

НОВЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В РАЗРАБОТКЕ И ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ТИРЕОТРОПНОГО И ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНОВ

© А. О. Шпаков

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: alex_shpakov@list.ru*

Гипофизарные гликопротеиновые гормоны — лютеинизирующий (ЛГ) и тиреотропный (ТТГ) — осуществляют свое регуляторное действие на клетку через сопряженные с G-белками рецепторы, специфически связываясь с их внеклеточным доменом. Существует и альтернативный путь активации рецепторов ЛГ и ТТГ, когда низкомолекулярные органические молекулы связываются с аллостерическим сайтом рецептора, локализованным внутри его трансмембранного канала. Низкомолекулярные агонисты имеют ряд преимуществ в сравнении с гликопротеиновыми гормонами: высокая эффективность не только при парентеральном, но и при пероральном способе введения, низкая иммуногенность, химическая стабильность, более низкая стоимость. В отличие от гипофизарных гликопротеиновых гормонов, наделенных активностью агонистов, низкомолекулярные соединения могут быть не только агонистами, но также инверсионными агонистами и нейтральными антагонистами. Недавно было показано, что низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ способны стимулировать мутантные его формы, восстанавливая процессинг рецептора в клетке и повышая его чувствительность к ЛГ, что важно при лечении репродуктивных дисфункций, вызванных мутациями в рецепторе ЛГ. В настоящем обзоре обобщены достижения последних лет по разработке низкомолекулярных регуляторов рецепторов ТТГ и ЛГ и изучению молекулярных механизмов их действия. В нем также представлены собственные данные по созданию низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ на основе тиенопиримидинов, которые эффективны как *in vitro*, так и *in vivo* при различных способах введения.

Ключевые слова: аллостерический сайт, лютеинизирующий гормон, низкомолекулярный агонист, рецептор, тиенопиримидин, тиреотропный гормон.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, ВП — внеклеточная петля, ГСЯ — гиперстимуляция яичников, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ТТГ — тиреотропный гормон, ФЛС — фосфолипаза С, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, GPCR — сопряженные с G-белками рецепторы.

Рецепторы гипофизарных гликопротеиновых ЛГ и ТТГ относятся к семейству А сопряженных с G-белками рецепторов серпантинного типа (GPCR — G protein-coupled receptors). Эволюция GPCR, относящихся к семейству А, насчитывает около 700 млн лет, и все они характеризуются сходством структурно-функциональной организации и топологии в мембране (Strotmann et al., 2011). Для них характерно наличие значительного по размеру внеклеточного N-концевого домена, сравнительно небольшого внутриклеточного C-концевого домена, а также семи гидрофобных трансмембранных участков, которые пронизывают плазматическую мембрану и образуют трансмембранный канал. Трансмембранные участки соединены тремя цитоплазматическими и тремя внеклеточными петлями (ВП). В большинстве GPCR, относящихся к семейству А, высокоаффинное связывание гормона происходит внутри трансмембранного канала, в котором расположен лигандсвязывающий сайт рецептора, в то время как ВП и сравнительно короткий N-концевой участок вовлечены в узнавание и низкоаффинное связывание гормональной молекулы. Связывание лиганда с ре-

цептором приводит к изменению конформации трансмембранного канала и структурно связанных с ним цитоплазматических участков, что влияет на их функциональное взаимодействие с гетеротримерными G-белками. В результате последние переходят в активированное, ГТФ-связанное состояние, следствием чего является изменение активности ферментов, генерирующих вторичные посредники, и G-белокзависимых ионных каналов, ответственных за регуляцию фундаментальных клеточных процессов.

В случае рецепторов ТТГ и ЛГ механизмы гормональной активации несколько иные. Гликопротеиновый гормон с высоким сродством связывается с ортостерическим сайтом рецептора, который расположен в значительном по размеру эктодомене. Это вызывает волну конформационных перестроек, в которую вовлекаются трансмембранный канал с расположенным в нем аллостерическим сайтом (а не ортостерическим, как в большинстве GPCR) и функционально связанные с ним цитоплазматические петли, формирующие G-белоксвязывающую поверхность рецептора (Kleinau, Krause, 2009; Troppmann et al., 2013).

В 2002 г. с помощью скрининга десятков тысяч химических соединений были обнаружены первые низкомолекулярные лиганды — производные тиенопиримидинов, которые обладали способностью проникать в трансмембранный канал рецептора ЛГ, специфично взаимодействовать с расположенным в нем аллостерическим сайтом и активировать, таким образом, зависимые от ЛГ внутриклеточные сигнальные клетки (Van Straten et al., 2002). На основе структуры этих лигандов позднее были разработаны низкомолекулярные агонисты и антагонисты рецептора ТТГ, что открыло принципиально новое направление в фармакологии эндокринных заболеваний, вызванных нарушениями в гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси (Heitman, Ijzerman, 2008; Шпаков, Шпакова, 2010; Lane, Ijzerman, 2013).

Низкомолекулярные лиганды рецептора ТТГ с активностью агонистов

Эндогенным лигандом рецептора ТТГ является секретруемый тиреотрофами передней доли гипофиза ТТГ, состоящий из двух субъединиц — высококонсервативной среди гипофизарных гликопротеиновых гормонов α -субъединицы и более вариабельной β -субъединицы, определяющей специфичное связывание гормона с рецептором. В условиях патологии в качестве эндогенных активаторов рецептора ТТГ могут выступать стимулирующие аутоантитела, выработанные на антигенные детерминанты, локализованные в эктодоме рецептора. Показано, что рецептор ТТГ может находиться в двух конформациях — «закрытой» (неактивной) и «открытой» (наделенной конститутивной активностью), между которыми наблюдается динамическое равновесие. В «открытой» конформации рецептор ТТГ наделен базальной активностью, что связано с его способностью функционально взаимодействовать с гетеротримерными G-белками, через которые осуществляется стимуляция ферментов — аденилатциклазы (АЦ) и фосфолипазы С (ФЛС). Характерная для рецептора ТТГ способность проявлять базальную активность достаточно редко встречается среди GPCR (Cetani et al., 1996).

При связывании с ТТГ «открытая» конформация рецептора стабилизируется, что приводит к усилению его взаимодействия с G-белками, активации сопряженных с G-белками АЦ и ФЛС и, как следствие, к запуску цАМФ-зависимых сигнальных каскадов, синтезу инозитолтрифосфата и повышению внутриклеточной концентрации катионов кальция. В основе этого процесса лежит высвобождение трансмембранного домена из комплекса с эктодомом при связывании последнего с гормоном (Troppmann et al., 2013). Удаление эктодомена и мутации его участков, ответственных за связывание ТТГ, переводят рецептор в конститутивно активное состояние, что в значительной степени повышает его базальную активность (Zhang et al., 2000; Kleinau, Krause, 2009). Возможен и другой механизм активации рецептора ТТГ. В соответствии с ним эктодомен специфически связывается с ТТГ и приобретает способность взаимодействовать с активирующим участком, расположенным на границе эктодомена и первого трансмембранного участка, что приводит к активации G-белков и контролируемых через них внутриклеточных сигнальных каскадов. В этом случае комплекс эктодомена и ТТГ выступает в роли агониста рецептора ТТГ (Szkudlinski et al., 2002).

