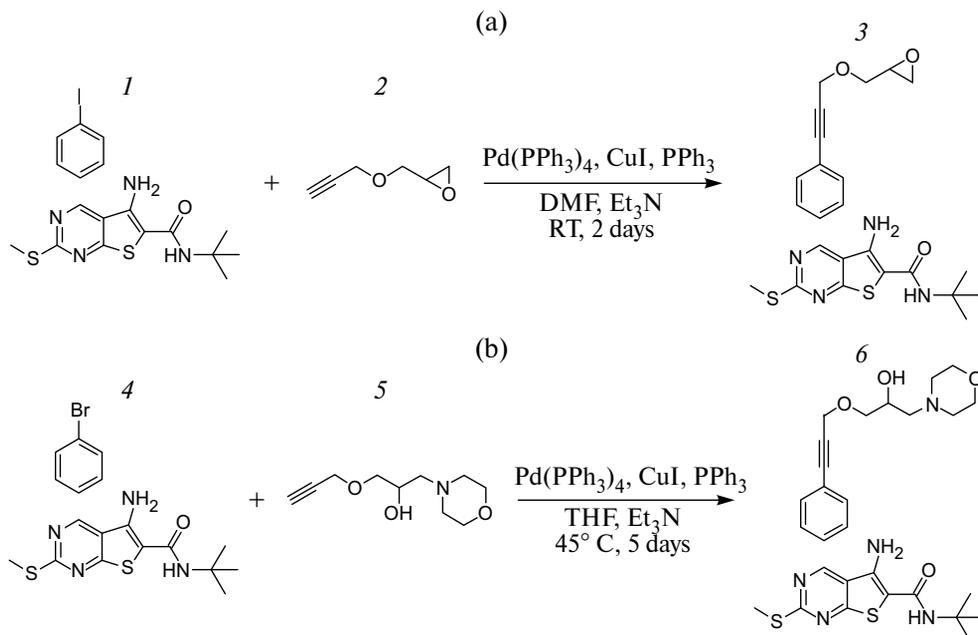
Масс-спектры высокого разрешения были записаны с использованием спектрометра Bruker micrOTOF (Bruker, Германия). Спектры ЯМР были получены с использованием спектрометра Bruker Advance III 400 (400.13 МГц для  $^1\text{H}$ -ЯМР и 100.61 МГц для  $^{13}\text{C}$ -ЯМР) (Bruker) в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-*d*6).

Для экспериментов были использованы половозрелые самцы крыс в возрасте 3–4 месяцев. Перед началом экспериментов животные в течение недели проходили акклиматизацию. В этот период и в дальнейшем в ходе экспериментов их содержали на стандартной диете (гранулированный сухой корм) со свободным доступом к пище и воде, по шесть животных в клетках площадью 0.24 м<sup>2</sup>, при режиме освещения 12 ч день /12 ч ночь и температуре в диапазоне 21–24 °С.

Для оценки концентраций ТГ и ТТГ кровь отбирали из хвостовой вены крыс под местным наркозом, для чего животным вводили 2%-ный раствор лидокаина в дозе 2–4 мг/кг, и в дальнейшем из крови выделяли сыворотку. В конце эксперимента крыс декапитировали под общим наркозом хлоральгидратом (400 мг/кг, внутривенно) и забирали ЩЖ для оценки в ее ткани экспрессии целевых генов.

#### Определение концентрации гормонов и тиролибериновый тест

Для определения концентраций свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT4) трийодтиронина в сыворотке крови крыс методом ИФА использовали наборы фирмы “Иммунотех” (Россия). Концентрацию ТТГ в сыворотке крови определяли с помощью набора ELISA for Rat Thyroid Stimulating Hormone (TSH) (Cloud-Clone Corp., США). Для оценки ответа ЩЖ на стимулирующее воздействие ТТГ проводили тест с тиролиберином (ТРГ), рилизинг-гормоном ТТГ, для чего животным интраназально вводили ТРГ (Sigma, США) в дозе 300 мкг/кг (в физиологическом растворе), как описано ранее [31].



**Рис. 1.** Схема синтеза тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных ТРУох (а) и ТРУмр (б). Обозначения на рисунке: 1 – 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(4-иодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид; 2 – 2-[(проп-2-ин-1-илокси)метил]оксиран; 3 – 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-{4-[3-(оксиран-2-илметокси)проп-1-ин-1-ил]фенил}тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТРУох); 4 – 5-амино-4-(4-бромфенил)-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид; 5 – 1-морфолино-3-(про-2-ин-1-илокси)пропан-2-ол; 6 – 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-{4-[3-(2-гидрокси-3-морфолинопропокси)про-1-ин-1-ил]фенил}-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТРУмр). Сокращения: PPh<sub>3</sub> – трифенилфосфин; Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> – тетракис(трифенилфосфин) палладий; CuI – иодид меди (I); DMF – диметилформамид; THF – тетрагидрофуран; Et<sub>3</sub>N – триэтиламин; RT – комнатная температура.

### *Оценка влияния ТРУох и ТРУмр на базовые и стимулированные ТРГ концентрации тиреоидных гормонов и ТТГ в крови крыс*

Основываясь на результатах предварительных экспериментов, для исследования влияния соединений ТРУох и ТРУмр на базовые и ТРГ-стимулированные концентрации fT3 у крыс использовали дозу 20 мг/кг массы тела, растворяя эти соединения в 300 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Контрольной группе вместо ТРУох и ТРУмр внутривентриально вводили 300 мкл ДМСО. Согласно ранее полученным результатам, этот объем ДМСО не оказывает значимого влияния на функционирование тиреоидной системы и на концентрации ТГ и ТТГ в крови.

