

## СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ТИЕНОПИРИМИДИНОВ, СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ Org 43553, НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СЕМЕННИКАХ И НА ПРОДУКЦИЮ ТЕСТОСТЕРОНА У САМЦОВ КРЫС

К. В. Деркач,<sup>1</sup> А. С. Легкодух,<sup>2</sup> Д. В. Дарьин,<sup>2</sup> А. О. Шпаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223,  
и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034;  
электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Регуляция функциональной активности рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) может осуществляться как гонадотропинами, так и его низкомолекулярными агонистами, которые в отличие от гонадотропинов связываются с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном канале рецептора. Наибольший интерес среди низкомолекулярных агонистов представляют тиенопиримидиновые производные, аналоги соединения Org 43553. Цель работы состояла в синтезе новых тиенопиримидиновых производных — 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР-21), 4-((3-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбомил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоил)пиридин 1-оксида (ТР-22) и 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР-23) — и в изучении их влияния *in vitro* на активность аденилатциклазы (АЦ) в тестикулярных мембранах крыс, а также *in vivo* на уровень тестостерона (Т) при их интратестикулярном и внутривнутрибрюшинном введениях самцам крыс. Соединения ТР-21, ТР-22 и ТР-23 стимулировали базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс со значениями  $EC_{50}$ , равными 1556, 358 и 372 нМ, и по эффективности располагались в следующий ряд: ТР-23 > ТР-21 ≈ ТР-22. При совместном действии тиенопиримидинов ( $10^{-4}$  М) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ,  $10^{-8}$  М) стимулирующий АЦ эффект гонадотропина сохранялся, а при его концентрации  $10^{-10}$  М отмечалась аддитивность АЦ эффектов тиенопиримидинов и ХГЧ. При интратестикулярном введении самцам крыс в дозе 10 мг/кг ТР-21, ТР-22 и ТР-23 повышали уровень Т, и через 5 ч после обработки прирост концентрации Т над ее значениями в контрольной группе составил 32.8, 36.4 и 76.9 нМ соответственно. При внутривнутрибрюшинном введении ТР-21 и ТР-22 слабо влияли на уровень Т, в то время как соединение ТР-23 через 1 и 3 ч после введения достоверно повышало уровень Т (приросты над контролем 34.8 и 18.9 нМ). Полученные данные указывают на высокую активность ТР-23 как стимулятора синтеза и секреции Т и на перспективность разработки на его основе высокоэффективных агонистов рецептора ЛГ.

Ключевые слова: тиенопиримидин, низкомолекулярный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, тестостерон, аденилатциклаза.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ДМСО — диметилсульфоксид, ЛГ — лютеинизирующий гормон, Т — тестостерон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ТР-21 — 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида, ТР-22 — 4-((3-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбомил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоил)пиридин 1-оксид, ТР-23 — 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида.

Одной из актуальных проблем современной молекулярной эндокринологии является разработка низкомолекулярных соединений, способных селективно регулировать активность рецепторов, эндогенными лигандами которых являются значительные по размеру полипептидные и гликопротеиновые гормоны. Такие низкомолекулярные соединения могут функционировать как полные агонисты, инверсионные агонисты или антагонисты и с высокой аффинностью связываться с ортостерическим или аллостерическим сайтом рецептора, регулируя, таким образом, внутриклеточные каскады и фундаментальные клеточные процессы. Разработка низкомолекуляр-

ных регуляторов рецепторов исключительно важна в тех случаях, когда применение их эндогенных лигандов затруднено или приводит к нежелательным эффектам. Это в полной мере относится к гонадотропинам — фолликулостимулирующему и лютеинизирующему гормонам (ЛГ), которые секретируются передней долей гипофиза и регулируют функции репродуктивной системы, в том числе синтез и секрецию стероидных гормонов. Свои эффекты гонадотропины реализуют через специфичные к ним рецепторы, которые относятся к семейству сопряженных с G-белками рецепторов серпантинного типа и содержат большой внеклеточный домен (эктодомен) и