Первые низкомолекулярные лиганды рецептора ТТГ были открыты в 2006 г. при тестировании биологической активности тиенопиримидиновых производных, аналогов соединения Org 43553, которые ранее были охарактеризованы как агонисты рецептора ЛГ (Moore et al., 2006). Рабочая гипотеза состояла в том, что, поскольку рецепторы ТТГ и ЛГ сходны по структурно-функциональной организации, то и лиганды, разработанные для рецептора ЛГ, способны взаимодействовать с аллостерическим сайтом рецептора ТТГ. При исследовании серии замещенных тиено[2,3-d]пиримидинов было показано, что соединение Org 41841 и его структурный аналог *N*-метил-бутил-5-амино-4-(3-метоксифенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксилат, в котором атом азота в амидной группе замещен на атом кислорода, не только являются частичными агонистами рецептора ЛГ, но и активируют, хотя и со сравнительно низкой эффективностью, рецептор ТТГ (Moore et al., 2006). Связывание с одним и тем же лигандом рецепторов ЛГ и ТТГ позволило предположить сходство их аллостерических сайтов. На основе данных о пространственной организации трансмембранного канала рецептора ЛГ, а также с учетом результатов изучения биологической активности химерных рецепторов, включающих в себя различные трансмембранные участки рецепторов ЛГ и ТТГ, была построена пространственная модель для аллостерического сайта рецептора ТТГ (Jaschke et al., 2006; Hoyer et al., 2013). Было установлено, что аллостерический сайт в рецепторе ТТГ сформирован аминокислотными остатками, расположенными в третьем, четвертом, пятом, шестом и седьмом трансмембранных участках, и сверху прикрыт второй ВП. В отличие от рецептора ЛГ вход в аллостерический сайт рецептора ТТГ более узкий и гидрофобный. Это связано с тем, что в его формировании принимают участие высокогидрофобные и значительные по размеру аминокислотные остатки, расположенные в интерфейсах между второй ВП и соседними с ней четвертым и пятым гидрофобными участками, а также третьей ВП и шестым трансмембранным участком.

Далее на основе данных о пространственной структуре аллостерического сайта рецептора ТТГ Сьюзан Нойман и ее коллеги, работающие в группе Марвина Гершенгорна, разработали низкомолекулярные агонисты этого рецептора (Neumann et al., 2009; Neumann, Gershengorn, 2011). В результате скрининга большого числа веществ было идентифицировано соединение *N*-(4-(5-(3-(фуран-2-илметил)-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-2-ил)-2-метоксибензилокси)фенил)ацетамид (NCGC00168126-01), которое обладало активностью полного агониста рецептора ТТГ. При действии на клетки с экспрессированным рецептором ТТГ в концентрации 10^{-7} — 10^{-5} М оно повышало в них уровень цАМФ ($EC_{50} = 660$ нМ) и по эффективности было сопоставимо с ТТГ. Биологическое тестирование более 100 аналогов соединения NCGC00168126-01 позволило обнаружить еще более эффективный агонист рецептора ТТГ — *N*-(4-(5-(3-бензил-5-гидрокси-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-2-ил)-2-метоксибензилокси)фенил)ацетамид (соединение NCGC00165237-01), которое стимулировало активность АЦ ($EC_{50} = 40$ нМ). Оба соединения были высокоизбирательными по отношению к рецептору ТТГ и существенно не влияли на стимуляцию АЦ гонадотропинами в клетках с экспрессированными рецепторами ЛГ и ФСГ.

Для доказательства того, что низкомолекулярные агонисты взаимодействуют только с аллостерическим

сайтом рецептора ТТГ, изучили влияние соединения NCGC00165237-01 на активность мутантного рецептора, лишённого N-концевого эктодомена и потому нечувствительного к ТТГ. В клетках с экспрессированным мутантным рецептором ТТГ максимальное стимулирующее АЦ действие этого соединения менялось незначительно (снижалось на 17%), хотя значение EC_{50} при этом повышалось до 1.7 мкМ. Полученные данные указывают на то, что низкомолекулярные агонисты функционально взаимодействуют исключительно с расположенным в трансмембранном канале аллостерическим сайтом. Эффективность такого взаимодействия снижается в случае мутантного рецептора, лишённого эктодомена, что, как полагают, связано со стабилизирующим влиянием последнего на конформацию аллостерического сайта. В то же время замена на аланин локализованного в пятом трансмембранном участке остатка аспарагина ($N^{5.47}A$), образующего водородную связь с гидроксильными группами 5-гидрокси-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолина, приводила к блокированию стимулирующего АЦ действия соединения NCGC00165237-01 при сохранении соответствующего действия ТТГ. Таким образом, аминокислотные остатки, которые формируют аллостерический сайт рецептора ТТГ и взаимодействуют с низкомолекулярными агонистами, критичны для их биологической активности, но слабо или вовсе не влияют на активацию рецептора гормоном, который связывается с ортостерическим сайтом, локализованным в эктодомене (Neumann et al., 2009).

Установлено, что соединение NCGC00165237-01 почти полностью повторяет биологическое действие ТТГ. Так, инкубация тироцитов человека в течение 24 ч с NCGC00165237-01 (30 мкМ) приводила к такому же повышению экспрессии тиреоглобулина, что и при их обработке с помощью 18 нМ ТТГ (Neumann et al., 2009). Соединение NCGC00165237-01 также повышало экспрессию других зависимых от ТТГ генов, кодирующих тиреопероксидазу, Na^+/I^- -симпортеры и дейодиназу 2-го типа, хотя и менее эффективно в сравнении с ТТГ. В случае дейодиназы 2-го типа повышалась не только экспрессия гена, но и функциональная активность фермента, что приводило к усилению превращения тироксина в трийодтиронин. При внутрибрюшинном введении мышам соединения NCGC00165237-01 в дозе 0.5 мг или перорально в дозе 2.5 мг наблюдали значительное повышение уровня общего тироксина, которое в случае внутрибрюшинного введения было сопоставимым с таковым при введении ТТГ. Было отмечено значительное повышение поглощения радиоактивного иода щитовидной железой крыс, что связано со стимуляцией экспрессии гена, кодирующего тиреоглобулин — прекурсор тиреоидных гормонов, а также гена для фермента тиреопероксидазы, которая катализирует связывание иода с остатками тирозина в молекуле тиреоглобулина (Neumann et al., 2009). Разработка низкомолекулярных агонистов рецептора ТТГ является перспективным направлением для создания лекарств, которые могут заменить рекомбинантный ТТГ при диагностике метастазов и рецидивов рака щитовидной железы. Существующий тест основан на стимуляции рекомбинантным ТТГ человека поглощения ^{131}I у пациентов с различными формами рака щитовидной железы (Duntas, Cooper, 2008; Galofre et al., 2013). Однако из-за сравнительно низкого сродства связывания рекомбинантного ТТГ с рецепторами требуются большие количества дорогостоящего гормона, а его введение возможно только парентераль-

ным путем. Вследствие этого низкомолекулярные агонисты, такие как соединение NCGC00165237-01, могут быть хорошей альтернативой рекомбинантному ТТГ в качестве стимуляторов поглощения радиоактивного иода.