Для экспериментов формировали шесть групп, в каждой по шесть крыс: контроль, получавший вместо препаратов их растворители (группа Control); крысы с интраназальным введением ТРГ в дозе 300 мкг/кг (группа TRN); крысы с внутривентриальным введением ТРУох или ТРУмр в дозе 20 мг/кг (группы ТРУох и ТРУмр); крысы с введением ТРУох или ТРУмр и затем ТРГ в тех же дозах (группы ТРУох+TRN и ТРУмр+TRN). В группах с совместным введением ТП вводили за 30 мин до введения ТРГ, чтобы обеспечить эффективное распределение ТП в ЩЖ и их связывание с рецептором ТТГ. Концентрации ТГ в крови оценивали через 2 и 3.5 ч после введения ТП или ДМСО (и через 1.5 и 3 ч после введения ТРГ или физиологического раствора).

*Оценка экспрессии генов в ткани щитовидной железы крыс*

После декапитации крыс под общим наркозом (хлоральгидрат, 400 мг/кг), через 3.5 ч после введения ТП или его растворителя, осуществляли забор тканей ЩЖ, после чего из них выделяли общую РНК и получали кодирующую ДНК с помощью реакции обратной транскрипции, используя наборы ExtractRNA и MMLV RT Kit производства фирмы “Евроген” (Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., США) в смеси, содержащей кДНК, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реагент qPCR-HS SYBR+Low ROX (“Евроген”), как описано ранее [22]. Для оценки экспрессии тироидальных генов использовали последовательности прямого и обратного праймеров: (1) для гена тироглобулина (*Tg*) – GCCCTAACTCATCCGTCCA (Forward) и TGTTGATAAGCCCATCGTCCT (Reverse); (2) для гена тиреопероксидазы (*Tpo*) – TTGGATCTGGCATCACTGAACTT (Forward) и ATCTTGTGACCATGCTTCTGTTG (Reverse); (3) для гена Na/I-симпортера (*Nis*) – AAGTGACCGGGTTGGACATC (Forward) и AGCCAACGAGCATTACCACA (Reverse); (4) для гена дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) – CGTCATCCTCAAGTGTCCCT (Forward) и TGGTACGCGCACATTACCTT (Reverse); (5) для гена дейодиназы 3-го типа (*Dio3*) – GCCCGTTGGTGCTCAATTTT (Forward) и CTGTGGGATGACGTAGGGTG (Reverse); (6) для гена рецептора ТТГ (*Tshr*) – CTCGGACAAGACATGAGCCC (Forward) и GGTCCAGGGACTTGCTCAAA (Reverse). В качестве референсных генов использовали гены β-актина (For: CTGGCACCACCTTCTACA; Rev: AGGTCTCAAACATGATCTGGGT) и 18S-рРНК (For: GGACACGGACAGGATTGACA; Rev: ACCCACGGAATCGAGAAAGA). Данные рассчитывали с использованием метода  $\Delta\Delta C_t$ , а также [32], относя значения экспрессии гена к таковой в контрольной группе, принятой за 1.0.

*Статистический анализ*

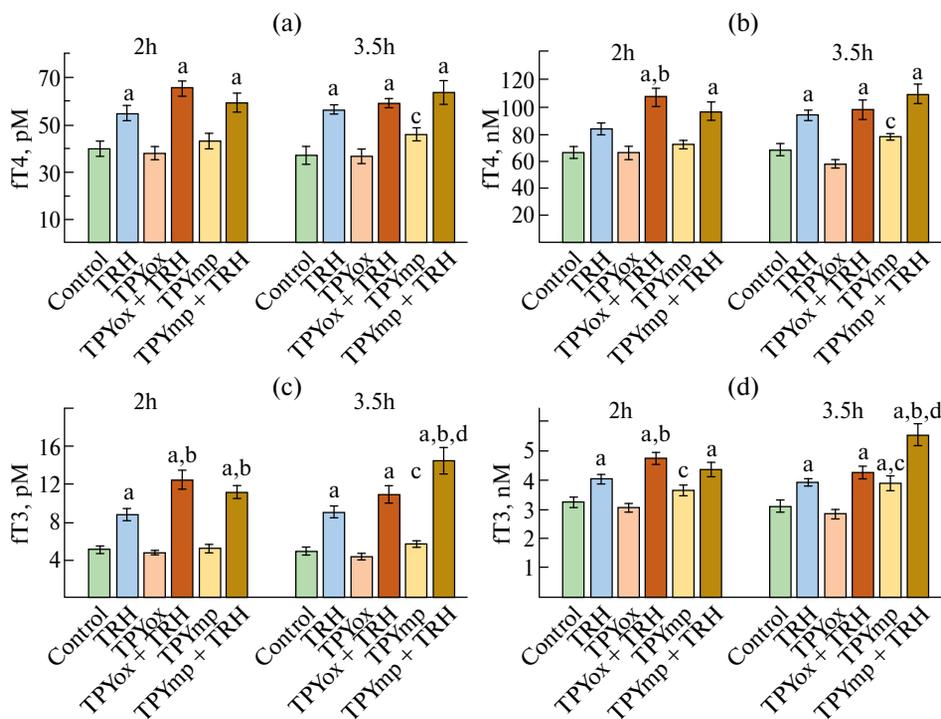
Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения IBM Spss Statistics 20. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка, равенство дисперсий – с помощью теста Левена. Для данных с ненормальным распределением сравнения между группами проводили с помощью Н-теста Краскела–Уоллиса, затем попарные сравнения проводили с помощью U-теста Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25%; 75%). В условиях нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест Тьюки. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Все различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

