
ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ
G-БЕЛОК-СОПРЯЖЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ
ПОЛИПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ

© 2019 г. А. А. Бахтюков¹, А. О. Шпаков¹, *

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербурге, Россия

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 09.01.2019 г.

После доработки 01.02.2019 г.

Принята к публикации 01.02.2019 г.

Сопряженные с G-белками рецепторы (GPCR) являются самым обширным семейством сенсорных белков, через посредство которых регуляторные эффекты на клетку оказывают различные по природе гормональные агенты. Наряду с ортостерическим сайтом, с которым специфично связываются эндогенные лиганды, в GPCR присутствуют аллостерические сайты, обычно локализованные в его внеклеточных и цитоплазматических петлях. Однако в GPCR полипептидных гормонов, в которых связывание с лигандом осуществляется через посредство значительного по размеру эктодомена, аллостерические сайты могут располагаться в трансмембранном канале, где в большинстве других GPCR локализован ортостерический сайт. Аллостерические регуляторы могут функционировать как полные и инверсионные агонисты и антагонисты или модулировать регуляторные эффекты гормонов. Поскольку даже в структурно и функционально близких рецепторах аллостерические сайты различаются, то взаимодействующие с ними регуляторы характеризуются более высокой рецепторной специфичностью в сравнении с лигандами ортостерических сайтов. Более того, аллостерические регуляторы стабилизируют только определенные активные конформации рецептора и, тем самым, способны селективно стимулировать или, напротив, подавлять активность определенных внутриклеточных сигнальных каскадов. Наибольшие успехи достигнуты в разработке низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецепторов гипофизарных гликопротеиновых гормонов, что исключительно важно для лечения заболеваний репродуктивной и тиреоидной систем. Современному состоянию проблемы аллостерических регуляторов GPCR, активируемых полипептидными гормонами, и достижениям в их разработке посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: аллостерический регулятор, G-белок-сопряженный рецептор, низкомолекулярный агонист, аллостерический сайт, рецептор лютеинизирующего гормона

DOI: 10.1134/S0869813919030014

ВВЕДЕНИЕ

Значительное количество гормонов, нейротрансмиттеров, ростовых факторов, нутриентов реализуют свои регуляторные эффекты на клетки-мишени через по-

Принятые сокращения: АденР – аденозиновый рецептор; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТТГ – тиреотропный гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; GPCR – G-белок-сопряженный рецептор.

средство их связывания с G-белок-сопряженными рецепторами (GPCR), представляющими собой самое обширное семейство сенсорных белков как у человека, так и у животных различного филогенетического уровня. Создание новых лекарственных препаратов, способных с высокой селективностью и эффективностью регулировать GPCR, является одной из наиболее острых и актуальных проблем современной физиологии и эндокринологии. Несмотря на то, что GPCR – основные фармакологические мишени примерно для половины используемых в медицине лекарственных препаратов, только для ограниченного числа этих рецепторов имеется вся необходимая “линейка” таких препаратов, включая их селективные агонисты и антагонисты [1, 2]. Наибольшие трудности возникают с поиском и разработкой регуляторов GPCR, активируемых полипептидными гормонами, поскольку процессы синтеза и очистки гормонов белковой природы сопряжены с рядом серьезных проблем, что в значительной степени ограничивает или даже делает невозможным их широкое применение в медицине [3]. В связи с этим в последние годы особое внимание уделяют поиску низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецепторов GPCR [4–6]. Наибольшие успехи достигнуты при разработке аллостерических регуляторов рецепторов гликопротеиновых гормонов с активностью полных агонистов, антагонистов и инверсионных агонистов. Это позволило сделать обоснованный вывод о том, что разработка новых селективных аллостерических регуляторов имеет не только важное прикладное значение, но и позволяет по-новому взглянуть на молекулярную динамику активации GPCR, а также на тонкие молекулярные механизмы, лежащие в основе функционального сопряжения GPCR с внутриклеточными белками, выполняющими функции трансдукторов и эффекторов в GPCR-регулируемых сигнальных каскадах [7–11]. Целью настоящего обзора были: 1) обсуждение современных тенденций в поиске и разработке низкомолекулярных регуляторов рецепторов GPCR; 2) описание многообразия аллостерических регуляторов и их биохимических и физиологических особенностей и 3) подробный анализ аллостерических агонистов, антагонистов и инверсионных агонистов GPCR гликопротеиновых гормонов.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АГОНИСТЫ GPCR РЕЦЕПТОРОВ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

В качестве регуляторов GPCR полипептидных гормонов могут быть использованы их низкомолекулярные лиганды с активностью агонистов и антагонистов. Как известно, большинство GPCR активируются небольшими по размеру лигандами – производными аминокислот, нуклеотидами, олигопептидами, которые легко проникают в трансмембранный канал GPCR, где расположен высокоаффинный ортостерический сайт. Для этих рецепторов с помощью стратегии молекулярного докинга и изучения соотношения структура–активность в отношении соединений, структурно близких эндогенному лиганду, успешно ведутся поиск и разработка новых регуляторов с запрограммированной биологической активностью. Значительный прогресс в этом направлении был достигнут после внедрения инновационных подходов, позволяющих с высокой точностью устанавливать пространственную структуру ортостерического сайта адренергических, серотониновых, аденозиновых и ряда других GPCR, и конструировать на этой основе лиганды с активностью агонистов и антагонистов [12, 13]. Подобные подходы позволили разработать высоко-селективные агонисты серотониновых рецепторов 1F- и 1D-подтипов и антагонисты серотониновых рецепторов 2В-подтипа и 7-го типа, которые в настоящее время находятся в фазе клинических испытаний как препараты для лечения мигрени [14]. Однако такой подход мало приемлем для рецепторов, которые активируются значительными по размеру полипептидными гормонами, не способными даже ча-

стично проникать в трансмембранный канал. Эти гормоны, как правило, связываются с внеклеточным N-концевым доменом (эктодоменом), который по размеру сопоставим с остальной частью молекулы рецептора, или сразу с несколькими внеклеточными петлями рецептора. При этом ортостерический сайт GPCR белковых и полипептидных гормонов, формируемый внеклеточными участками и предназначенный для многоцентрового связывания полипептидного гормона, не является мишенью для низкомолекулярных лигандов и не может ими активироваться.