Установлено, что низкомолекулярные агонисты способны активировать дефектные формы рецептора ТТГ, имеющие мутации в лигандсвязывающих участках эктодомена и потому нечувствительные к ТТГ (Allen et al., 2011). В клетках НЕК-ЕМ293 с экспрессированными в них мутантными формами рецептора ТТГ (замены $C^{41}S$ или $L^{252}P$ в эктодомене) низкомолекулярный агонист С2 повышал уровень цАМФ, в то время как ТТГ в этом случае был неактивен. Мутация $L^{467}P$ в аллостерическом сайте рецептора, препятствующая его нормальному связыванию с низкомолекулярным агонистом, полностью блокировала стимулирующее влияние последнего на активность АЦ (Allen et al., 2011). Эти данные указывают на то, что низкомолекулярные агонисты рецептора ТТГ могут быть использованы при субклиническом гипотиреозе, который часто ассоциирован с резистентностью тканей щитовидной железы к действию ТТГ вследствие инактивирующих мутаций в эктодомене рецептора ТТГ.

Низкомолекулярные лиганды рецептора ТТГ с активностью антагонистов и инверсионных агонистов

Создание низкомолекулярных регуляторов рецептора ТТГ с активностью полных антагонистов или инверсионных агонистов является еще более актуальной задачей для практической медицины, чем разработка низкомолекулярных агонистов (Neumann, Gershengorn, 2011). Установлено, что при гипертиреоидных состояниях, в первую очередь при болезни Грейвса, активирующие рецептор ТТГ антитела приводят к гиперстимуляции щитовидной железы и в значительной степени повышают концентрацию тиреоидных гормонов, нарушая функционирование всей гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси (Rapoport, McLachlan, 2007). В настоящее время эффективные способы лечения гипертиреозидизма отсутствуют, а применяемые для этого подходы являются, как правило, инвазивными и направлены на лечение последствий заболевания, а не на ликвидацию его первопричин (Bahn, 2012). Главная проблема здесь в отсутствии эффективных препаратов, наделенных свойствами антагонистов рецептора ТТГ.

На основании предложенной модели аллостерического сайта рецептора ТТГ в 2008 г. было открыто соединение NIDDK/CEB-52, (*E*)-*N*-метил-бутил-5-амино-4-(4-(3-метоксипроп-1-енил)фенил)-2-(метилтио)пиридино[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, обладающее свойствами высокоселективного антагониста рецептора ТТГ (Neumann et al., 2008). Для повышения гидрофобности в *para*-положение фенильного радикала ввели метоксипропиленовую группу, которая способствовала проникновению соединения NIDDK/CEB-52 в аллостерический сайт рецептора. В присутствии 30 мкМ соединения NIDDK/CEB-52 стимулирующее влияние ТТГ на активность АЦ снижалось на 71%, а значение IC_{50} для его ингибирующего эффекта составило 4.2 мкМ. Инкубация клеток НЕК-ЕМ293 с экспрессированным в них рецептором ТТГ с соединением NIDDK/CEB-52 (30 мкМ) приводила к ингибированию на 28—79% повышения уровня цАМФ, вызываемого активирующими антителами, кото-

рые были выделены из сыворотки крови пациентов, страдающих гипертиреозом — болезнью Грейвса. Инкубация тироцитов человека одновременно с ТТГ и соединением NIDDK/СЕВ-52 (10 мкМ) в течение 1 сут приводила к трехкратному снижению вызываемой ТТГ экспрессии гена, кодирующего тиреопероксидазу, в сравнении с тироцитами, которые были обработаны только одним ТТГ. При этом активности NIDDK/СЕВ-52 как агониста рецептора ТТГ выявлено не было, что крайне важно. Следует, однако, отметить, что, несмотря на сравнительно высокую избирательность по отношению к рецептору ТТГ, соединение NIDDK/СЕВ-52 оказывало небольшое по величине стимулирующее влияние на функциональную активность рецептора ЛГ, действуя как его частичный агонист, что в условиях клиники может привести к побочным эффектам (Neumann et al., 2008). Это потребовало дальнейших исследований по созданию низкомолекулярных антагонистов рецептора ТТГ, неактивных в отношении рецепторов гонадотропинов.

Первый шаг в этом направлении был сделан Сюзан Нойман и ее коллегами в 2010 г. (Neumann et al., 2010). При изучении биологической активности структурных аналогов NCGC00165237-01 было обнаружено 11 соединений, которые в различной степени, но с высокой избирательностью подавляли сигнальные функции рецептора ТТГ. Наибольший интерес среди них представляло соединение NCGC00161856 — 2-(3-((2,6-диметилфеноксид)метил)-4-метоксифенил)-3-(фуран-2-илметил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-он, которое по активности было отнесено к частичным агонистам рецептора ТТГ. В отличие от соединения NIDDK/СЕВ-52, которое блокировало только стимулирующее действие ТТГ, NCGC00161856 подавляло также базальную, независимую от агониста, активность рецептора ТТГ. Оно на 58 % снижало базальную активность рецептора ТТГ ($IC_{50} = 3$ мкМ) и на 86 % ингибировало повышение уровня цАМФ, вызываемое ТТГ ($IC_{50} = 0.78$ мкМ). В присутствии NCGC00161856 значительно снижалось сродство рецептора ТТГ к гормону, что выражалось в сдвиге вправо кривой «доза—эффект» для стимулирующего влияния ТТГ на активность АЦ. При этом соединении NCGC00161856 не влияло на число связывающих мест для [^{125}I]-ТТГ, поскольку связывалось только с аллостерическим сайтом рецептора, но не конкурировало с гормоном за связывание с ортостерическим сайтом, расположенным в эктодомене.

Дальнейшие исследования по поиску еще более эффективных частичных агонистов рецептора ТТГ позволили разработать соединение NCGC00229600 (2-{3-[(2,6-диметилфеноксид)метил]-4-метоксифенил}-3-(пиридин-3-илметил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-он), которое ингибировало базальную и стимулированную гормоном активность рецептора ТТГ намного эффективнее, чем NCGC00161856 (Neumann et al., 2011). Соединение NCGC00229600 на 30—75 % снижало стимулирующее влияние активирующих рецептор ТТГ антител на активность АЦ в тироцитах человека, не влияя на их связывание с рецептором. Оно в значительной степени снижало вызываемую ТТГ и активирующими антителами стимуляцию АЦ в первичной культуре фибробластов, которые были получены из ретроорбитальной области пациентов с болезнью Грейвса и характеризовались высоким уровнем экспрессии рецепторов ТТГ (Neumann et al., 2012). В присутствии 30 мкМ NCGC00229600 стимулирующее

влияние антител на активность АЦ снижалось на 66 %. Ингибирующее действие NCGC00229600 было высокоселективным и не затрагивало стимуляцию АЦ другими гормонами. Сильно выраженное стимулирующее влияние BW245C, агониста рецептора простагландина D₂, на активность АЦ в ретроорбитальных фибробластах не менялось даже в присутствии высоких концентраций NCGC00229600. Способность соединения NCGC00229600 подавлять функциональную активность рецептора ТТГ в ретроорбитальных фибробластах очень важна с точки зрения клинической эндокринологии, поскольку вызываемая активирующими антителами гиперстимуляция АЦ в этих клетках является одной из главных причин развития офтальмопатии, одного из грозных симптомов болезни Грейвса (Wiersinga, 2011).