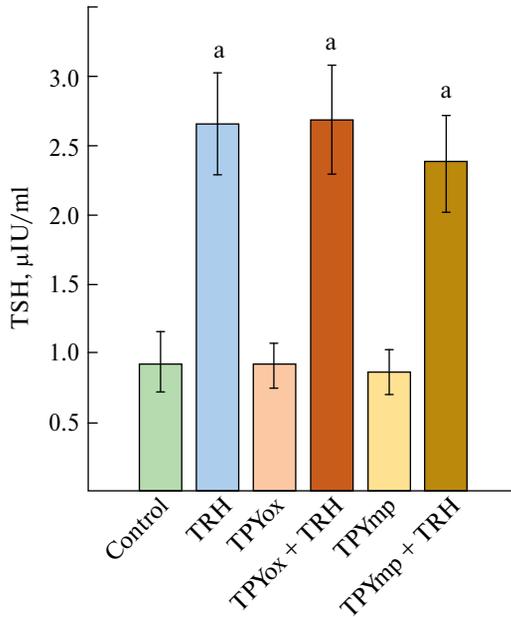
Для синтеза ТРУох и ТРУпр был применен подход, основанный на реакции кросс-сочетания 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(4-галогенфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамиды, соответственно, с глицидилпропаргилатом и его производным, продуктом раскрытия оксиранового кольца в присутствии морфолина (рис. 1). При однократном внутривенном введении крысам ТРУох и ТРУпр (20 мг/кг) через 2 и 3.5 ч не оказывали статистически значимого влияния на базовые концентрации исследуемых форм ТГ за исключением повышения концентрации тТЗ в группе ТРУпр через 3.5 ч (рис. 2). Не было выявлено влияния обоих ТП и на концентрацию ТТГ в крови (рис. 3). При этом через 3.5 ч после введения препаратов в группе ТРУох отмечали тенденцию к снижению продукции ТГ, а в группе ТРУпр – противоположную

тенденцию, вследствие чего при сравнении групп ТРУоx и ТРУmp было найдено, что концентрации ТГ в группе ТРУоx значимо ниже таковых в группе ТРУmp, хотя и не отличаются от их значений в контроле. ТРГ отчетливо повышал концентрации ТГ через 1.5 ч после его введения животным, и этот эффект сохранялся через 3 ч после введения рилизинг-фактора (рис. 2). Наряду с этим ТРГ на 182% повышал концентрацию ТТГ в крови, что обусловлено его стимулирующим влиянием на тиреотрофы аденогипофиза, осуществляющие синтез и секрецию ТТГ (рис. 3).

Предварительная обработка крыс обоими ТП не только сохраняла стимулирующий продукцию ТГ эффект ТРГ, но в ряде случаев его усиливала (рис. 2). При этом, однако, временная динамика влияния ТРУоx и ТРУmp на ТРГ-стимулированные концентрации ТГ в крови различалась. ТРУоx повышал стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации tT4, fT3 и tT3 через 1.5 ч после введения ТРГ, в то время как через 3 ч эффект потенцирования отсутствовал. В свою очередь потенцирующее влияние ТРУmp на стимулирующие продукцию трийодтиронина эффекты ТРГ было отчетливо выражено через 3 ч после введения ТРГ (рис. 2). При этом в группе ТРУmp+ TRH отмечали повышение концентрации tT3 не только по сравнению с группой TRH, но и с группой ТРУоx+ TRH, что указывает на более выраженную ПАМ-активность ТРУmp по срав-



**Рис. 2.** Базальные и стимулированные тиролиберинром концентрации ТГ в крови крыс при их обработке ТРУоx и ТРУmp (в/б, 20 мг/кг) через 2 и 3.5 ч после обработки ТП. (а) – Свободный тироксин (fT4), пмоль/л. (б) – Общий тироксин (tT4), нмоль/л. (с) – Свободный трийодтиронин (fT3), пмоль/л. (д) – Общий трийодтиронин, (tT3), нмоль/л. Начальные концентрации ТГ не приведены, поскольку значимых различий как с контролем, так и между группами в этом случае не было. Группы были сформированы случайным образом из общего гомогенного с точки зрения концентраций ТГ в крови пула животных. Различия с контролем (а) и с группой TRH (б), а также между группами ТРУоx и ТРУmp (с) и группами ТРУоx+TRH и ТРУmp+TRH (д) в одной временной точке статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены как  $M \pm SEM$ , во всех группах  $n = 6$ .

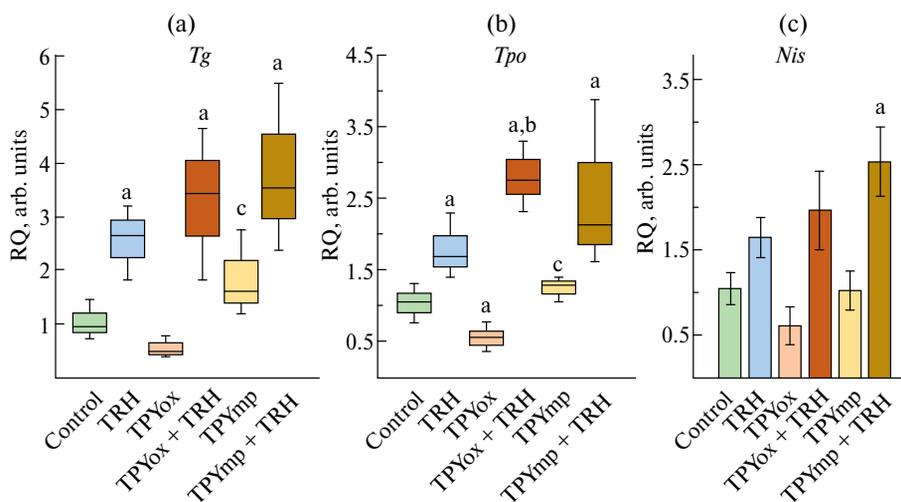


**Рис. 3.** Концентрации ТТГ в крови крыс при их обработке ТРУох и ТРУмп (в/б, 20 мг/кг). Оценивали концентрацию ТТГ в крови через 3.5 ч после обработки ТП или через 3 ч после введения ТРГ. Различия с контролем (а) статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ , во всех группах  $n = 6$ .