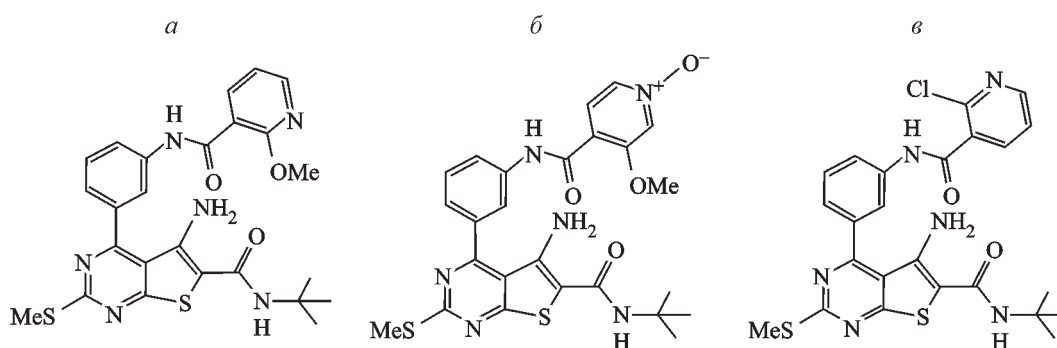


Рис. 1. Химические формулы тиенопиримидиновых производных.

*a* — 5-амино-*N*-(*mpet*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP-21, А); *b* — 4-((3-(5-амино-6-(*mpet*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоил)пиридин 1-оксида (TP-22); *c* — 5-амино-*N*-(*mpet*-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP-23).

гептагеликальный трансмембранный домен (Puett et al., 2007; Шпаков, 2009; Menon, Menon, 2012). Для активации рецептора ЛГ в условиях клиники применяют рекомбинантный ЛГ и его структурный и функциональный аналог — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Однако оба этих гонадотропина характеризуются высокой иммуногенностью, эффективны только при парентеральных способах введения, имеют высокую стоимость. Недостатками ЛГ и ХГЧ является гиперактивация ЛГ-зависимых внутриклеточных каскадов в клетках Лейдига семенников и в фолликулярных клетках яичников, основных мишенях действия ЛГ. Это приводит к быстрому развитию резистентности как к экзогенным формам ЛГ, так и к эндогенному гормону, а также вызывает снижение уровня эндогенных гонадотропинов по механизму обратной связи, что в конечном итоге ослабляет эффективность терапии гонадотропинами (Griesinger et al., 2005; Leão Rde et al., 2014; Razi et al., 2014). Наряду с этим ЛГ и ХГЧ неспособны активировать рецепторы ЛГ, имеющие мутации в участках эктодомена, ответственных за их связывание, а также взаимодействовать с локализованными внутри клетки рецепторами с нарушенной пространственной структурой, которые в не связанном с лигандом состоянии подвергаются деградации в протеосомах (Latronico et al., 1996). Резистентность к ЛГ вследствие снижения связывающей способности рецептора ЛГ и нарушений его фолдинга в процессе созревания является одной из причин дисфункций репродуктивной системы, ведущих к бесплодию (Pietila et al., 2005; Nan et al., 2012).

Многих из этих недостатков лишены низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, которые взаимодействуют не с эктодоменом, а с аллостерическим сайтом рецептора, который расположен внутри его трансмембранного канала. Поскольку они обычно являются гидрофобными молекулами, то легко проникают в клетку, где способны взаимодействовать с еще «незрелыми» или дефектными формами рецептора ЛГ (Newton et al., 2011). Низкомолекулярные агонисты не содержат пептидных связей и поэтому устойчивы к протеолизу, вследствие чего могут быть активными при пероральном введении. Очень важно, что они менее эффективно в сравнении с гонадотропинами активируют рецептор ЛГ, что снижает риск развития резистентности к ним клеток-мишеней, и при этом не препятствуют активации рецептора эндогенным ЛГ (Шпаков, 2015; Nataraja et al., 2015). Несмотря на то что в настоящее время разрабатывается несколько классов низ-

комолекулярных агонистов рецептора ЛГ, наибольший интерес представляют структурные аналоги соединения Org 43553, основу которого составляет тиенопиримидиновый остов. Org 43553 было открыто в 2002 г. и в дальнейшем интенсивно изучалось (Van Straten et al., 2002; Van Koppen et al., 2008; Van de Lagemaat et al., 2011; Gerrits et al., 2013). В результате было установлено, что данное соединение активирует стероидогенез *in vitro* и *in vivo*, специфично воздействуя на рецепторы ЛГ в репродуктивных клетках. Нами были синтезированы соединения TP01 и TP02, аналоги Org 43553, и показано, что оба они активны в условиях *in vitro*, а TP01 также активно в условиях *in vivo*, повышая уровень тестостерона при внутривибрюшинном и пероральном введении самцам крыс (Деркач и др., 2014; Шпаков и др., 2014а, 2014б). Для создания эффективных регуляторов рецептора ЛГ на основе тиенопиримидинов необходимы изучение взаимосвязи структура-активность в их ряду, а также молекулярное моделирование аллостерического сайта рецептора и расшифровка механизмов его активации. Для этого нужно синтезировать и исследовать функциональную активность новых аналогов Org 43553 с заменами как отдельных функциональных групп, так и структурных элементов в молекуле этого соединения.