Несмотря на создание высокоселективных частичных агонистов рецептора ТТГ по-прежнему актуальной оставалась проблема разработки нейтральных антагонистов, более избирательных в отношении рецептора ТТГ, чем соединение NIDDK/СЕВ-52, которая была решена группой Марвина Гершенгорна в 2013 г. (Turcu et al., 2013; Neumann et al., 2014). Сначала было разработано соединение NCGC00242595 — 2-[3-[(2,6-диметилфенил)сульфанилметил]-4-метоксифенил]-3-(фуран-2-илметил)-1,2-дигидрохиназолин-4-он, которое ингибировало продукцию цАМФ, стимулируемую моноклональными активирующими антителами и ТТГ в культуре недифференцированных орбитальных фибробластов с экспрессируемым в них рецептором ТТГ, и подавляло вызываемую этими антителами продукцию гиалуроновой кислоты и фосфорилирование протеинкиназы В (АКТ-киназы). При этом влияние NCGC00242595 на базальную активность рецептора ТТГ и на базальный уровень продукции гиалуроновой кислоты обнаружено не было (Turcu et al., 2013). Позднее на основе соединения NCGC00242595 был разработан еще более мощный нейтральный антагонист рецептора ТТГ — соединение NCGC00242364 (N-[4-[[5-[3-(фуран-2-илметил)-4-оксо-1,2-дигидрохиназолин-2-ил]-2-метоксифенил]метокси]-3,5-диметилфенил]ацетамид), которое избирательно ингибировало вызываемую ТТГ стимуляцию активности АЦ ($IC_{50} = 2.1$ мкМ), но не влияло на соответствующее действие ЛГ (Neumann et al., 2014). При обработке соединением NCGC00242364 самок мышей линии BALB/c, которые в течение 3 сут получали низкие дозы тиролиберина, уровень свободного тироксина снижался на 44 %, а экспрессия генов для Na⁺/I⁻-котранспортера и тиреопероксидазы — на 75 и 83 % соответственно. Обработка этим соединением мышей, которым вводили стимулирующие рецептор ТТГ антитела, приводила к снижению уровня тироксина на 38 %, экспрессии генов Na⁺/I⁻-котранспортера и тиреопероксидазы — на 73 и 40 % соответственно. Эти данные указывают на высокую эффективность соединений NCGC00242595, NCGC00242364 и их аналогов при лечении болезни Грейвса. Исключительно важным является тот факт, что эти соединения не влияют на базальную активность рецептора ТТГ. Это позволяет избежать развития гипотиреозных состояний, что возможно при использовании частичных агонистов рецептора ТТГ (Neumann, Gershengorn, 2011; Neumann et al., 2014). Частичные агонисты рецептора ТТГ в большей степени пригодны для лечения неаутоиммунных гипертиреозных состояний, которые вызваны активирующими мутациями в рецепторе ТТГ.

Низкомолекулярные агонисты и антагонисты рецептора ЛГ

Молекулярные механизмы функционирования и активации рецептора ЛГ в общих чертах сходны с теми, которые установлены для рецептора ТТГ, что обусловлено сходством структурно-функциональной организации как самих рецепторов, так и их лигандов. Эндogenous лигандами рецептора ЛГ являются вырабатываемый гонадотрофами передней доли гипофиза ЛГ и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), структурный и функциональный гомолог ЛГ, который вырабатывается плацентой в первом триместре беременности. ЛГ и ХГЧ, как и ТТГ, представляют собой $\alpha\beta$ -гетеродимеры с высококонсервативной α -субъединицей и вариабельной β -субъединицей. β -субъединица определяет специфичность связывания гонадотропинов с эктодоменом рецептора ЛГ. Как и в случае с ТТГ, гонадотропины с высоким сродством связываются с эктодоменом рецептора ЛГ, что приводит к высвобождению второй ВП из комплекса с эктодоменом и меняет конформацию трансмембранного канала. Изменение конформации трансмембранного канала неизбежно приводит к конформационным перестройкам в аллостерическом сайте, который локализован внутри этого канала. Это в свою очередь ведет к активации сопряженных с рецептором ЛГ G-белков, в том числе G_s-белков, опосредующих стимуляцию АЦ (Puett et al., 2007, 2010; Шпаков, 2009). В отличие от рецептора ТТГ рецептор ЛГ не обладает базальной активностью в отсутствие гормональной стимуляции. Следует также отметить, что в настоящее время неизвестны антитела к рецептору ЛГ с активностью агонистов, как это показано для антител, стимулирующих рецептор ТТГ.

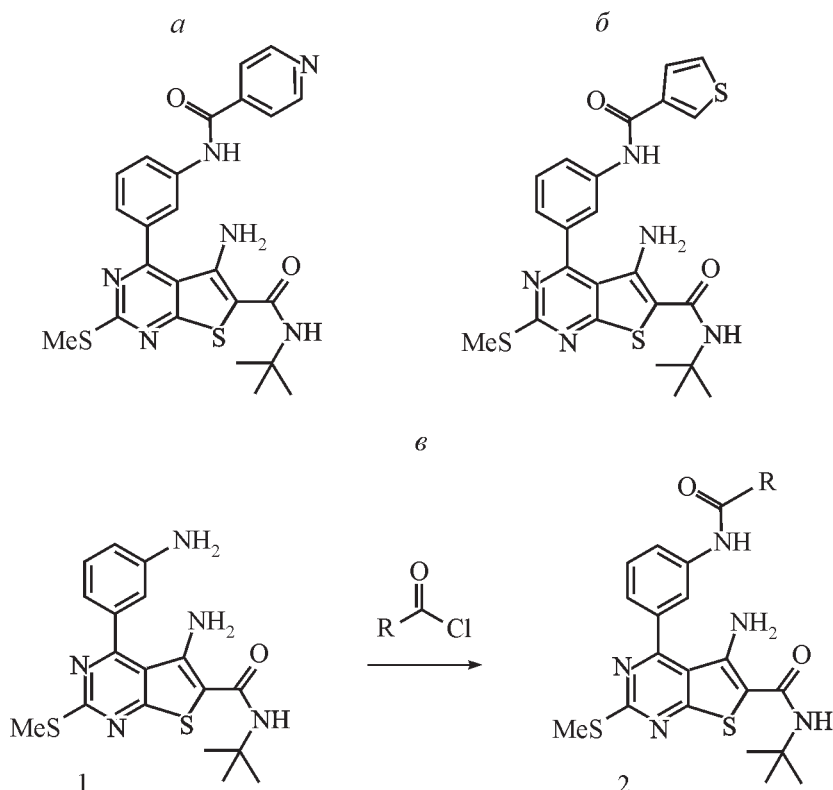
Поскольку рецептор ЛГ является ключевым звеном в контроле функциональной активности репродуктивной системы, поиск его селективных и эффективных регуляторов является важной и актуальной задачей современных эндокринологии и фармакологии. Применение препаратов ЛГ и ХГЧ в практической медицине ограничено необходимостью их парентерального введения, быстрым снижением чувствительности к ним тканей-мишеней, высокой иммуногенностью, а также сравнительно высокой стоимостью. Все это требует разработки новых регуляторов рецептора ЛГ, которые отличаются по механизму действия от гонадотропинов.