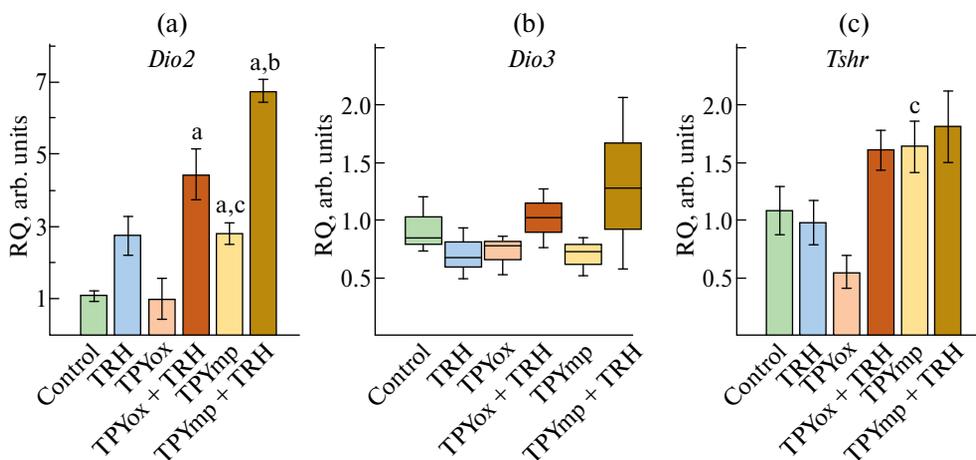
нению с ТРУох в отношении ТРГ-стимулированной продукции трийодтиронина, эффекторного гормона тиреоидной оси. Стимулирующие эффекты ТРГ на концентрацию ТТГ в группах с совместным введением с ТП сохранялись (рис. 3).

Экспрессию генов оценивали в конце эксперимента, через 3.5 ч после обработки животных ТП. Показано, что экспрессия генов *Tg*, *Tpo* и *Nis*, кодирующих тиреоглобулин, тиреопероксидазу и Na/I-симпортер, основные компоненты синтеза ТГ в ЩЖ, в группах ТРУох и ТРУмп значимо не отличалась от таковой в контроле за исключением значимого снижения экспрессии гена *Tpo* в группе ТРУох (рис. 4). Отмечали также тенденцию к снижению экспрессии генов *Tg* в группе ТРУох и повышение экспрессии генов *Tg* и *Tpo* в группе ТРУмп. Вследствие этого между группами ТРУох и ТРУмп имелись значимые различия в экспрессии генов *Tg* и *Tpo* (рис. 4). Обработка ТРГ приводила к повышению экспрессии генов *Tg* и *Tpo*. В присутствии ТП эти стимулирующие эффекты сохранялись. Экспрессия гена *Nis* была значимо повышена в сравнении с контролем только в группе ТРУмп + ТРН (рис. 4).

В ЩЖ крыс группы ТРУмп была повышена экспрессия гена дейодиназы 2-го типа, осуществляющей конверсию Т4 в активную форму Т3 (рис. 5). При совместном воздействии ТРУмп и ТРГ отмечали потенцирование стимулирующего эффекта ТРГ на экспрессию гена *Dio2*, который более чем в 2 раза превосходил таковой в группе ТРГ. Обработка ТРУох не влияла на экспрессию гена дейодиназы 2-го типа, но в его присутствии эффект ТРГ сохранялся и даже имел тенденцию к усилению (рис. 5). Экспрессия генов *Dio3* и *Tshr*, кодирующих дейодиназу 3-го типа, осуществляющую превращение Т4 и активной формы Т3 в неактивные формы ТГ (реверсивного Т3 и дийодтиронина), и рецептор ТТГ, во всех изученных группах не отличалась от контроля (рис. 5). При этом в группе с обработкой ТРУох экспрессия гена *Tshr* была ниже, чем в группе ТРУмп, что указывает на различный характер влияния этих соединений на экспрессию гена рецептора ТТГ (рис. 5).



**Рис. 4.** Экспрессия генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*) и натрий-йодидного симпортера (*Nis*) в щитовидной железе крыс при их обработке ТРУох и ТРУмп (в/б, 20 мг/кг). Оценивали экспрессию генов после окончания экспериментов – через 3.5 ч после обработки ТП или через 3 ч после введения ТРГ. Данные по экспрессии генов *Tg* и *Tpo* (значения RQ) распределены ненормально и представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов (25%; 75%). Данные по экспрессии гена *Nis* распределены нормально и представлены в виде  $M \pm SEM$ . Во всех группах  $n = 6$ . Различия с контролем (а) и с группой TRH (б), а также между группами ТРУох и ТРУмп (с) статистически значимы при  $p < 0.05$ .



**Рис. 5.** Экспрессия генов дейодиназ 2-го и 3-го типов (*Dio2*, *Dio3*) и рецептора ТТГ (*Tshr*) в щитовидной железе крыс при их обработке ТРУох и ТРУмп (в/б, 20 мг/кг). Оценивали экспрессию генов после окончания экспериментов – через 3.5 ч после обработки ТП или через 3 ч после введения ТРГ. Данные по экспрессии гена *Dio3* (значения RQ) распределены ненормально и представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов (25%; 75%). Данные по экспрессии генов *Dio2* и *Tshr* распределены нормально и представлены в виде  $M \pm SEM$ . Во всех группах  $n = 6$ . Различия с контролем (а) статистически значимы при  $p < 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллостерические регуляторы G-белок-сопряженных рецепторов, к которым относится рецептор ТТГ, способны модулировать эффекты агонистов ортостерического сайта рецептора, проявлять собственную активность в отсутствие таких агонистов или совмещать обе эти активности [12, 33, 34]. Ранее нами и другими авторами были разработаны аллостерические регуляторы рецептора ТТГ с различным фармакологическим профилем [17, 18, 20–25, 27–29], но только в одной работе был описан ПАМ (соединение NCGC00379308) для рецептора ТТГ [30]. Однако NCGC00379308 был специфичен в отношении  $\beta$ -аррестинных каскадов и не оказывал влияния на ТТГ-индуцированную стимуляцию  $G_s$ -белков и внутриклеточный уровень цАМФ [30]. Поскольку именно цАМФ-зависимые каскады играют определяющую роль в контроле синтеза и конверсии ТГ, в том числе путем стимуляции экспрессии генов тиреодогенеза [35–37], соединение NCGC00379308 не влияло на концентрации ТГ, что исключает возможность его использования для коррекции гипотиреоза. Тем самым до нашего исследования ПАМ рецептора ТТГ, специфичные в отношении гетеротримерных G-белков и сигнальных путей, ответственных за синтез и секрецию ТГ, не были описаны.