Основываясь на этом, можно предположить, что стратегия поиска низкомолекулярных агонистов и антагонистов для GPCR белковых и полипептидных гормонов теряет всякий смысл. И здесь взоры исследователей обратились к аллостерическим сайтам, присутствующим в молекулах всех рецепторов, включая и GPCR полипептидных гормонов. В большинстве GPCR аллостерические сайты расположены в цитоплазматических петлях и в интерфейсах, сформированных цитоплазматическими расширениями трансмембранных участков и проксимальными участками цитоплазматических петель [15–17]. В рецепторах полипептидных и белковых гормонов они могут быть также локализованы в их трансмембранном канале [18–20]. Специфичное взаимодействие аллостерического сайта с лигандом может приводить как к активации (полный агонист), так и к ингибированию (инверсионный агонист) GPCR, не оказывая при этом заметного влияния на связывание ортостерического сайта рецептора с гормоном. Изменение конформации аллостерического сайта при его связывании с лигандом может усилить или, напротив, ингибировать регуляторные эффекты лигандов ортостерического сайта. В настоящее время аллостерическая регуляция подробно описана для некоторых ферментов, в том числе различных типов протеинкиназ и, в меньшей степени, для некоторых семейств рецепторов, включая GPCR [21].

Изучение структуры и механизмов функционирования аллостерических сайтов в GPCR является исключительно важным для расшифровки тонких механизмов активации и ингибирования GPCR и передачи генерируемых их эндогенными лигандами сигналов внутрь клетки, а также для разработки новых фармакологических подходов, предназначенных для лечения заболеваний, этиология и патогенез которых обусловлены нарушениями функционирования GPCR [22]. Одним из основных преимуществ аллостерических регуляторов и модуляторов GPCR является их высокая специфичность к определенным подтипам рецепторов, в том числе имеющим одинаковые эндогенные лиганды ортостерического сайта. Разработка аллостерических регуляторов является перспективной не только в отношении GPCR белковых и полипептидных гормонов, где аллостерические регуляторы могут оказаться вне конкуренции в сравнении с эндогенными гормонами, и об этом пойдет речь ниже, но также и в отношении GPCR, активируемых низкомолекулярными эндогенными лигандами и имеющих множество подтипов, различающихся по физиологическим эффектам и локализации в организме. Проиллюстрируем это следующим примером.

В настоящее время имеется большое число природных и синтетических лигандов ортостерического сайта аденозиновых рецепторов (АденР) с активностью полных агонистов (NECA, CGS21680), инверсионных агонистов (ZM41385), нейтральных антагонистов (PSB36, DU172^a, T4G^b, 6DY^b, 6DZ^b, кофеин, теofilлин), причем все они структурно близки аденозину, эндогенному активатору АденР. Все эти лиганды способны влиять на активность различных АденР. Так, кофеин блокирует АденР А1-подтипа и АденР 2-го типа, которые существенно различаются по паттерну сигнальных каскадов и влиянию на физиологические и биохимические процессы в клетке [13, 23]. Сравнительно недавно в структуре АденР 1-го типа был обнаружен аллостерический сайт, отсутствующий в АденР 2-го типа, связывание аллостерического лиганда с которым влияло на активность АденР 1-го типа, но не затрагивало

АденР 2-го типа. Показано, что соединение VCP171, являющееся лигандом этого сайта, усиливает стимулирующие эффекты агонистов АденР 1-го типа и подавляет ингибирующие эффекты его антагонистов [13, 24]. Создание высокоспецифичных аллостерических регуляторов не менее актуально для метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR), семейство которых включает 8 подтипов, а также для метаботропных серотониновых рецепторов, число подтипов которых достигает 15. Необходимо отметить, что лиганды ортостерического сайта GPCR с активностью агонистов, как правило, вызывают сильно выраженный, долговременный стимулирующий эффект, что приводит к гиперактивации и последующей даун-регуляции рецептора, а также снижает его чувствительность к повторным гормональным стимулам [25]. Для аллостерических агонистов, действие которых является более слабым, эти побочные эффекты не характерны.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРОВ GPCR

Аллостерические регуляторы GPCR по механизмам их действия можно разделить на два основных класса. К первому относятся аллостерические модуляторы, которые не обладают собственной активностью и не способны функционировать в отсутствие лигандов ортостерического сайта GPCR. Их, в свою очередь, можно разделить на три группы: (1) положительные аллостерические модуляторы (positive allosteric modulator, PAM), которые повышают сродство рецептора к лигандам ортостерического сайта, (2) отрицательные аллостерические модуляторы (negative allosteric modulator, NAM), снижающие сродство рецептора к ортостерическим лигандам, и (3) нейтрализующие аллостерические модуляторы (silence allosteric modulator, SAM), которые блокируют действие других аллостерических модуляторов – PAM и NAM, независимо от присутствия лиганда ортостерического сайта [26, 27]. Примером PAM может служить соединение LY2119620, положительный модулятор мускаринового ацетилхолинового рецептора 2-го типа (mAChR2). Это соединение меняет сродство ацетилхолина к рецептору, связываясь с его аллостерическим сайтом, но при этом не наделено активностью полного агониста mAChR2 [28]. Упомянутое выше соединение VCP171, являющееся аллостерическим регулятором АденР 1-го типа, функционирует как PAM для агонистов АденР 1-го типа и как NAM для антагонистов ортостерического сайта этого рецептора [24]. Аллостерические модуляторы привлекательны тем, что лишены активности в отсутствие лигандов ортостерического сайта, что позволяет сохранить чувствительность тканей-мишеней к эндогенным лигандам. Еще одним их преимуществом является способность смягчать как активирующие, так и ингибирующие эффекты лигандов ортостерического сайта GPCR, предотвращая, тем самым, побочные эффекты, обусловленные резким изменением активности GPCR-зависимых каскадов [25, 29].

Второй, более обширный, класс аллостерических регуляторов – это аллостерические регуляторы, наделенные собственной активностью. Они могут функционировать как полные агонисты, антагонисты или инверсионные агонисты GPCR, то есть обладают способностью изменять активность рецептора в отсутствие ортостерического лиганда. Молекулярные механизмы действия этих соединений, в отличие от аллостерических модуляторов, напрямую не зависят от присутствия эндогенного лиганда и могут осуществляться, в том числе, в его отсутствие [30]. Сравнительно часто выявляется аддитивный эффект при совместном применении аллостерических агонистов и агонистов ортостерического сайта GPCR. Аллостерический антагонист и аллостерический инверсионный агонист могут действовать независимо от того, занят ли ортостерический сайт лигандом или он свободен. Чтобы подчеркнуть различия механизмов действия между аллостерическими модуляторами PAM и NAM и собственно аллостерическими агонистами и антагонистами,

в современной литературе для первых обычно используют термины “аго-РАМ” или “антаго-НАМ” [22, 31].