В 2002 г. в результате скрининга колоссального числа низкомолекулярных органических соединений голландскими учеными были найдены тиенопиримидиновые производные с активностью агонистов рецептора ЛГ (Van Straten et al., 2002). Наиболее эффективными среди них были соединения Org 41841 (*N*-трет-бутил-5-амино-4-(3-метоксифенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*D*]пиримидин-6-карбоксамид) и его еще более активный аналог Org 43553, наномолярные концентрации которых оказывали стимулирующее действие на рецептор ЛГ. Соединение Org 43553, меченное тритием, специфично связывалось с рецептором ЛГ со значением K_d , равным 2.4 нМ, и при этом не замещалось эндогенным гормоном [¹²⁵I]-ХГЧ (Heitman et al., 2008). Оно вызывало стимуляцию активности АЦ и цАМФ-зависимых транскрипционных факторов ($EC_{50} = 28$ и 4.7 нМ соответственно) с эффективностью 62 и 80 % от таковой ЛГ, но при этом очень слабо влияло на функциональную активность рецепторов ФСГ и ТТГ (Van Korpen et al., 2008). В присутствии Org 43553 стимулирующее влияние ЛГ на активность АЦ в клетках

с экспрессированным в них рецептором ЛГ сохранялось, что свидетельствует в пользу несовпадения сайтов связывания эндогенного гормона и низкомолекулярного агониста. Как известно, ЛГ также стимулирует активность ФЛС, и в этом процессе участвуют G_q-белки, причем для активации ФЛС требуются более высокие концентрации ЛГ (Gilchrist et al., 1996). Соединение Org 43553 в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М стимулировало активность ФЛС лишь на 33—37 %, что составляет менее 5 % от соответствующего действия ЛГ. Эти данные указывают на то, что связывание рецептора ЛГ с Org 43553 не приводит к заметному повышению его способности взаимодействовать с G_q-белками и регулировать через них фосфоинозитидный обмен (Van Korpen et al., 2008). Регулируя зависимость от ЛГ сигнальные каскады, соединение Org 43553 контролировало ЛГ-зависимые биохимические и физиологические процессы. Так, при его действии на первичную культуру клеток Лейдига мыши наблюдали не только повышение в них уровня цАМФ, но и усиление продукция тестостерона (Van de Lagemaat et al., 2009).

Дальнейшие исследования показали, что соединение Org 43553 активно в условиях не только *in vitro*, но *in vivo*, причем как при парентеральном, так и при пероральном способах введения (Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013). Однократное пероральное введение соединения Org 43553 в дозе 50 мг/кг вызывало овуляцию у неполовозрелых мышей и половозрелых крыс, причем подвергшиеся овуляции яйцеклетки были хорошего качества, характеризовались высокой фертильностью, при имплантации давали нормальные эмбрионы. Пероральное введение Org 43553 в той же дозе самцам крыс повышало у них уровень тестостерона (Van de Lagemaat et al., 2009). Высокая эффективность соединения Org 43553 при его пероральном введении связана с тем, что его биодоступность в этом случае является высокой и составляет 79 % у крыс и 44 % у собак, что сопоставимо или даже превосходит биодоступность препарата при парентеральных способах его введения.

Изучение фармакокинетики соединения Org 43553 показало, что в сравнении с гонадотропинами оно деградирует быстрее (Van de Lagemaat et al., 2009). У крыс период полувыведения Org 43553 составил 3.4 ч, что существенно ниже, чем для ХГЧ (6.6 ч). Снижение времени полувыведения имеет большое практическое значение, поскольку позволяет существенно снизить риск развития синдрома гиперстимуляции яичников (ГСЯ), одного из самых опасных и грозных осложнений при стимуляции суперовуляции с помощью гонадотропинов (ХГЧ или рекомбинантного ЛГ) в ходе проведения экстракорпорального оплодотворения и при других вспомогательных репродуктивных технологиях. Показано, что при однократной обработке половозрелых крыс гонадотропинами наблюдается значительное увеличение размеров яичников, повышается проницаемость сосудов и наблюдается гиперсекреция зернистыми клетками фактора роста эндотелия сосудов, что является характерными чертами синдрома ГСЯ. В то же время при однократном пероральном введении Org 43553 самкам крыс размеры яичников и проницаемость сосудов у них практически не менялись, причем даже многократная обработка животных низкомолекулярным агонистом не приводила к развитию ГСЯ. Причиной этого является вызываемое Org 43553 не повышение, как в случае гонадотропинов, а снижение уровня фактора роста эндотелия сосудов, который является одним из важнейших индукторов повышения проницаемо-



Химическая структура (а, б) и схема синтеза (в) тиенопиримидиновых производных с активностью агонистов рецептора ЛГ.

а: 5-амино-N-(*mpem*-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (TR01); б: 5-амино-N-(*mpem*-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (TR02); в: 1 — предшественник 5-амино-4-(3-(аминофенил)-N-(*mpem*-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, 2 — тиенопиримидиновое производное, где R = 4-пиридил (для TR01) или 3-тиенил (для TR02).

сти сосудов (Van de Lagemaat et al., 2011). Успешные эксперименты с экспериментальными животными позволили перейти к клиническим испытаниям соединения Org 43553 как индуктора овуляции, о чем было сообщено в 2013 г. (Gerrits et al., 2013). После перорального приема Org 43553 в дозах от 25 до 900 мг пик концентрации этого соединения достигался через 0.5—1 ч, а период полувыведения составил 30—47 ч. В дозе 300 мг соединения Org 43553 вызывало овуляцию у 83 % женщин репродуктивного возраста, не оказывая при этом каких-либо побочных эффектов. Как и в случае экспериментальных животных, признаков развития ГСЯ при приеме Org 43553 выявлено не было, что свидетельствует о перспективности применения низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ — тиенопиримидиновых производных — для индукции овуляции в условиях клиники.

Нами были разработаны и изучены новые аналоги Org 43553 — соединения TR01 и TR02, которые синтезировали путем ацилирования их тиенопиримидинового предшественника по свободной 5-аминогруппе с помощью изоникотиноилхлорида и тиофен-3-карбонилхлорида соответственно (см. рисунок). Оба соединения были активны в условиях как *in vitro*, стимулируя активность АЦ системы в репродуктивных тканях (Шпаков и др., 2014а, 2014б), так и *in vivo* при различных способах их введения (Держак и др., 2014). Оба соединения в микромолярных концентрациях стимулировали базальную активность АЦ в мембранах, выделенных из семенников и яичников крыс, причем соединение TR02 было более активным в сравнении с TR01. Значения EC_{50} для стимулирующего влияния соединений TR01 и TR02 на активность

АЦ составили 1.05—1.12 мкМ и 280—365 нМ соответственно. Наряду с этим соединения TR01 и TR02 повышали уровень ГТФ-связывания гетеротримерных G-белков в мембранах, выделенных из тестикулярных клеток крыс (Шпаков и др., 2014а). Стимулирующее действие ХГЧ на АЦ в присутствии обоих тиенопиримидиновых производных сохранялось, а при низких, ненасыщающих, концентрациях гонадотропина наблюдали аддитивность действия ХГЧ и соединений TR01 и TR02, что говорит о несовпадении сайтов связывания с ними в молекуле рецептора ЛГ (Шпаков и др., 2014б).