Цель работы состояла в синтезе новых тиенопиримидиновых производных — 5-амино-*N*-(*mpet*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP-21), 4-((3-(5-амино-6-(*mpet*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоил)пиридин 1-оксида (TP-22) и 5-амино-*N*-(*mpet*-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP-23) (рис. 1) — и в изучении их влияния *in vitro* на активность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) в тестикулярных мембранах крыс, а также *in vivo* на уровень тестостерона при их интратестикулярном и внутривибрюшинном введениях самцам крыс. Выбор АЦСС для изучения активности тиенопиримидиновых производных был обусловлен тем, что эта сигнальная система является основной мишенью для гонадотропинов и регулируется ими через каскад, включающий в себя рецептор ЛГ,  $G_s$ -белок, аденилатциклазу (АЦ), катализирующую синтез цАМФ, и протеинкиназу А, регулирующую активность большого числа эффекторных белков и транскрипционных факторов. Наряду с этим именно АЦСС играет ключевую роль в опосредуемой ЛГ регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига.

## Материал и методика

Синтез новых соединений TP-21, TP-22 и TP-23 проводили с помощью реакции ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*mpet*-бутил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, который получали по методу (Hanssen, Timmers, 2003), для чего 1.0 эквивалент этого соединения смешивали с 1.1 эквивалента соответствующей кислоты в сухом *N,N*-диметилформамиде в присутствии диизопропилэтиламина (1.2 эквивалента), затем добавляли реагент для пептидного синтеза 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксида гексафторфосфат (HATU, 1.1 эквивалента) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4—5 ч. Целевые продукты очищали с помощью колоночной хроматографии или перекристаллизацией. Полученные соединения характеризовали по спектрам ядерного магнитного резонанса и с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Для регистрации спектров ядерного магнитного резонанса использовали спектрометр Bruker Avance III 400 (на ядрах  $^1\text{H}$  с частотой 400.13 МГц). Химические сдвиги указывали в миллионных долях ( $\delta$ , м. д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточный сигнал ДМСО- $d_6$  (2.50 м. д.), константы спин-спиновой взаимодействия ( $J$ ) измеряли в приближении первого порядка и приводили в Гц. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали с помощью спектрометра Bruker micrOTOF (ионизация ESI).

По данным масс-спектрометрии высокого разрешения (ESI-TOF), молекулярная масса TP-21 составила 545.1400 (вычислено для  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  — 545.1400), TP-22 — 531.1248 (вычислено для  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  — 531.1244), TP-23 — 549.0929 (вычислено для  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  — 549.0905). Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР (ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): соединение TP-21 — 1.37 (9H, с,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2.62 (3H, с,  $\text{SCH}_3$ ); 3.99 (3H, с,  $\text{OCH}_3$ ); 6.10 (2H, с, 6- $\text{NH}_2$ ); 6.97 (1H, с,  $\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 7.16 (1H, д,  $J=4.9$ , 7.4, 5''-H); 7.38 (1H, д,  $J=7.9$ , 4'-H); 7.58 (1H, т,  $J=7.9$ , 5'-H); 7.96 (1H, д,  $J=7.9$ , 6'-H); 8.04 (1H, с, 2'-H); 8.07 (1H, д,  $J=1.9$ , 7.4, 4'-H); 8.35 (1H, д,  $J=1.9$ , 4.9, 6''-H); 10.47 (1H, с, 3'-NH); соединение TP-22 — 1.38 (9H, с,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2.62 (3H, с,  $\text{SCH}_3$ ); 6.13 (2H, с, 6- $\text{NH}_2$ ); 6.98 (1H, с,  $\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 7.43 (1H, д,  $J=7.8$ , 4'-H); 7.61 (1H, т,  $J=7.8$ , 5'-H); 8.00 (2H, д,  $J=7.1$ , 2'', 6''-H); 8.02—8.06 (2H, м, 2'-H и 6'-H); 8.39 (2H, д,  $J=7.1$ , 3'', 5''-H); 10.66 (1H, с, 3'-NH); соединение TP-23 — 1.37 (9H, с,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 2.62 (3H, с,  $\text{SCH}_3$ ); 6.11 (2H, с, 6- $\text{NH}_2$ ); 6.97 (1H, с,  $\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 7.42 (1H, д,  $J=7.7$ , 4'-H); 7.56—7.64 (2H, м, 5''H и 5'-H); 7.94 (1H, д,  $J=8.2$ , 6'-H); 8.01 (1H, с, 2'-H); 8.12 (1H, д,  $J=1.9$ , 7.5, 4''-H); 8.56 (1H, д,  $J=1.9$ , 4.8, 6''-H); 10.92 (1H, с, 3'-NH).