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРОВ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ

В последние годы значительный успех достигнут при разработке агонистов, антагонистов и инверсионных агонистов аллостерического сайта GPCR гипофизарных гликопротеиновых гормонов – рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), а также рецепторов фолликуло-стимулирующего (ФСГ) и тиреотропного (ТТГ) гормонов. Структурной особенностью всех этих рецепторов является наличие в их структуре значительного по размеру эктодомена, основной функцией которого является формирование сложно-организованного ортостерического сайта, с которым с высокой аффинностью связываются $\alpha\beta$ -гетеродимерные комплексы гликопротеиновых гормонов [32, 33]. Результатом такого связывания является изменение конформации эктодомена и его взаимодействия с внеклеточными петлями и внешним устьем трансмембранного канала рецептора, что переводит трансмембранную и цитоплазматические части рецептора в активированное состояние и индуцирует их функциональное взаимодействие с гетеротримерными G-белками и регуляторными белками β -аррестинами. Разработка и оптимизация подходов для селективной регуляции функциональной активности GPCR гликопротеиновых гормонов лежит в основе лечения и предотвращения заболеваний репродуктивной и тиреоидной систем [34, 35].

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРОВ ГОНАДОТРОПИНОВ

Гонадотропины, эндогенные агонисты рецепторов ЛГ/ХГЧ и ФСГ, в настоящее время широко и почти безальтернативно применяют для коррекции нарушений репродуктивной системы и во вспомогательных репродуктивных технологиях [34, 36]. Однако применение препаратов гонадотропинов в клинике может приводить к ряду серьезных побочных эффектов. В случае препаратов ФСГ и ХГЧ, выделяемых из мочи, это обусловлено наличием в них биологически активных примесей, структурной гетерогенностью и, как следствие, сложностью стандартизации этих препаратов. В случае рекомбинантных форм ЛГ и ФСГ основной наиболее острой проблемой является несоответствие их структуры природным формам гормонов и, как следствие, иной паттерн биологической активности. Это обусловлено значительными различиями в степени N-гликозилирования и структуре N-гликанов в молекулах рекомбинантных и природных форм гонадотропинов, поскольку “машинерия” N-гликозилирования в гонадотрофах аденогипофиза, где синтезируются природные ЛГ и ФСГ, и в клеточных культурах, где экспрессируются рекомбинантные их формы, существенно различается [37]. Более того, гонадотропины в фармакологических дозах характеризуются низкой селективностью по отношению к внутриклеточным эффекторным системам и, активируя β -аррестинные сигнальные каскады, сравнительно быстро вызывают десенситизацию рецепторов ЛГ/ХГЧ и ФСГ и, тем самым, снижают чувствительность клеток-мишеней к гонадотропинам. Среди других недостатков препаратов гонадотропинов следует отметить их высокую стоимость, подверженность процессам деградации и необходимость парентеральных способов их введения пациентам. Все вышесказанное указывает на острую необходимость разработки низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ФСГ, мишенями которых являются расположенные в трансмембранном канале аллостерические сайты и которые, по крайней мере, частично лишены присущих гонадотропинам недостатков.

Для идентификации целевых химических структур аллостерических регуляторов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ФСГ в 2000-е годы был проведен скрининг колоссального числа низкомолекулярных соединений по их активности в отношении клеток с экспрессированными в них рецепторами гонадотропинов. Наибольшие успехи были достигнуты в отношении аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ. Так, уже в 2002 г. были обнаружены соединения, относящиеся к классу тиено[2,3-d]пиримидинов, которые селективно стимулировали активность рецептора ЛГ/ХГЧ и не влияли на структурно близкие им рецепторы ФСГ и ТТГ [38]. Они также не оказывали влияния на рецептор кортикотропин-рилизинг гормона, который по паттерну сигнальных каскадов обладал значительным сходством с рецептором ЛГ/ХГЧ. Наиболее активным среди производных тиено[2,3-d]пиримидина было соединение Org41841, которое в условиях *in vitro* при воздействии на первичную культуру клеток Лейдига с высокой эффективностью стимулировало выработку ими тестостерона, а в условиях *in vivo* при различных способах введения индуцировало овуляцию у самок мышей [38]. Однако соединение Org41841, хотя и в небольшой степени, активировало рецептор ТТГ, что обусловлено высоким сходством пространственной организации аллостерических сайтов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ, локализованных в их трансмембранных каналах [18]. Необходимо отметить, что конфигурация аллостерического сайта рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ в значительной степени была установлена благодаря использованию низкомолекулярных агонистов этих рецепторов, сконструированных на основе производных тиено[2,3-d]пиримидина [19]. В дальнейшем было разработано соединение Org 43553, также являющееся производным тиено[2,3-d]пиримидина, которое было высокоспецифичным по отношению к рецептору ЛГ/ХГЧ и при этом заметно превосходило соединение Org41841 по активности [39].

Основываясь на структурных особенностях соединения Org 43553, нами в 2013–2018 гг. была синтезирована серия новых тиенопиримидиновых производных, наиболее активным из которых было соединение TP03 с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ. Эти соединения были эффективны как в условиях *in vitro*, специфично повышая активность аденилатциклазы в тестикулярных мембранах крыс и усиливая стероидогенез в первичной культуре клетках Лейдига крыс, так и в условиях *in vivo*, усиливая продукцию тестостерона при внутрибрюшинном и пероральном способах введения самцам крыс [40–44]. Важно отметить, что разработанные нами тиенопиримидиновые производные не влияли на активность рецептора ТТГ, что иллюстрируется отсутствием их эффекта на активность аденилатциклазы в мембранах, выделенных из тканей щитовидной железы, где экспрессированы рецепторы ТТГ, а также отсутствием их влияния на базальную и стимулированную тиролиберином продукцию тиреоидных гормонов [45].

Важно, что связывающие поверхности ортостерического и аллостерического сайтов в рецепторах гликопротеиновых белковых гормонов не пересекаются и пространственно независимы. Это было изящно продемонстрировано при изучении связывания ТТГ и соединения Org 43553 с гибридными рецепторами, состоящими в себе домены от рецепторов ТТГ и ЛГ/ХГЧ [39]. Активность рецептора, состоящего из эктодомена рецептора ТТГ и трансмембранного домена рецептора ЛГ/ХГЧ, повышалась при действии на него как ТТГ, так и соединения Org 43553. В то же время активность гибридного рецептора, имеющего эктодомен рецептора ЛГ/ХГЧ и трансмембранный домен рецептора ТТГ, при действии ТТГ и соединения Org 43553 не менялась [39].