В экспериментах *in vivo* через 3 и 5 ч после внутрибрюшинного введения соединения TR01 в дозе 15 мг/кг уровень тестостерона у крыс повышался на 83 и 339 %, а при использовании дозы 27 мг/кг — на 134 и 325 % соответственно. При сравнении влияния TR01 на уровень тестостерона с таковым ХГЧ было показано, что через 3 ч после инъекции TR01 в дозах 15 и 27 мг/кг прирост концентрации тестостерона составил 13 и 21 % от прироста, вызываемого внутрибрюшинным введением ХГЧ (250 МЕ на крысу). Однако действие соединения TR01 было более длительным — через 5 ч после инъекции прирост концентрации тестостерона, вызываемый TR01, составил 44—46 % от такового для ХГЧ, что свидетельствует о сопоставимости активности тиенопиримидинового производного и гонадотропина (Держак и др., 2014). Наиболее важно то, что соединение TR01 было активным при пероральном способе введения — в дозе 50 мг/кг оно вызывало повышение уровня тестостерона на 230 (через 3 ч) и 417 (через 5 ч) %. Соединение TR02 в дозах 15 и 45 мг/кг при внутрибрюшинном введении и в дозе

50 мг/кг при пероральном введении заметного влияния на уровень тестостерона не оказывало, несмотря на его высокую активность в условиях *in vitro*. Причиной этого, как мы полагаем, является неспособность препарата достичь клеток Лейдига, мишеней действия соединения TR02, вследствие быстрой его деградации в кровяном русле. В пользу этого свидетельствует тот факт, что оба препарата, TR01 и TR02, были одинаково эффективны при интратестикулярном способе введения, когда они попадали непосредственно в семенники. Так, соединение TR01 (6.4 мг/кг) через 1, 3 и 5 ч после инъекции повышало уровень тестостерона на 132, 95 и 75 %, TR02 (8 мг/кг) — на 115, 84 и 37 % соответственно (Деркач и др., 2014). Полученные нами данные указывают на перспективность разработки препаратов для лечения андрогенной недостаточности и коррекции гипогонадотропных состояний у человека на основе соединения TR01, которое эффективно как при парентеральном, так и при пероральном способах доставки.

Следует также отметить, что способность тиенопиримидиновых производных повышать уровень тестостерона у мужчин может быть использована не только для компенсации андрогенной недостаточности, но и для увеличения объема и силы мышц у атлетов в качестве анаболических препаратов. В пользу такой возможности использования Org 43553 и его аналогов свидетельствует тот факт, что в настоящее время уже предприняты попытки внести эти соединения, в первую очередь Org 43553, в список запрещенных препаратов, которые должны в обязательном порядке определяться у спортсменов при их контроле на допинг (Goebel, 2011).

Широкий скрининг низкомолекулярных органических соединений по их способности регулировать активность рецептора ЛГ показал, что наряду с тиенопиримидиновыми производными высокой биологической активностью обладает и ряд других классов соединений, среди которых наибольший интерес представляют производные 1,3,5-пиразола и терфенила (Jorand-Lebrun et al., 2007; Heitman et al., 2009). Производное терфенила, соединение LUF5771, подавляло стимуляцию рецептора ЛГ как гонадотропинами, так и низкомолекулярными агонистами. В концентрации 10 мкМ оно в 3.3 раза ускоряло скорость диссоциации [³H]Org 43553 от рецептора ЛГ, а также в 2—3 раза снижало стимулирующее действие ХГЧ и Org 43553 на ЛГ-зависимые внутриклеточные сигнальные каскады (Heitman et al., 2009). Полученные данные указывают на то, что соединение LUF5771 и его аналоги являются аллостерическими ингибиторами рецептора ЛГ и могут быть использованы для создания препаратов, которые снижают чувствительность репродуктивных клеток к действию ЛГ, что важно для контрацептивных технологий, а также при лечении гормонозависимых опухолей репродуктивных тканей. Производные пиразола являются активаторами рецептора ЛГ. Показано, что одно из таких производных стимулирует активность АЦ и синтез тестостерона клетками Лейдига в условиях *in vitro* (ED₅₀ = 1.31 мкМ), а также повышает уровень тестостерона при внутрибрюшинном введении самцам крыс в дозе 32 мг/кг (Jorand-Lebrun et al., 2007). Необходимо, однако, отметить, что в открытой печати информация о дальнейших разработках производных терфенила и пиразола как селективных регуляторов рецептора ЛГ отсутствует, что, вероятно, связано с меньшей перспективностью их практического использования в сравнении с тиенопиримидиновыми производными.

Низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ как фармакологические шапероны

Причиной многих заболеваний являются мутации в генах, кодирующих GPCR, которые приводят к неправильно сворачиванию молекулы рецептора, нарушению его посттрансляционного процессинга и транслокации в плазматическую мембрану клетки (Conn, Janovick, 2009). Отсутствие или недостаточное количество функционально активных рецепторов в плазматической мембране приводит к ослаблению ответа клетки на гормональное воздействие. Это в полной мере относится к рецептору ЛГ. Так, рецепторы ЛГ с заменами A⁵⁹³P и S⁶¹⁶Y в трансмембранных участках неспособны к транслокации в плазматическую мембрану. Они остаются внутри клетки, в эндоплазматическом ретикулуме, и находятся в функционально неактивном состоянии, несмотря на то что сохраняют способность связываться с ЛГ. Мутантные рецепторы выявлены у пациентов с дисфункциями репродуктивной системы, вызванными гипоплазией продуцирующих тестостерон клеток Лейдига (Kremer et al., 1995; Latronico et al., 1996; Mizrachi, Segaloff, 2004). Выраженность таких дисфункций положительно коррелирует со степенью нарушений функциональной активности рецепторов ЛГ и с потерей ими способности встраиваться в плазматическую мембрану.

Имеются данные о том, что некоторые низкомолекулярные вещества проникают в клетку и там специфично связываются с мутантным GPCR, встроенным в мембрану эндоплазматического ретикулума, что способствует правильному сворачиванию его молекулы и транслокации связанного с лигандом рецептора к плазматической мембране. Такие вещества, восстанавливающие функциональную активность GPCR, называют фармакологическими шаперонами. Способность низкомолекулярных агонистов и антагонистов восстанавливать активность мутантных рецепторов продемонстрирована для вазопрессинного рецептора 2-го типа (Morello et al., 2000), δ-опиоидного рецептора (Petäjä-Repo et al., 2002) и рецептора люлиберина, являющегося высвобождающим фактором для ЛГ (Janovick et al., 2002).

Сравнительно недавно было показано, что низкомолекулярный агонист рецептора ЛГ Org 42599, трифторацетат тиенопиримидинового производного Org 43553, восстанавливает функциональную активность мутантных рецепторов ЛГ с аминокислотными заменами A⁵⁹³P и S⁶¹⁶Y (Newton et al., 2011). Инкубация клеток, имеющих мутантные рецепторы, с соединением Org 42599 повышала общий уровень экспрессии мутантного рецептора, долю мутантных рецепторов с правильной укладкой и топологией в мембране и их плотность на поверхности клетки. Было установлено, что это влияние связано со способностью Org 42599 проникать через плазматическую мембрану клеток Лейдига и специфично связываться с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ, что способствует правильной укладке рецептора и необходимо для транслокации его к плазматической мембране. Очень важно то, что переход рецептора ЛГ в функционально активное состояние препятствует его деградации в протеосомах. Это связано с изменением взаимодействия мутантного рецептора ЛГ в Org 42599-связанном состоянии с ферментами и белками-шаперонами, ответственными за созревание, транслокацию и деградацию молекулы рецептора. Так, мутантный рецептор ЛГ в комплексе с Org 42599, подобно рецептору дикого типа, приобретает

способность модифицироваться ферментом протеин-дисульфид-изомеразой, катализирующим образование дисульфидных связей и тем самым обеспечивающим правильную укладку молекулы рецептора. В то же время мутантный рецептор теряет способность образовывать комплексы с глюкозо-регулируемым белком Grp94 (94 кДа) и Ig-связывающим белком BiP, которые транспортируют неправильно свернутые белки к месту их деградации в протеосомах.