В настоящем исследовании на основе структуры ранее разработанных ТП с активностью аллостерических регуляторов рецептора ТТГ были созданы два новых соединения – ТРУох и ТРУмр с активностью ПАМ, способные усиливать ТТГ-индуцированную стимуляцию продукции ТГ, осуществляемую через сопряженные с рецептором ТТГ  $G_s$ -белки. Для синтеза ТРУох и ТРУмр была применена модифицированная авторами реакция кросс-сочетания (реакция Соногаширы) 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-галогенфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид с ацетиленами, катализируемая тетраakis(трифенилфосфин)палладием и йодидом меди (I). Это позволило получить целевые соединения с достаточно высоким выходом (от 43 до 63%) и степенью чистоты. Комбинация использованных при синтезе ТРУох и ТРУмр палладий- и медь-содержащих катализаторов оказалась более эффективной в сравнении с йодидом [1,3-бис(2,4,6-триметилфенил)имидазол-2-илиден]меди(I), который был ранее успешно применен нами для синтеза триазол-содержащих ТП [25, 38]. Соединения ТРУох и ТРУмр, как и другие регуляторы трансмембранного аллостерического сайта рецептора ТТГ, характеризовались сравнительно высокой гидрофобностью, что необходимо для эффективного преодоления сформированного гидрофобными аминокислотами внешнего входа в трансмембранный канал и связывания с расположенным внутри него аллостерическим сайтом [14, 19, 39]. В рецепторе лютеинизирующего гормона (ЛГ), структурно родственном рецептору ТТГ, вход в трансмембранный канал образован более полярными аминокислотными остатками, вследствие чего регуляторы трансмембранного аллостерического сайта рецептора ЛГ имеют меньшую гидрофобность [12, 40, 41]. Эти различия вносят значимый вклад в селективность аллостерических регуляторов к рецепторам ТТГ и ЛГ, предотвращая их перекрестную активность [12, 25].

В пользу ПАМ-активности соединений ТРУох и ТРУмр свидетельствует их соответствие следующим основным критериям для фармакологической группы ПАМ: отсутствие отчетливо выраженного влияния на базовую активность рецептора ТТГ и потенцирование стимулирующих эффектов ТРГ на уровне ТГ, на экспрессию генов тиреодогенеза [12, 33, 42]. При введении крысам ТРУох и ТРУмр концентрации ТГ в крови и экспрессия ключевых генов синтеза ТГ в ЩЖ крыс существенно не отличались от таковых в контроле (рис. 2, 4). Исключение составляет вызываемое ТРУмр повышение концентрации тТЗ через 3.5 ч после введения и усиление экспрессии гена *Dio2*, кодирующего дейодиназу 2-го типа, что требует дальнейшего изучения, особенно в свете выявленного мощного потенцирующего эффекта ТРУмр на стимулирующей экспрессии гена *Dio2* эффект ТРГ. Так, в группе ТРУмр + TRH экспрессия гена

*Dio2* повышалась в сравнении с контролем более чем в 6 раз (рис. 5). Это указывает на то, что ТРУох и ТРУмр не наделены отчетливо выраженной собственной агонистической или антагонистической активностью, которая была выявлена нами ранее у ряда других ТП – ТРУ3м, ТРУ7, ТР48, ТРУ1 и ТРУ5 [20–25].

Предобработка крыс с помощью ТРУох и ТРУмр не только сохраняла стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации ТГ и экспрессию тироидальных генов, кодирующих ключевые компоненты синтеза и конверсии ТГ, но в ряде случаев их усиливала, что является характерным признаком ПАМ. Мы полагаем, что основной причиной этого является индуцированное ТРУох и ТРУмр изменение конформации расположенного в трансмембранном тоннеле рецептора аллостерического сайта, приводящее к повышению эффективности передачи генерируемого ТТГ сигнала от внеклеточного ортостерического сайта рецептора ТТГ к эффекторным компонентам ТТГ-активируемого сигнального пути. Важно, что вызванные различными лигандами изменения конформации аллостерического сайта рецептора ТТГ влияют не только на эффективность, но и на специфичность трансдукции гормонального сигнала [30], и это позволяет при стимуляции рецептора одним и тем же ортостерическим агонистом дифференцированно регулировать внутриклеточные пути, вовлеченные в регуляцию различных эффекторных систем клетки-мишени.

В то же время временная динамика и характер потенцирующего влияния ТРУох и ТРУмр на эффекты ТРГ различались. ТРУох значимо усиливал стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации тТ4 и обеих форм Т3 через 2 ч после обработки этим ТП. В свою очередь ТРУмр потенцировал стимулирующий эффект ТРГ на продукцию Т3 только через 3.5 ч, в то время как потенцирующее влияние ТРУох к этому времени исчезало. Поскольку экспрессию генов оценивали только в конце эксперимента, через 3.5 ч после введения ТП (или через 3 ч после обработки ТРГ), то временную динамику в этом случае проследить не представляется возможным. При обработке крыс с помощью ТРУох было обнаружено усиление ТРГ-индуцированной экспрессии гена *Tpo*, который кодирует тиреопероксидазу, ответственную за окисление йода (рис. 4). В группе ТРУмр + TRH, помимо усиления ТРГ-стимулированной экспрессии гена *Dio2*, выявлялся стимулирующий эффект ТРГ на экспрессию гена Na/I-транспортера, обеспечивающего активный транспорт йода из кровотока к фолликулярным клеткам ЩЖ, причем в отсутствие ТРУмр этот эффект ТРГ не был значимым (рис. 4, 5). Необходимо отметить, что в отсутствие стимуляции крыс ТРГ, через 3.5 ч после обработки в группе ТРУох были снижены в сравнении с группой ТРУмр концентрации всех форм ТГ, а также экспрессия генов *Tg*, *Tpo*, *Dio2* и *Tshr*, хотя от соответствующих показателей у контрольных крыс они не отличались (рис. 2, 4, 5).