Характерной чертой аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ является их способность активировать мутантные формы этого рецептора, что было показано при сравнительном изучении их влияния на активность нормального рецептора ЛГ/ХГЧ человека и его мутантных форм с заменами Ala⁵⁹³Pro и Ser⁶¹⁶Tyr. Имеются

клинические доказательства того, что эти мутации обуславливают развитие ряда репродуктивных дисфункций, в том числе идиопатической гипоплазии семенников [46, 47]. У рецепторов ЛГ/ХГЧ с заменами Ala⁵⁹³Pro и Ser⁶¹⁶Tyr нарушается фолдинг, и они теряют способность нормально встраиваться в плазматическую мембрану, оставаясь недоступными для гонадотропинов. Показано, что производные тиено[2,3-d]пиримидина, в том числе соединение Org 42599, являющееся высокоактивным аналогом Org 43553, благодаря своей липофильности легко проникают через плазматическую мембрану, что позволяет им активировать мутантные формы рецептора ЛГ/ХГЧ, неспособные встраиваться в плазматическую мембрану и потому имеющие внутриклеточную локализацию. Более того, связывание Org 42599 с аллостерическим сайтом расположенного внутри клетки мутантного рецептора приводит к стабилизации его конформации, обеспечивающей завершение фолдинга и транслокацию рецептора в плазматическую мембрану. Это делает мутантные рецепторы ЛГ/ХГЧ доступными для гонадотропинов и нормализует чувствительность репродуктивных клеток к ЛГ и ХГЧ [48].

Несмотря на то, что мишенями ФСГ, как и в случае ЛГ и ХГЧ, являются клетки семенников и яичников, а рецепторы ФСГ и ЛГ/ХГЧ сходны по своей структурно-функциональной организации, аллостерические сайты, локализованные в трансмембранном канале этих рецепторов, сильно различаются. При этом аллостерический сайт рецептора ФСГ также отличается от соответствующего сайта в рецепторе ТТГ. Вследствие этого аллостерические регуляторы рецептора ФСГ не влияют ни на рецептор ЛГ/ХГЧ, ни на рецептор ТТГ. В процессе поиска низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ФСГ были идентифицированы производные различных классов гетероциклических соединений – тиенопиримидинов, тиазолидинов, дигидропиридинов, хинолинов. Наиболее высокая активность и селективность среди них присуща соединению Org 214444-0, являющемуся производным дигидропиридинов. Это соединение в условиях *in vitro* стимулировало цАМФ-зависимые сигнальные каскады в клетках с экспрессированным в них рецептором ФСГ, а в условиях *in vivo* при введении самкам крыс стимулировало фолликулогенез [49]. Высокой специфичностью по отношению к рецептору ФСГ характеризовались тиазолидиновые производные, хотя до конца не ясно, являются ли они аллостерическими агонистами или функционируют как аллостерические модуляторы [50]. Наряду с агонистами, в последние годы разработаны аллостерические антагонисты рецептора ФСГ, среди которых наибольшая селективность и эффективность присуща двум структурно сходным соединениям ADX68692 и ADX68693 [51, 52]. Необходимо, однако, отметить, что активность имеющихся в настоящее время аллостерических агонистов и антагонистов рецептора ФСГ, в отличие от таковых рецептора ЛГ/ХГЧ, не позволяет рассматривать их как эффективные препараты для регуляции стероидогенеза, фолликулогенеза и сперматогенеза.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА

Ключевым молекулярным механизмом регуляции функциональной активности тироцитов – клеток щитовидной железы, ответственных за синтез тиреоидных гормонов, является функциональное связывание экспрессируемых в них рецепторов ТТГ с гормоном, продуцируемым тиреотрофами аденогипофиза. Наряду с ТТГ, стимулирующее влияние на рецептор ТТГ могут оказывать специфические к нему стимулирующие антитела, а также активирующие мутации в самом рецепторе ТТГ. Среди таких мутаций наибольшее значение имеют замены аминокислотных остатков во второй и третьей внеклеточных петлях, которые нарушают функциональное сопряжение между эктодоменом и трансмембранным доменом рецептора

ТТГ и, тем самым, предотвращают ингибирующее влияние эктодомена на активацию рецептором гетеротримерных G_s -белков, опосредующих стимуляцию фермента аденилатциклазы. Результатом этого является гиперактивация рецептора ТТГ, приводящая не только к тяжелым формам тиреотоксикоза, но и к гиперплазии щитовидной железы, что может стать причиной онкологических заболеваний [20]. Для ингибирования активации рецепторов ТТГ стимулирующими антителами, что приводит к болезни Грейвса, а также для снижения активности мутантных рецепторов ТТГ могут быть применены ингибирующие антитела. Однако препараты таких антител в клинику до сих пор не внедрены, что связано как со сложностью их выделения и очистки, так и с множеством побочных эффектов [53, 54].

Альтернативным путем решения этой проблемы является создание низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецептора ТТГ с активностью антагонистов и инверсионных агонистов. В последние годы были разработаны два таких соединения. Соединение ANTAG3 при введении в течение трех дней самкам мышей подавляло у них продукцию тиреоидных гормонов, стимулированную низкими дозами тиролиберина или введением стимулирующих рецептор ТТГ моноклональных антител M22. Этот эффект был ассоциирован со снижением в тироцитах экспрессии белков – тиреопероксидазы и Na/I-симпортера, ответственных за ключевые стадии синтеза тиреоидных гормонов [55]. Второе соединение, Org 274179-0, являющееся производным тетрагидрохинолина, не только ингибировало стимулирующие эффекты ТТГ, но и подавляло конституционную активность рецепторов ТТГ, имеющих активирующие мутации, причем эти эффекты реализовывались при воздействии наномолярных концентраций этого соединения [20].

Среди аллостерических агонистов рецептора ТТГ, которые могут применяться для стимуляции поглощения радиоактивного йода тироцитами при лечении рака щитовидной железы, наибольший интерес представляет группа соединений NCGC00168126–01, NCGC00161870–01, NCGC00165237–01, производных хиназолина. При воздействии на клетки, в которых был экспрессирован рецептор ТТГ, эти соединения стимулировали в них активность аденилатциклазы, о чем свидетельствовало повышение внутриклеточного уровня цАМФ, но не влияли на уровень цАМФ в клетках, где были экспрессированы рецепторы ФСГ и ЛГ/ХГЧ, что свидетельствует об их селективности по отношению к аллостерическому сайту рецептора ТТГ. При обработке культуры тироцитов указанными выше хиназолиновыми производными, отмечали повышение экспрессии генов, кодирующих тиреопероксидазу, тиреоглобулин, Na/I-симпортер, контролирующие процесс синтеза тироксина, а также повышение экспрессии и активности дейодиназы 2-го типа, катализирующей конверсию тироксина в трийодтиронин, основной эффекторный гормон тиреоидной системы [56].