Поскольку низкомолекулярные агонисты при связывании с мутантными рецепторами ЛГ нормализуют их функциональную активность, такие агонисты можно использовать для стимуляции стероидогенеза и других ЛГ-зависимых процессов в клетках Лейдига с дефектными формами рецепторов ЛГ, которые нечувствительны к гонадотропинам. Это один из перспективных подходов к терапии репродуктивных дисфункций, вызванных мутациями в гене, кодирующем рецептор ЛГ. Обработка клеток НЕК-ЕМ293 с экспрессированными в них мутантными рецепторами ЛГ с помощью соединения Org 42599 приводила к стимуляции АЦ, что является следствием транслокации мутантных рецепторов из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану при связывании с Org 42599. Инкубация (2—4 ч) НЕК-клеток, в которых экспрессированы мутантные рецепторы (S⁶¹⁶Y) с низкой чувствительностью к ЛГ, с соединением Org 42599, взятым в сравнительно низкой (0.1 мкМ) концентрации, приводила к двукратному повышению стимулирующего влияния ЛГ на активность АЦ. Неожиданным представляется тот факт, что в клетках, где были экспрессированы нормальные рецепторы ЛГ, АЦ-влияние Org 42599 составило 25 % от такового для ЛГ, в то время как в клетках, где были экспрессированы мутантные их формы, он в 1.5 раза превосходил АЦ-влияние ЛГ. Более того, стимулирующее влияние Org 42599 на активность АЦ в клетках с мутантным рецептором ЛГ вдвое превосходило таковое в клетках с рецептором дикого типа (Newton et al., 2011).

Заключение

Разработка низкомолекулярных регуляторов рецепторов ЛГ и ТТГ позволяет создать широкий спектр лекарственных препаратов, с помощью которых открываются возможности осуществлять тонкую регуляцию функций гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей в условиях эндокринной патологии. Низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ могут усиливать секрецию стероидных гормонов в условиях андрогенной недостаточности и при гипогонадотропных состояниях, могут быть использованы для индукции овуляции и в технологиях экстракорпорального оплодотворения. Низкомолекулярные инверсионные агонисты и нейтральные антагонисты могут быть применены в контрацепции, а также для терапии опухолей репродуктивных органов, зависимых от гонадотропинов и стероидных гормонов. Низкомолекулярные агонисты рецептора ТТГ могут быть использованы при диагностике опухолей щитовидной железы и при проведении их терапии радиоактивным иодом, в то время как низкомолекулярные антагонисты являются перспективными препаратами для снижения гиперактивации щитовидной железы эндогенным ТТГ и стимулирующими антителами. Важно то, что низкомолекулярные регуляторы могут успешно применяться как при парентеральном спо-

собе их введения, так и перорально, поскольку не разрушаются в желудочно-кишечном тракте и хорошо всасываются в кровь. Низкомолекулярные агонисты эффективны даже тогда, когда влияют на мутантные формы рецепторов, которые неспособны к процессингу и транслокации в плазматическую мембрану. Проникая внутрь клетки, низкомолекулярные агонисты действуют как фармакологические шапероны — связываются с мутантными рецепторами, стабилизируют их биологически активную конформацию, предотвращают их деградацию в протеосомах и способствуют транслокации функционально активных рецепторов в мембрану. Следует подчеркнуть, что разработка низкомолекулярных регуляторов рецепторов ЛГ и ТТГ позволила установить структуру их аллостерического сайта, что открывает возможности для молекулярного моделирования этих рецепторов (Heitman et al., 2012; Majumdar, Dighe, 2012; Lane, Ijzerman, 2013). Ранее установление трехмерной структуры рецепторов ЛГ и ТТГ было невозможно из-за влияния на конформацию трансмембранного канала рецепторов значительного по размеру эктодомена.

Список литературы

- Деркач К. В., Дарьин Д. В., Лобанов П. С., Шпаков А. О. 2014. Тиенопиримидиновые производные повышают уровень тестостерона при их интратестикулярном, внутрибрюшинном и пероральном введении самцам крыс. Докл. РАН. 459 (3) : 382—385. (Derkach K. V., Dar'in D. V., Lobanov P. S., Shpakov A. O. 2014. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. Dokl. Biochem. Biophys. DOI: 10.1134/S0012496614060040.)
- Шпаков А. О. 2009. Структурно-функциональная организация рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LRR-повторы, и их взаимодействие с гетеротримерными G-белками. Цитология. 51 (8) : 637—649. (Shpakov A. O. 2009. Structural-functional organization of polypeptide hormones receptors containing LRR-repeats and their interaction with heterotrimeric G proteins. Tsitologiya. 51 : 637—649.)
- Шпаков А. О., Дарьин Д. В., Деркач К. В., Лобанов П. С. 2014a. Стимулирующее влияние тиенопиримидиновых производных на аденилатциклазную сигнальную систему в семенниках крыс. Докл. РАН. 456 (4) : 494—498. (Shpakov A. O., Dar'in D. V., Derkach K. V., Lobanov P. S. 2014a. The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes. Dokl. Biochem. Biophys. 456 : 104—107.)
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Дарьин Д. В., Лобанов П. С. 2014b. Активация аденилатциклазы тиенопиримидиновыми производными в семенниках и яичниках крыс. Цитология. 56 (5) : 346—352. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Dar'in D. V., Lobanov P. S. 2014b. Activation of adenylyl cyclase by thienopyrimidine derivatives in rat testes and ovaries. Cell Tissue Biol. 8 : 400—406.)
- Шпаков А. О., Шпакова Е. А. 2010. Низкомолекулярные регуляторы рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LGR-повторы. Биомед. химия. 56 (3) : 303—318. (Shpakov A. O., Shpakova E. A. 2010. Low-molecular regulators of polypeptide hormone receptors containing LGR-repeats. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 3 : 351—360.)
- Allen M. D., Neumann S., Gershengorn M. C. 2011. Small-molecule thyrotropin receptor agonist activates naturally occurring thyrotropin-insensitive mutants and reveals their distinct cyclic adenosine monophosphate signal persistence. Thyroid. 21 : 907—912.
- Bahn R. S. 2012. Autoimmunity and Graves' disease. Clin. Pharmacol. Ther. 91 : 577—579.
- Cetani F., Tonacchera M., Vassart G. 1996. Differential effects of NaCl concentration on the constitutive activity of the thy-

rotropin and the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *FEBS Lett.* 378 : 27—31.

Conn P. M., Janovick J. A. 2009. Drug development and the cellular quality control system. *Trends Pharmacol. Sci.* 30 : 228—233.

Duntas L. H., Cooper D. S. 2008. Review on the occasion of a decade of recombinant human TSH: prospects and novel uses. *Thyroid.* 18 : 509—516.

Galofré J. C., Chacón A. M., Latif R. 2013. Targeting thyroid diseases with TSH receptor analogs. *Endocrinol. Nutr.* 60 : 590—598.

Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. 2013. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 : 1558—1566.

Gilchrist R. L., Ryu K. S., Ji I., Ji T. H. 1996. The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals. *J. Biol. Chem.* 271 : 19 283—19 287.

Goebel C. 2011. Stimulating luteinizing hormone. *Drug Test. Anal.* 3 : 868—872.

Heitman L. H., Ijzerman A. P. 2008. G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. *Med. Res. Rev.* 28 : 975—1011.

Heitman L. H., Kleinau G., Brussee J., Krause G., Ijzerman A. P. 2012. Determination of different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse drug-like low molecular weight ligands. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351 : 326—336.