Эксперименты с крысами выполняли в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим комитетом ИЭФБ РАН (23.12.2010), а также в соответствии с правилами и требованиями, предусмотренными Директивой 1986 Европейского парламента и изложенными в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Для получения фракций плазматических мембран из семенников половозрелых самцов крыс Wistar — в возрасте 3—4 мес, животных декапитировали в условиях анестезии, удаляли у них семенники и выделяли тестикулярные мембраны, как описано ранее (Шпаков и др., 2014б). Для этого ткани семенников измельчали, гомогенизировали

вали в охлажденном до 4 °C 40 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10%-ную (w/v) сахарозу и коктейль ингибиторов протеаз. Гомогенат центрифугировали (1500 g, 10 мин), полученный супернатант центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин, образовавшийся осадок ресуспендировали в 10 объемах буфера для гомогенизации, но без сахарозы, повторно центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин. Полученные тестикулярные мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.4, так, чтобы содержание в них белка составило 1—2 мг/мл, замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °C для дальнейшего использования в экспериментах по определению активности АЦ.

В экспериментах *in vivo* использовали самцов крыс Wistar в возрасте 2.5—3 мес, массой 200—230 г, которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе. При внутрибрюшинном и интратестикулярном введениях соединений TP-21, TP-22 и TP-23 в каждой исследуемой группе было по 6 животных. Поскольку все исследуемые соединения нерастворимы в воде и полярных растворителях, для их растворения использовали диметилсульфоксид (ДМСО) и полученный раствор вводили животным однократно в строго определенное время (11.00). В случае внутрибрюшинных инъекций TP-21, TP-22 и TP-23 вводили в объеме 200 мкл однократно в дозе 25 мг/кг. Интратестикулярное введение осуществляли поочередно в оба яичка (по 20 мкл в каждое) в условиях местной анестезии, используя шприц Helmject (0.4×12 мм, 1 мл) в суммарной дозе 10 мг/кг. Используемые дозы выбирали по результатам предварительных экспериментов, а также на основе данных, полученных при изучении ранее синтезированных тиенопиримидиновых производных (Van Straten et al., 2002; Van Koppen et al., 2008; Деркач и др., 2014). Контрольные крысы вместо раствора тиенопиримидинов в том же объеме и в тех же условиях получали их растворитель — ДМСО. Для анализа эффективности тиенопиримидиновых производных также использовали гонадотропин — лиофилизированный ХГЧ (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия), который растворяли в физиологическом растворе и вводили подкожно в дозе 250 МЕ на крысу.

В экспериментах по определению активности АЦ использовали ХГЧ, креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, цАМФ, АТФ, 5'-гуанилилиминодифосфат, нейтральный оксид алюминия (по Брокману II) для колоночной хроматографии (Sigma, США), а также меченый субстрат ферментативной реакции —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  (150 Гбк/ммоль) (Всероссийское объединение «Изотоп», Россия). Активность АЦ определяли, как описано ранее (Derkach et al., 2015), в реакционной смеси (50 мкл) следующего состава: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 1 мкКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ , 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 40—60 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °C и останавливали добавлением 100 мкл 0.5 М HCl. Затем пробы кипятили (6 мин), нейтрализовали с помощью 100 мкл 1.5 М имидазола и образовавшийся  $[\text{32P}]\text{цАМФ}$  отделяли от других меченых нуклеотидов на колонках с оксидом алюминия, используя в качестве элюента 12 мл 10 мМ имидазол-HCl-буфера, pH 7.4. Радиоактивность в элюате считали по методу Черенкова на счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Каждое измерение проводили в трех независимых экспериментах в трех параллельных пробах. Результаты представлены в пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка. Исследуемые