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ GPCR ПО ОТНОШЕНИЮ К ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ КАСКАДАМ

В настоящее время общепринято считать, что связывание агониста с GPCR приводит к запуску сразу нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов, которые могут реализовываться через различные типы гетеротримерных G-белков, а также через белки-регуляторы G-белкового сигналинга (RGS-белки), к суперсемейству которых относятся β -аррестины, опосредующие влияние гормональных агентов на каскад митоген-активируемых протеинкиназ и 3-фосфоинозитидные пути. Необходимо отметить, что активация β -аррестинового пути является триггером процесса эндоцитоза GPCR, что приводит к протеосомной деградации рецепторов и развитию резистентности клеток-мишеней к их эндогенным агонистам. Выбор доминирующих сигнальных путей после связывания с агонистом определяется соотношением ак-

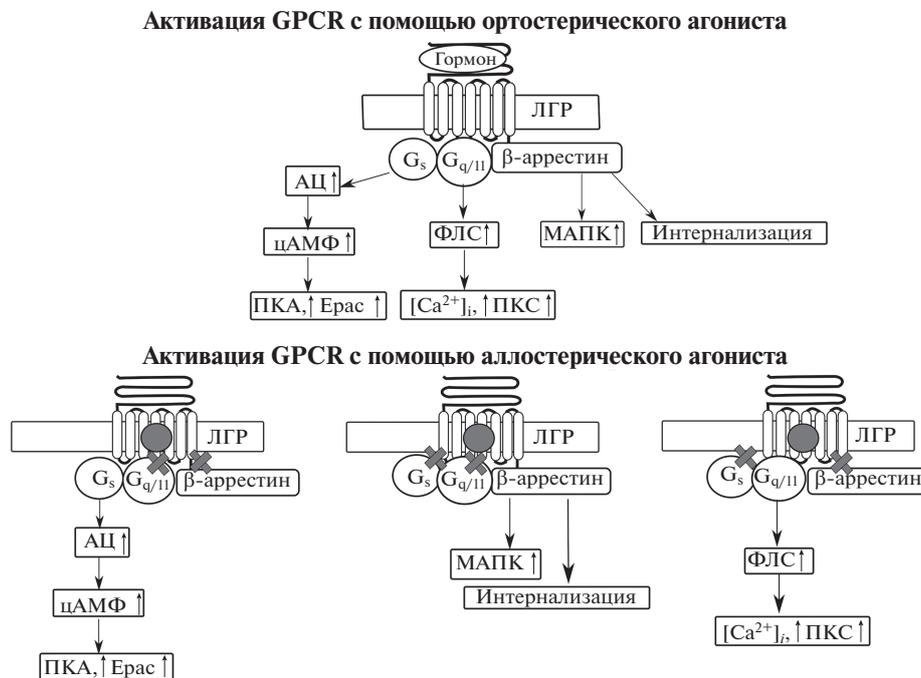


Рис. 1. Активация внутриклеточных сигнальных каскадов при связывании ортостерического или аллостерического лигандов с GPCR на примере рецептора лютеинизирующего гормона, функционально сопряженного с гетеротримерными G_s - и $G_{q/11}$ -белками и β -аррестином.

Условные обозначения: ЛГР – рецептор лютеинизирующего гормона; G_s и $G_{q/11}$ – гетеротримерные G_s - и $G_{q/11}$ -белки соответственно; АЦ – аденилатциклаза; PKA – протеинкиназа А; Erac – цАМФ-зависимый обменный фактор семейства Erac; ФЛС – фосфолипаза С; $[Ca^{2+}]_i$ – концентрация катионов кальция внутри клетки; PKC – протеинкиназа С; МАПК – митогенактивируемые протеинкиназы. Ортостерический агонист (гормон – ЛГ или ХГЧ) связывается с внеклеточным доменом рецептора, в то время как аллостерический сайт остается в этом случае свободным. Серыми кружочками внутри трансмембранного канала GPCR, обозначены аллостерические агонисты.

тивных конформаций рецептора, каждая из которых опосредует трансдукцию сигнала через определенный сигнальный каскад. Это соотношение зависит от времени нахождения GPCR в той или иной активной конформации, что, в свою очередь, определяется ее относительной стабильностью. Снижение стабильности одних активных конформаций приводит к повышению доли других, как следствие, вызывает перераспределение интенсивности сигнальных путей в клетке (рис. 1).

В большинстве случаев лиганды ортостерического сайта GPCR стабилизируют не одну, а несколько активных конформаций, соотношение которых зависит от микроокружения рецептора, особенностей его структуры (мутации, посттрансляционные модификации), а также от доступности и функциональной активности нижележащих звеньев сигнальных каскадов (рис. 1). Лишь в редких случаях эндогенные ортостерические лиганды способны селективно активировать определенные внутриклеточные каскады, как это показано для ряда рецепторов полипептидных гормонов. В качестве примера приведем хемокиновый рецептор 7-го типа (CCR7), который экспрессируется в Т-лимфоцитах и регулирует их перемещение в

лимфатические узлы и селезенку. Его эндогенными лигандами являются сразу два хемокина – CCL19 и CCL21, опосредующие активацию различного паттерна внутриклеточных каскадов в ответ на связывание их с рецептором CCR7. Показано, что активация β -аррестинового пути происходит только при связывании рецептора CCR7 с хемокином CCL19, это вызывает даун-регуляцию рецептора и предотвращает его дальнейшую активацию обоими хемокинами [57]. Различные по степени N-гликозилирования гонадотропины, которые являются различными формами этих гормонов, также отличаются по паттерну активируемых ими внутриклеточных каскадов [37].

Имеющиеся в настоящее время данные, в том числе полученные при изучении низкомолекулярных регуляторов GPCR, активируемых гипофизарными гликопротеиновыми гормонами, отчетливо демонстрируют тот факт, что наибольшим потенциалом селективной активации или ингибирования внутриклеточных каскадов обладают аллостерические регуляторы. При связывании с ними меняется стабильность и соотношение активных и неактивных конформаций рецептора. Селективные в отношении внутриклеточных каскадов регуляторы GPCR обозначают как “bias”-агонисты и “bias”-антагонисты [58]. В литературе имеется много примеров “bias”-лигандов, являющихся аллостерическими агонистами и антагонистами, а также аллостерическими модуляторами GPCR. Среди них селективные модуляторы АденР 1-го типа и ангиотензинового рецептора 1-го типа [59, 60].

Низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, такие как соединение Org 43553 и синтезированные нами тиенопиримидиновые производные, также проявляет свойства “bias”-агонистов, поскольку активируют преимущественно аденилатциклазный сигнальный каскад, ответственный за стимуляцию стероидогенеза в клетках-мишенях (рис. 1). В то же время они не влияют или очень слабо влияют на сигнальный путь, включающий $G_{q/11}$ -белок и фермент фосфолипазу C, а также на β -аррестиновый путь [39, 42]. Следствием такой селективности действия низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ является отсутствие у них ряда побочных эффектов, присущих гонадотропинам. Так, соединение Org 43553 не вызывает синдром гиперстимуляции яичников, который в случае гонадотропинов обусловлен мощной стимуляцией ими кальциевого сигналинга вследствие активации фосфолипазы C [30, 61, 62]. В свою очередь, синтезированное нами тиенопиримидиновое производное TP03 при длительном введении самцам крыс не приводило к резкому снижению у них чувствительности семенников к эндогенному ЛГ, что типично при использовании гонадотропинов и обусловлено активацией ими β -аррестинового пути [63].

Установлено, что аллостерические антагонисты GPCR гипофизарных гликопротеиновых гормонов, так же как и агонисты, являются селективными в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов. Показано, что соединения ADX68692 и ADX68693, аллостерические антагонисты рецептора ФСГ, различным образом ингибировали стимулированные ФСГ внутриклеточные эффекторные белки [51, 52]. Так, соединение ADX68692 ингибировало вызываемое ФСГ повышение уровня цАМФ и продукции стероидных гормонов – прогестерона и эстрадиола, в то время как обработка соединением ADX68693 на продукцию эстрадиола влияния не оказывала. Авторы объясняют эти различия тем, что соединение ADX68692 стимулирует β -аррестиновый каскад и усиливает интернализацию рецептора ФСГ, снижая число доступных для гонадотропина рецепторов на поверхности клетки, в то время как соединение ADX68693 на β -аррестины существенного влияния не оказывает [51, 52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизмы и мишени действия аллостерических регуляторов GPCR, в том числе рецепторов гипофизарных гликопротеиновых гормонов, имеют ряд важных особенностей, отличающих их от лигандов ортостерического сайта рецепторов. Это делает разработку аллостерических полных и инверсионных агонистов и антагонистов GPCR исключительно важной задачей как в плане установления фундаментальных основ функционирования рецепторов и зависимых от них сигнальных путей, так и в плане создания принципиально новых препаратов, регуляторов внутриклеточного сигналинга, востребованных в фармакологии и эндокринологии.

Среди наиболее важных особенностей аллостерических регуляторов GPCR можно выделить следующие:

1) Аллостерические регуляторы способны различным образом воздействовать даже на сходные в структурно-функциональном плане подтипы GPCR. Это обусловлено различиями в структуре и локализации их аллостерических сайтов и предопределяет высокую селективность связывания с ними аллостерических регуляторов, в то время как ортостерические сайты рецепторов характеризуются сходством структурной организации и потому “плохо различимы” для специфичных к ним лигандов.

2) Различия в механизмах действия между аллостерическими регуляторами с активностью агонистов, инверсионных агонистов и антагонистов и аллостерическими модуляторами предоставляет широкие, практически неограниченные возможности для выбора стратегии поиска новых фармакологических регуляторов базальной и стимулированной гормональными агентами активности GPCR.

3) Разработка аллостерических антагонистов и инверсионных агонистов является единственно возможным фармакологическим подходом для ингибирования GPCR полипептидных гормонов, для которых отсутствуют антагонисты и инверсионные агонисты ортостерического сайта, а также тех рецепторов, которые гиперактивированы вследствие активирующих мутаций или их аутоиммунной стимуляции.

4) Аллостерические регуляторы являются высокоселективными в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, функционируя как “bias”-лиганды, что обусловлено их способностью стабилизировать определенные активные или неактивные конформации рецептора. Это позволяет создавать таргетные гормональные регуляторы, которые лишены ряда побочных эффектов, присущих эндогенным регуляторам GPCR и обусловленных множественной, неселективной активацией внутриклеточных сигнальных каскадов.

Все эти особенности успешно реализованы при разработке широкой “линейки” низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ, и в первую очередь, при создании высокоселективных агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на основе тиенопиримидиновых производных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-04-00126) и частичной поддержке государственного задания АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Conn P.J., Christopoulos A., Lindsley C.W.* Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8(1): 41–54. 2009.
2. *Wold E.A., Chen J., Cunningham K.A., Zhou J.* Allosteric modulation of class A GPCRs: targets, agents, and emerging concepts. *J. Med. Chem.* doi 2018.10.1021/acs.jmedchem.8b00875