Heitman L. H., Narlawar R., de Vries H., Willemsen M. N., Wolfram D., Brussee J., Ijzerman A. P. 2009. Substituted terphenyl compounds as the first class of low molecular weight allosteric inhibitors of the luteinizing hormone receptor. *J. Med. Chem.* 52 : 2036—2042.

Heitman L. H., Oosterom J., Bongers K. M., Timmers C. M., Wiegerinck P. H. G., Ijzerman A. P. 2008. [³H]Org 43553, the first low-molecular-weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor. *Mol. Pharmacol.* 73 : 518—524.

Hoyer I., Haas A. K., Kreuchwig A., Schüle 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 : 213—217.

Janovick J. A., Maya-Nunez G., Conn P. M. 2002. Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 : 3255—3262.

jaschke 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. 2006. 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 : 9841—9844.

Jorand-Lebrun C., Brondyk B., Lin J., Magar S., Murray R., Reddy A., Schroff H., Wands G., Weiser W., Xu Q., McKenna S., Brugger N. 2007. Identification, synthesis, and biological evaluation of novel pyrazoles as low molecular weight luteinizing hormone receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 : 2080—2085.

Kleinau G., Krause G. 2009. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. *Endocr. Rev.* 30 : 133—151.

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. et al. 1995. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat. Genet.* 9 : 160—164.

Lane J. R., Ijzerman A. P. 2013. Allosteric approaches to GPCR drug discovery. *Drug Discov. Today Technol.* 10 : 219—221.

Latronico A. C., Anasti J., Arnhold I. J., Rapaport R., Mendonca B. B., Bloise W., Castro M., Tsigos C., Chrousos G. P. 1996. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 334 : 507—512.

Majumdar R., Dighe R. R. 2012. The hinge region of human thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor operates as a tunable switch between hormone binding and receptor activation. *PLoS ONE.* 7 : e40291.

Mizrachi D., Segaloff D. L. 2004. Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors. *Mol. Endocrinol.* 18 : 1768—1777.

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. 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.

Morello J. P., Salahpour A., Laperrière A., Bernier V., Arthus M. F., Lonergan M., Petäjä-Repo U., Angers S., Morin D., Bichet D. G., Bouvier M. 2000. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* 105 : 887—895.

Neumann S., Eliseeva E., McCoy J. G., Napolitano G., Giuliani C., Monaco F., Huang W., Gershengorn M. C. 2011. A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 : 548—554.

Neumann S., Gershengorn M. C. 2011. Small molecule TSHR agonists and antagonists. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 72 : 74—76.

Neumann S., Huang W., Eliseeva E., Titus S., Thomas C. J., Gershengorn M. C. 2010. A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology.* 151 : 3454—3459.

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. 2009. Small molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106 : 12 471—12 476.

Neumann S., Kleinau G., Costanzi S., Moore S., Jiang J. K., Raaka B. M., Thomas C. J., Krause G., Gershengorn M. C. 2008. A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism. *Endocrinology.* 149 : 5945—5950.

Neumann S., Nir E. A., Eliseeva E., Huang W., Marugan J., Xiao J., Dulcey A. E., Gershengorn M. C. 2014. A Selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. *Endocrinology.* 155 : 310—314.

Neumann S., Pope A., Geras-Raaka E., Raaka B. M., Bahn R. S., Gershengorn M. C. 2012. A drug-like antagonist inhibits thyrotropin receptor-mediated stimulation of cAMP production in Graves' orbital fibroblasts. *Thyroid.* 22 : 839—843.

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. 2011. Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 108 : 7172—7176.

Petäjä-Repo U. E., Hogue M., Bhalla S., Laperrière A., Morello J. P., Bouvier M. 2002. Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21 : 1628—1637.

Puett D., Angelova K., da Costa M. R., Warrenfeltz S. W., Fanelli F. 2010. 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 : 47—55.

Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F. 2007. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone recep-

tor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260 : 126—136.

Rapoport B., McLachlan S. M. 2007. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid.* 17 : 911—922.

Strotmann R., Schrock K., Boselt I., Staubert C., Russ A., Schoneberg T. 2011. Evolution of GPCR: change and continuity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 331 : 170—178.

Szkudlinski M. W., Fremont V., Ronin C., Weintraub B. D. 2002. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82 : 473—502.

Troppmann B., Kleinau G., Krause G., Gromoll J. 2013. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Hum. Reprod. Update.* 19 : 583—602.

Turcu A. F., Kumar S., Neumann S., Coenen M., Iyer S., Chiriboga P., Gershengorn M. C., Bahn R. S. 2013. A small molecule antagonist inhibits thyrotropin receptor antibody-induced orbital fibroblast functions involved in the pathogenesis of Graves ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 : 2153—2159.

Van de Lagemaat R., Raafs B. C., van Koppen C., Timmers C. M., Mulders S. M., Hanssen R. G. 2011. 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 : 4350—4357.

Van de Lagemaat R., Timmers C. M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R. G. 2009. Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum. Reprod.* 24 : 640—648.

Van Koppen C. J., Zaman G. J., Timmers C. M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M. J., Hanssen R. G. 2008. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 378 : 503—514.

Van Straten N. C., Schoonus-Gerritsma G. G., van Someren R. G., Draaijer J., Adang A. E., Timmers C. M., Hanssen R. G., van Boeckel C. A. 2002. The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chembiochem.* 3 : 1023—1026.

Wiersinga W. M. 2011. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 : 2386—2394.

Zhang M., Tong K. P., Fremont V., Chen J., Narayan P., Puett D., Weintraub B. D., Szkudlinski M. W. 2000. The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology.* 141 : 3514—3517.

Поступила 21 XI 2014

NEW ACHIEVEMENTS IN THE DEVELOPMENT AND STUDY OF THE MECHANISMS OF ACTION
OF THE LOW MOLECULAR WEIGHT AGONISTS OF RECEPTORS
OF THE THYROID-STIMULATING AND THE LUTEINIZING HORMONES

A. O. Shpakov

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

Pituitary glycoprotein hormones, luteinizing (LH) and thyroid-stimulating (TSH), exert their regulatory effects on cells through the G protein-coupled receptors, specifically binding to their extracellular domain. There is an alternative way of activation of LH and TSH receptors, when low molecular weight organic molecules bind to an allosteric site of the receptors which is localized within their transmembrane channel. Low molecular weight agonists have many advantages over glycoprotein hormones, among them a high efficiency not only in the case of the parenteral but also in the oral administration, low immunogenicity, chemical stability, and a low cost. Unlike pituitary glycoprotein hormones with the agonistic activity, low molecular weight compounds may be either agonists or inverse agonists and neutral antagonists. Recently it was shown that low molecular weight agonists of LH receptor are able to stimulate its mutant forms by restoring the processing of receptor in a cell, and by increasing its sensitivity to LH, which is important for the treatment of reproductive dysfunctions caused by mutations in the LH receptor. This review summarizes the recent achievements that are linked with the development of low molecular weight regulators of TSH and LH receptors and the study of their mechanisms of action. It also presents the author's data concerning the creation of new low molecular weight agonists of LH receptor based on the thienopyrimidine structure, which are effective both *in vitro*, and *in vivo* in different ways of administration.

Key words: allosteric site, luteinizing hormone, low molecular weight agonist, receptor, thienopyrimidine, thyroid-stimulating hormone.