Выявленные различия между ТРУох и ТРУмр могут быть обусловлены низкой стабильностью оксиранового производного, поскольку оксирановый цикл способен раскрываться как в полярной (водной), так и в неполярной (гидрофобное окружение трансмембранного тоннеля рецептора) среде. Это может приводить как к новым производным соединения ТРУох, например вследствие катализируемого эпоксидгидролазами раскрытия оксиранового цикла с образованием диола, так и к ковалентной сшивке ТРУох с рецептором или другими сигнальными белками [43, 44]. С этим хорошо согласуется ингибирующее влияние ТРУох на концентрации ТГ через 3.5 ч после введения препарата в сравнении с группой ТРУмр, а также ослабление в те же сроки потенцирующего влияния ТРУох на ТРГ-стимулированные концентрации ТГ. Нельзя исключить и того, что ТРУох может приводить к повреждению тканей, как это продемонстрировано для ряда других производных оксирана [45]. В связи с этим ТРУмр, безусловно, является более перспективным и безопасным кандидатом для использования в качестве ПАМ рецептора ТТГ, способным усилить стимулирующие эффекты эндогенного ТТГ и, возможно, других ортостерических агонистов рецепто-

ра ТТГ на систему синтеза ТГ в ЩЖ, в том числе в условиях дефицита ТГ и резистентности тироцитов к действию ТТГ.

Таким образом, нами разработано новое соединение ТРУ<sub>mp</sub> с активностью ПАМ рецептора ТТГ, которое при введении крысам усиливает стимулирующие эффекты ТРГ на концентрации ТГ в крови и на экспрессию ряда генов, ответственных за продукцию ТГ, при этом слабо влияя на тиреоидную систему в отсутствие ТРГ-стимуляции. Потенцирующее влияние ТРУ<sub>mp</sub> выявляется через 3.5 ч после введения этого соединения, что свидетельствует в пользу его стабильности. При введении крысам другого соединения ТРУ<sub>oh</sub>, несмотря на его фармакологический профиль, характерный для ПАМ, через 3.5 ч отмечали тенденцию к снижению концентрации ТГ в крови и исчезновение потенцирующего влияния на эффекты ТРГ, что, как мы полагаем, обусловлено относительно высокой реакционной способностью оксиранового цикла и исключает использование ТРУ<sub>oh</sub> для коррекции гипотиреоза в условиях клиники.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. О. Ш., К. В. Д.), сбор данных (К. В. Д., А. С. П., И. Р. Н.), синтез и физико-химическая характеристика веществ (Е. А. Д., В. Н. С.), обработка данных (К. В. Д., А. С. П., И. Р. Н., Е. А. Д., В. Н. С.), написание и редактирование манускрипта (А. О. Ш., К. В. Д., В. Н. С.).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Биоэтического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 3-2/2024 от 28.03.2024 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nazari J, Jafari K, Chegini M, Maleki A, MirShafiei P, Alimohammadi A, Kazemzadeh Y, Mikaeli-yan R, Amini S* (2021) Physical and mental growth and development in children with congenital hypothyroidism: A case-control study. *Orphanet J Rare Dis* 16(1): 393. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-02017-7>
2. *Bowden SA, Goldis M* (2023) Congenital Hypothyroidism. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
3. *Biondi B, Cooper DS* (2019) Thyroid hormone therapy for hypothyroidism. *Endocrine* 66(1): 18–26. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02023-7>
4. *Baumgartner C, da Costa BR, Collet TH, Feller M, Floriani C, Bauer DC, Cappola AR, Heckbert SR, Ceresini G, Gussekloo J, den Elzen WPJ, Peeters RP, Luben R, Völzke H, Dörr M, Walsh JP, Bremner A, Iacoviello M, Macfarlane P, Heeringa J, Stott DJ, Westendorp RGJ, Khaw KT, Magnani JW, Aujesky D, Rodondi N* (2017) Thyroid Studies Collaboration. Thyroid Function Within the Normal Range, Subclinical Hypothyroidism, and the Risk of Atrial Fibrillation. *Circulation* 136(22): 2100–2116. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028753>