3. *Gurrath M.* Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Curr. Med. Chem.* 8(13): 1605–1648. 2001.
4. *Foster D.J., Conn P.J.* Allosteric modulation of GPCRs: new insights and potential utility for treatment of schizophrenia and other CNS disorders. *Neuron.* 94(3): 431–446. 2017.
5. *Dopart R., Lu D., Lichtman A.H., Kendall D.A.* Allosteric modulators of cannabinoid receptor 1: developing compounds for improved specificity. *Drug Metab. Rev.* 50(1): 3–13. 2018.
6. *Wold E.A., Zhou J.* GPCR allosteric modulators: mechanistic advantages and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 18(23): 2002–2006. 2018.
7. *Gentry P.R., Sexton P.M., Christopoulos A.* Novel allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 290(32): 19478–19488. 2015.
8. *DeVree B.T., Mahoney J.P., Vélez-Ruiz G.A., Rasmussen S.G., Kuszak A.J., Edwald E., Fung J.J., Manglik A., Masureel M., Du Y., Matt R.A., Pardon E., Steyaert J., Kobilka B.K., Sunahara R.K.* Allosteric coupling from G protein to the agonist-binding pocket in GPCRs. *Nature.* 535(7610): 182–186. 2016.
9. *Lu S., Zhang J.* Small molecule allosteric modulators of G-protein-coupled receptors: drug-target interactions. *J. Med. Chem.* 62(1): 24–45. 2019.
10. *Tee W.-V., Guarnera E., Berezovsky I.N.* Reversing allosteric communication: from detecting allosteric sites to inducing and tuning targeted allosteric response. *PLOS Comput. Biol.* 14(6): e1006228. 2018.
11. *Topiol S.* New opportunities for GPCR allosteric modulators. *Future Med. Chem.* 10(7): 707–710. 2018.
12. *Shpakov A.O.* Advances in the study of structure and function of G protein-coupled receptors (about awarding the Nobel Prize for Chemistry in 2012 to Robert Lefkowitz and Brian Kobilka). *J. Evol. Biochem. Physiol.* 49(5): 469–480. 2013.
13. *Carpenter B., Lebon G.* Human adenosine A_{2A} receptor: molecular mechanism of ligand binding and activation. *Front Pharmacol.* 8: 898. 2017.
14. *Barbanti P., Aurilia C., Egeo G., Fofi L., Palmirota R.* Serotonin receptor targeted therapy for migraine treatment: an overview of drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 26(3): 269–277. 2017.
15. *Shpakov A.O.* Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *J. Amino Acids.* 2011: 656051. 2011.
16. *Tressel S.L., Koukos G., Tchernychev B., Jacques S.L., Covic L., Kuliopulos A.* Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based peptidic modulators in disease models. *Methods Mol. Biol.* 683: 259–275. 2011.
17. *Shpakov A.O., Shpakova E.A.* The prospects for use of peptides and their derivatives, structurally corresponding to the G protein-coupled receptors, in medicine. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 8(1): 19–26. 2014.
18. *Jäschke H., Neumann S., Moore S., Thomas C.J., Colson A.O., Costanzi S., Kleinau G., Jiang J.K., Paschke R., Raaka B.M., Krause G., Gershengorn M.C.* A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). *J. Biol. Chem.* 281(15): 9841–9844. 2006.
19. *Moore S., Jaeschke H., Kleinau G., Neumann S., Costanzi S., Jiang J.K., Childress J., Raaka B.M., Colson A., Paschke R., Krause G., Thomas C.J., Gershengorn M.C.* 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(13): 3888–3896. 2006.
20. *van Koppen C.J., de Gooyer M.E., Karstens W.J., Plate R., Conti P.G., van Achterberg T.A., van Amstel M.G., Brands J.H., Wat J., Berg R.J., Lane J.R., Miltenburg A.M., Timmers C.M.* Mechanism of action of a nanomolar potent, allosteric antagonist of the thyroid-stimulating hormone receptor. *Br. J. Pharmacol.* 165(7): 2314–2324. 2012.
21. *Christopoulos A., Changeux J.P., Catterall W.A., Fabbro D., Burris T.P., Cidlowski J.A., Olsen R.W., Peters J.A., Neubig R.R., Pin J.P., Sexton P.M., Kenakin T.P., Ehlert F.J., Spedding M., Langmead C.J.* International union of basic and clinical pharmacology. XC. Multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. *Pharmacol. Rev.* 66(4): 918–947. 2014.
22. *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.
23. *Dinh W., Albrecht-Küpper B., Gheorghide M., Voors A.A., van der Laan M., Sabbah H.N.* Partial adenosine A₁ agonist in heart failure. *Handb. Exp. Pharmacol.* 243: 177–203. 2017.
24. *Glukhova A., Thal D.M., Nguyen A.T., Vecchio E.A., Jörg M., Scammells P.J., May L.T., Sexton P.M., Christopoulos A.* Structure of the adenosine A₁ receptor reveals the basis for subtype selectivity. *Cell.* 168(5): 867–877. 2017.

25. Wild C., Cunningham K.A., Zhou J. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: an emerging approach of drug discovery. *Austin. J. Pharmacol. Ther.* 2(1): pii: 1101. 2014.
26. Feng Z., Hu G., Ma S., Xie X.Q. Computational advances for the development of allosteric modulators and bitopic ligands in G protein-coupled receptors. *AAPS J.* 17(5): 1080–1095. 2015.
27. Nataraja S., Sriraman V., Palmer S. Allosteric regulation of the follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology.* 159(7): 2704–2716. 2018.
28. Kruse A.C., Ring A.M., Manglik A., Hu J., Hu K., Eitel K., Hübner H., Pardon E., Valant C., Sexton P.M., Christopoulos A., Felder C.C., Gmeiner P., Steyaert J., Weis W.I., Garcia K.C., Wess J., Kobilka B.K. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 504(7478): 101–106. 2013.
29. Abdel-Magid A.F. Allosteric modulators: an emerging concept in drug discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* 6(2): 104–107. 2015.
30. van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R.G. 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. 2009.
31. Livingston K.E., Traynor J.R. Allosterism at opioid receptors: modulation with small molecule ligands. *Br. J. Pharmacol.* 175(14): 2846–2856. 2017.
32. Puett D., Angelova K., da Costa M.R., Warrenfeltz S.W., Fanelli F. The luteinizing hormone receptor: insights into structure-function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 329(1–2): 47–55. 2010.
33. Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A., Biebertmann H., Marcinkowski P., Scheerer P., Krause G. Structural-functional features of the thyrotropin receptor: A class a G-protein-coupled receptor at work. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 8: 86. 2017.
34. Шпаков А.О. Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология.* 57(3): 167–176. 2015. [Shpakov A.O. New achievements in the development and study of mechanisms of action of the low-weight-molecular agonists of the receptors of the thyrotropin and luteinizing hormones. *Tsitologiya.* 57(3): 167–176. 2015. (In Russ.)].
35. Shpakov A.O. Pharmacological approaches for correction of thyroid dysfunctions in diabetes mellitus. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* 11(4): 349–362. 2017.
36. Шпаков А.О. Гонадотропины – от теории к клинической практике. СПб. Политех-Пресс. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. [Shpakov A.O. Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike [Gonadotropins – from theory to clinic practice]. SPb. Polytech-Press. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. (In Russ.)].
37. Шпаков А.О. Гликозилирование гонадотропинов, как важнейший механизм регуляции их активности. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 103(9): 1004–1021. 2017. [Shpakov A.O. Glycosylation of gonadotropins, as the most important mechanism of regulation of their activity. *Russ. J. Physiol.* 103(9): 1004–1021. 2017. (In Russ.)].
38. van Straten N.C.R., Schoonus-Gerritsma G.G., Van Someren R.G., Draaijer J., Adang A.E.P., Timmers C.M., Hanssen R.G.J.M., Van Boeckel C.A.A. The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyrimidines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chem. Bio. Chem.* 10: 1023–1026. 2002.
39. van Koppen C.J., Zaman G.J.R., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 378(5): 503–514. 2008.
40. Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S., Shpakov A.O. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl. Biol. Sci.* 459(1): 326–329. 2014.
41. 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: Memb. Cell Biol.* 10(4): 294–300. 2016.
42. 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.
43. Shpakov A.O., Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S. Activation of adenylyl cyclase by thienopyrimidine derivatives in rat testes and ovaries. *Cell Tissue Biol.* 8(5): 400–406. 2014.
44. Бахтюков А.А., Соколова Т.В., Дарьин Д.В., Деркач К.В., Шпаков А.О. Сравнительное изучение стимулирующего эффекта низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина на стероидогенез в клетках Лейдига крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 103(10): 1181–1192. 2017. [Bakhtyukov A.A., Sokolova T.V., Dar'in D.V., Derkach K.V., Shpakov A.O. The comparative study of the stimulating effect of low-weight-

- molecular agonist of the luteinizing hormone receptor and the human chorionic gonadotropin on the steroidogenesis in the rat Leydig cells. *Russ. J. Physiol.* 103(10): 1181–1192. 2017. (In Russ.).
45. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Тиенопиримидиновые производные специфично активируют стероидогенез в семенниках, но не влияют на функции щитовидной железы. *Журн. эвол. биохим. физиол.* 55(1): 26–34. 2019a. [Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. The thienopyrimidine derivatives specifically activate the steroidogenesis in the testes, but has not effect on the thyroid functions. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 55(1): 26–34. 2019a (In Russ.).]
 46. Kremer H., Kraaij R., Toledo S.P., Post M., Fridman J.B., Hayashida C.Y., van Reen M., Milgrom E., Ropers H.H., Mariman E., Thelen A.P.N., Brunner H.G. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat. Genet.* 9(2): 160–164. 1995.
 47. Latronico A.C., Anasti J., Arnhold I.J., Rapaport R., Mendonca B.B., Bloise W., Castro M., Tsigos C., Chrousos G.P. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 334(8): 507–512. 1996.
 48. Newton C.L., Whay A.M., McArdle C.A., Zhang M., van Koppen C.J., van de Lagemaat R., Segaloff D.L., Millar R.P. Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(17): 7172–7176. 2011.
 49. van Koppen C.J., Verbost, P.M., van de Lagemaat R., Karstens W.-J.F., Loozen H.J.J., van Achterberg T.A.E., van Amstel M.G., Brands J.H., van Doornmalen E.J., Wat J., Mulder S.J., Raafs B.C., Verkaik S., Hanssen R.G., Timmers C.M. Signaling of an allosteric, nanomolar potent, low molecular weight agonist for the follicle-stimulating hormone receptor. *Biochem. Pharmacol.* 85(8): 1162–1170. 2013.
 50. Arey B.J., Yanofsky S.D., Claudia Perez M., Holmes C.P., Wrobel J., Gopalsamy A., Stevis P.E., Lopez F.J., Winneker R.C. Differing pharmacological activities of thiazolidinone analogs at the FSH receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368(3): 723–728. 2008.
 51. Dias J.A., Campo B., Weaver B.A., Watts J., Kluetzman K., Thomas R.M., Bonnet B., Mutel V., Poli S.M. Inhibition of follicle-stimulating hormone-induced preovulatory follicles in rats treated with a nonsteroidal negative allosteric modulator of follicle-stimulating hormone receptor. *Biol. Reprod.* 90(1): 19. 2014.
 52. Ayoub M.A., Yvinec R., Jégot G., Dias J.A., Poli S.M., Poupon A., Crépieux P., Reiter E. Profiling of FSHR negative allosteric modulators on LH/CGR reveals biased antagonism with implications in steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 436: 10–22. 2016.
 53. Costagliola S., Franssen J.D., Bonomi M., Urizar E., Willnich M., Bergmann A., Vassart G. Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299(5): 891–896. 2002.
 54. Davies T.F., Latif R. Targeting the thyroid-stimulating hormone receptor with small molecule ligands and antibodies. *Expert Opin. Ther. Targets.* 19(6): 835–847. 2015.
 55. Neumann S., Nir E.A., Eliseeva E., Huang W., Marugan J., Xiao J., Dulcey A.E., Gershengorn M.C. A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. *Endocrinology.* 155(1): 310–304. 2014.
 56. Neumann S., Huang W., Titus S., Krause G., Kleinau G., Alberobello A.T., Zheng W., Southall N.T., Inglese J., Austin C.P., Celi F.S., Gavrilova O., Thomas C.J., Raaka B.M., Gershengorn M.C. Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(30): 12471–12476. 2009.
 57. Kohout T.A., Nicholas S.L., Perry S.J., Reinhart G., Junger S., Struthers R.S. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J. Biol. Chem.* 279(22): 23214–23222. 2004.
 58. Smith J.S., Lefkowitz R.J., Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17(4): 243–260. 2018.
 59. Violin J.D., Lefkowitz R.J. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28(8): 416–422. 2007.
 60. Aurelio L., Valant C., Flynn B.L., Sexton P.M., Christopoulos A., Scammells P.J. Allosteric modulators of the adenosine A1 receptor: synthesis and pharmacological evaluation of 4-substituted 2-amino-3-benzoylthiophenes. *J. Med. Chem.* 52(14): 4543–4547. 2009.
 61. 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.
 62. Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98(4): 1558–1566. 2013.

63. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Стероидогенный эффект низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при его введении самцам крыс. Докл. акад. наук. 484(6): 000–000. 2019б. (в печати). [Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. The steroidogenic effect of the low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its administration into male rats. Dokl. Biochem. Biophys. 484(6): 000–000. 2019b (In press)].

The Low-Molecular-Weight Allosteric Regulators of G-Protein-Coupled Receptors of the Polypeptide Hormones

A. A. Bakhtyukov^a, A. O. Shpakov^{a, *}

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

**e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Abstract—G protein-coupled receptors (GPCRs) are the largest family of sensory proteins that mediate the regulatory effects of different hormonal agents on the cell. Along with the orthosteric site, through which the receptor binds specifically to endogenous ligands, there are allosteric sites, usually localized in the extracellular and cytoplasmic loops of GPCR. However, in the GPCRs of the polypeptide hormones, where ligand binding occurs within a large-sized ectodomain, the allosteric sites can be located in their transmembrane channel, where in most other GPCR the orthosteric site is located. The allosteric regulators can function as full and inversion agonists and antagonists, or modulate the regulatory effects of hormones. Since even in the structurally and functionally related receptors, the allosteric sites can vary greatly, the regulators interacting with them are characterized by high receptor specificity as compared to the ligands of orthosteric site. Moreover, the allosteric regulators stabilize only certain active conformations of the receptor and, thus, are able to selectively stimulate or, on the contrary, suppress the activity of certain intracellular signaling cascades. The greatest success has been achieved in the development of low-molecular-weight allosteric regulators of receptors of pituitary glycoprotein hormones, which is extremely important to treat diseases of the reproductive and thyroid systems. This review focuses on the current state of the problem of the allosteric regulators of GPCR activated by the polypeptide hormones, and the advances in their development.

Keywords: allosteric regulator, G protein-coupled receptor, low-molecular-weight agonist, allosteric site, luteinizing hormone receptor

ЦИТИРОВАТЬ:

Бахтюков А.А., Шпаков А.О. Низкомолекулярные аллостерические регуляторы G-белок-сопряженных рецепторов полипептидных гормонов. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 105(3): 269–283.

DOI: 10.1134/S0869813919030014

TO CITE THIS ARTICLE:

Bakhtyukov A.A., Shpakov A.O. The Low-Molecular-Weight Allosteric Regulators of G-Protein-Coupled Receptors of the Polypeptide Hormones. Russian Journal of Physiology. 105(3): 269–283.

DOI: 10.1134/S0869813919030014