5. *Glivic Z, Obradovic M, Stewart AJ, Essack M, Pitt SJ, Samardzic V, Soskic S, Gojbori T, Isenovic ER* (2021) Levothyroxine Treatment and the Risk of Cardiac Arrhythmias – Focus on the Patient Submitted to Thyroid Surgery. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 758043. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.758043>
6. *Saponaro F, Sestito S, Runfoia M, Rapposelli S, Chiellini G* (2020) Selective Thyroid Hormone Receptor-Beta (TR $\beta$ ) Agonists: New Perspectives for the Treatment of Metabolic and Neurodegenerative Disorders. *Front Med (Lausanne)* 7: 331. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00331>
7. *Biondi B* (2023) Subclinical Hypothyroidism in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome: A Narrative Review. *Nutrients* 16(1): 87. <https://doi.org/10.3390/nu16010087>
8. *Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, Libri D, de Filippis T, Bonomi M* (2010) Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol* 322(1-2): 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.008>
9. *Grasberger H, Refetoff S* (2017) Resistance to thyrotropin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 31(2): 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.03.004>
10. *Pirahanchi Y, Toro F, Jialal I* (2023) Physiology, Thyroid Stimulating Hormone. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
11. *Davies TF, Latif R* (2015) Targeting the thyroid-stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies. *Expert Opin Ther Targets* 19(6): 835–847. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1018181>
12. *Shpakov AO* (2023) Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands. *Int J Mol Sci* 24: 6187. <https://doi.org/10.3390/ijms24076187>
13. *Zhang Y, Tan Y, Zhang Z, Cheng X, Duan J, Li Y* (2024) Targeting Thyroid-Stimulating Hormone Receptor: A Perspective on Small-Molecule Modulators and Their Therapeutic Potential. *J Med Chem* 67(18): 16018–16034. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01525>
14. *Mezei M, Latif R, Davies TF* (2022) Computational model of the full-length TSH receptor. *Elife* 11: e81415. <https://doi.org/10.7554/eLife.81415>
15. *Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, Krause G* (2017) Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 86. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
16. *Shpakov AO* (2021) Endogenous and Synthetic Regulators of the Peripheral Components of the Hypothalamo-Hypophyseal-Gonadal and -Thyroid Axes. *Neurosci Behav Physiol* 51: 332–345. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01076-4>
17. *Latif R, Ali MR, Ma R, David M, Morshed SA, Ohlmeyer M, Felsenfeld DP, Lau Z, Mezei M, Davies TF* (2015) New Small Molecule Agonists to the Thyrotropin Receptor. *Thyroid* 25: 51–62. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0119>
18. *Marcinkowski P, Hoyer I, Specker E, Furkert J, Rutz C, Neuenschwander M, Sobottka S, Sun H, Nazare M, Berchner-Pfannschmidt U, von Kries JP, Eckstein A, Schülein R, Krause G* (2019) A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 29: 111–123. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
19. *Mezei M, Latif R, Das B, Davies TF* (2021) Implications of an Improved Model of the TSH Receptor Transmembrane Domain (TSHR-TMD-TRIO). *Endocrinology* 162(7): bqab051. <https://doi.org/10.1210/endoctr/bqab051>
20. *Derkach KV, Bakhtyukov AA, Sorokoumov VN, Shpakov AO* (2020) New Thieno-[2,3-d]Pyrimidine-Based Functional Antagonist for the Receptor of Thyroid Stimulating Hormone. *Dokl Biochem Biophys* 491: 77–80. <https://doi.org/10.1134/S1607672920020064>
21. *Derkach KV, Fokina EA, Bakhtyukov AA, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Zakharova IO, Shpakov AO* (2022) The Study of Biological Activity of a New Thieno[2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor. *Bull Exp Biol Med* 172: 713–717. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05462-x>
22. *Derkach KV, Bakhtyukov AA, Sorokoumov VN, Lebedev IA, Didenko EA, Shpakov AO* (2024) Low Molecular Weight Thyrotropin Receptor Inverse Agonist is Active upon both Intraperitoneal and Oral Administration. *J Evol Biochem Physiol* 60: 295–305. <https://doi.org/10.1134/S0022093024010216>

23. *Bakhtuykov AA, Derkach KV, Fokina EA, Sorokoumov VN, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2022) Development of low-molecular-weight allosteric agonist of thyroid-stimulating hormone receptor with thyroidogenic activity. *Dokl Biochem Biophys* 503(1): 67–70. <https://doi.org/10.1134/S1607672922020016>
24. *Derkach KV, Sorokoumov VN, Morina IY, Kuznetsova VS, Romanova IV, Shpakov AO* (2024) Regulatory Effects of 5-Day Oral and Intraperitoneal Administration of a Thienopyrimidine Derivative on the Thyroid Status in Rats. *Bull Exp Biol Med* 177: 559–563. <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06223-8>
25. *Derkach KV, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, Zorina II, Morina IY, Chernenko EE, Didenko EA, Romanova IV, Shpakov AO* (2025) Effect of a Low-Molecular-Weight Allosteric Agonist of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor on Basal and Thyroliberin-Stimulated Activity of Thyroid System in Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* 26(2): 703. <https://doi.org/10.3390/ijms26020703>
26. *Moore S, Jaeschke H, Kleinau G, Neumann S, Costanzi S, Jiang J, Childress J, Raaka BM, Colson A, Paschke R, Krause G, Thomas CJ, Gershengorn MC* (2006) Evaluation of Small-Molecule Modulators of the Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin and Thyroid Stimulating Hormone Receptors: Structure-Activity Relationships and Selective Binding Patterns. *J Med Chem* 49: 3888–3896. <https://doi.org/10.1021/jm060247s>
27. *Neumann S, Gershengorn MC* (2011) Small Molecule TSHR Agonists and Antagonists. *Ann Endocrinol* 72: 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.03.002>
28. *Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC* (2011) Small-molecule thyrotropin receptor agonist activates naturally occurring thyrotropin-insensitive mutants and reveals their distinct cyclic adenosine monophosphate signal persistence. *Thyroid* 21(8): 907–912. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0025>
29. *Nagayama Y, Nishihara E* (2022) Thyrotropin Receptor Antagonists and Inverse Agonists, and Their Potential Application to Thyroid Diseases. *Endocr J* 69: 1285–1293. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ22-0391>
30. *Neumann S, Eliseeva E, Boutin A, Barnaeva E, Ferrer M, Southall N, Kim D, Hu X, Morgan SJ, Marugan JJ, Gershengorn MC* (2018) Discovery of a Positive Allosteric Modulator of the Thyrotropin Receptor: Potentiation of Thyrotropin-Mediated Preosteoblast Differentiation In Vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 364(1): 38–45. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244095>
31. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47(12): 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
32. *Schmittgen TD, Livak KJ* (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
33. *Grundmann M, Bender E, Schamberger J, Eitner F* (2021) Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors and Their Allosteric Modulators. *Int J Mol Sci* 22(4): 1763. <https://doi.org/10.3390/ijms22041763>
34. *Zhang M, Chen T, Lu X, Lan X, Chen Z, Lu S* (2024) G protein-coupled receptors (GPCRs): Advances in structures, mechanisms, and drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* 9(1): 88. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
35. *Gérard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G* (1989) Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: Evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol* 3(12): 2110–2118. <https://doi.org/10.1210/mend-3-12-2110>
36. *Jang D, Eliseeva E, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC* (2022) TSH stimulation of human thyroglobulin and thyroid peroxidase gene transcription is partially dependent on internalization. *Cell Signal* 90: 110212. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110212>
37. *Chandrasekar A, Schmidtlein PM, Neve V, Rivagorda M, Spiecker F, Gauthier K, Prevot V, Schwanning M, Müller-Fiellitz H* (2024) Regulation of Thyroid Hormone Gatekeepers by Thyrotropin in Tancytes. *Thyroid* 34(2): 261–273. <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0375>
38. *Derkach KV, Lebedev IA, Morina IY, Bakhtuykov AA, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, Kuznetsova VS, Romanova IV, Shpakov AO* (2023) Comparison of Steroidogenic and Ovulation-Inducing Effects of Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor in Immature Female Rats. *Int J Mol Sci* 24(23): 16618. <https://doi.org/10.3390/ijms242316618>

39. *Hoyer I, Haas AK, Kreuchwig A, Schülein R, Krause G* (2013) Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists. *Biochem Soc Trans* 41(1): 213–217.  
<https://doi.org/10.1042/BST20120319>
40. *Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS* (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>
41. *Lazzaretti C, Simoni M, Casarini L, Paradiso E* (2023) Allosteric modulation of gonadotropin receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1179079.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1179079>
42. *Zhu C, Lan X, Wei Z, Yu J, Zhang J* (2024) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors as a novel therapeutic strategy in neuropathic pain. *Acta Pharm Sin B* 14(1): 67–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.07.020>
43. *Wagner K, Vito S, Inceoglu B, Hammock BD* (2014) The role of long chain fatty acids and their epoxide metabolites in nociceptive signaling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 113-115: 2–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2014.09.001>
44. *Ichimaru Y, Fujii T, Saito H, Sano M, Uchiyama T, Miyairi S* (2017) 5-Bromindirubin 3'-(O-oxiran-2-ylmethyl)oxime: A long-acting anticancer agent and a suicide inhibitor for epoxide hydrolase. *Bioorg Med Chem* 25(17): 4665–4676.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.009>
45. *Vangaveti VN, Jansen H, Kennedy RL, Malabu UH* (2016) Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer. *Eur J Pharmacol* 785: 70–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03>

**Development of Positive Allosteric Modulators of the Thyroid Stimulating Hormone Receptor Based on the Thieno[2,3-d]-Pyrimidine Structure and their Effect on Thyroid Status in Rats**

**K. V. Derkach<sup>a,\*</sup>, A. S. Pechalnova<sup>a</sup>, I. R. Nazarov<sup>a</sup>, E. A. Didenko<sup>a,b</sup>,  
V. N. Sorokoumov<sup>a,b</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a</sup>**

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

<sup>b</sup>*Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

\*e-mail: [derkatch\\_k@list.ru](mailto:derkatch_k@list.ru)

Thyroid stimulating hormone (TSH) levels in autoimmune hypothyroidism and hypothyroidism caused by inactivating mutations in the TSH receptor are normal or elevated, which is due to increased thyroliberin (TRH)-stimulated TSH production in thyroid hormone (TH) deficiency. The main cause of hypothyroidism is a weakened thyroid response to TSH. This requires the development of approaches to increase the sensitivity of thyrocytes to TSH. One of them is the use of positive allosteric modulators (PAMs) of the TSH receptor, which enhance the effects of TSH on TH production. However, such PAMs are currently lacking. The aim of the work was to synthesize new thieno[2,3-d]-pyrimidine derivatives TPYox and TPYmp with PAM activity of the TSH receptor and to study their effects on basal and TRH-stimulated blood TH concentration and expression of genes involved in TH synthesis in the rat thyroid. When administered to rats, TPYox and TPYmp (20 mg/kg) had little effect on blood TH concentration and expression of TH synthesis genes, except for an increase in tT3 concentration and expression of the *Dio2* gene encoding type 2 deiodinase when using TPYmp. At the same time, despite the absence of differences with the control, in the TPYox-treated group, the blood TH concentrations and the expression of the *Tg*, *Tpo*, *Dio2*, and *Tshr* genes decreased as compared to the TPYmp-treated rats, which we believe is due to the high reactivity of the oxirane cycle in TPYox and its inhibitory effect on some components of the thyroid system in the thyroid gland. Pretreatment of rats with TPYox and TPYmp preserved the stimulatory effects of TRH on TH concentration and thyroid gene expression, and in some cases significantly enhanced them. However, the dynamics and severity of the potentiating effect of TPYox and TPYmp differed. TPYox potentiated the stimulatory effects of TRH on blood tT4, fT3, and tT3 concentrations 1.5 h after TRH treatment, while TPYmp enhanced the stimulatory effects of TRH on fT3 and tT3 concentrations 3 h later, when the potentiating effect of TPYox had already disappeared. In the thyroid gland, TPYox enhanced TRH-induced *Tpo* gene expression, while TPYmp enhanced *Dio2* and *Nis* gene expression. Based on the data obtained, it was concluded that the most promising drug for increasing the TSH receptor response to endogenous TSH is TPYmp, 5-amino-N-(tert-butyl)-4-{4-[3-(2-hydroxy-3-morpholinopropoxy)pro-1-yn-1-yl]phenyl}-2-(methylthio)thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxamide, the first functionally active PAM of the TSH receptor that we developed.

**Keywords:** thyroid stimulating hormone receptor, allosteric modulator, thyroid hormone, thieno[2,3-d]-pyrimidine, thyroliberin, type 2 deiodinase, thyroid system