тиенопиримидиновые производные растворяли в ДМСО, преинкубировали с тестикулярными мембранами (4 °С, 10 мин), после чего путем добавления инкубационной смеси начинали ферментативную реакцию. В контрольные пробы вместо раствора тиенопиримидинов добавляли их растворитель (ДМСО). ХГЧ вносили в пробы одновременно с инкубационной смесью. Измерение уровня тестостерона в крови, полученной из хвостовой вены крыс, проводили за 1 ч (10.00) до введения соединений, а также через 1 (12.00), 3 (14.00) и 5 (16.00) ч после него. Уровень тестостерона в сыворотке крови крыс определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа, используя наборы «Стероид-ИФА-Тестостерон» (Алкор-Био, Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США). Каждый эксперимент выполняли трехкратно. Данные представлены в виде средних величин и их стандартных отклонений из нескольких независимых экспериментов ( $M \pm SD$ ). Различия между пробами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали достоверными при  $p < 0.05$ . Для анализа графических изображений и расчета значений  $EC_{50}$  использовали программу GraphPad Prism.

## Результаты

Синтез новых тиенопиримидиновых производных проводили по той же схеме, что и ранее при синтезе соединений TP-01 и TP-02, используя для этого реакцию ацилирования предшественника 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида избытком 2-метоксиникотиновой (TP-21), *N*-оксида изоникотиновой (TP-22) и 2-хлорникотиновой (TP-23) кислот. Этот метод позволил с выходом не менее 20 % получить целевые продукты, которые по спектрам ядерного магнитного резонанса и данным масс-спектрометрии полностью соответствовали тем соединениям, синтез которых был запланирован. Растворы всех синтезированных тиенопиримидиновых производных имели сильно выраженную желтую окраску, даже при их низких концентрациях, что облегчало их визуализацию при проведении биологических экспериментов.

Все синтезированные соединения в микромолярных концентрациях повышали базальную активность АЦ во фракциях тестикулярных мембран крыс (рис. 2). Значения  $EC_{50}$  для стимулирующих эффектов TP-21, TP-22 и TP-23 на активность АЦ составили 1556, 358 и 372 нМ. В концентрации  $10^{-4}$  М они повышали базальную активность АЦ на 84, 70 и 149 %. Полученные данные указывают на способность синтезированных соединений дозозависимо активировать АЦ в тестикулярных мембранах. По способности стимулировать АЦ они располагались в следующий ряд эффективности: TP-23 > TP-21  $\approx$  TP-22.

При совместном действии тиенопиримидиновых производных ( $10^{-4}$  М) и ХГЧ ( $10^{-8}$  М), структурного и функционального гомолога ЛГ, стимулирующий АЦ эффект гонадотропина полностью сохранялся, а в случае его более низкой концентрации ( $10^{-10}$  М) отмечали аддитивность АЦ эффектов тиенопиримидинов и ХГЧ. Так, прирост активности АЦ в тестикулярных мембранах, вызванный ХГЧ в концентрациях  $10^{-10}$  и  $10^{-8}$  М, составил  $53 \pm 3$  и  $147 \pm 5$  пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка, а в мембранах, предварительно обработанных соединением TP-23

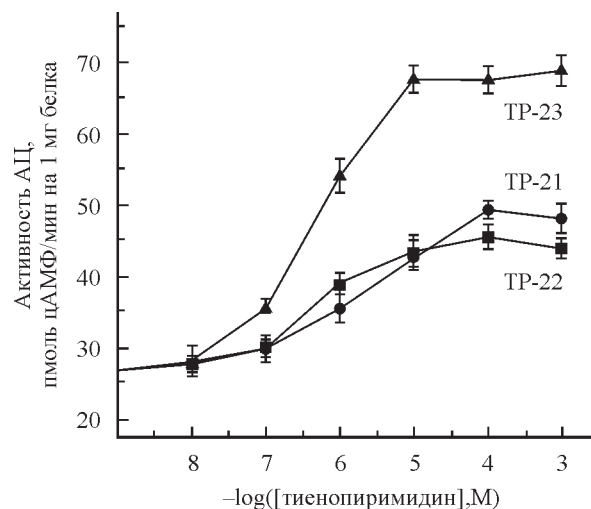


Рис. 2. Стимулирующее влияние соединений TP-21, TP-22 и TP-23 на базальную активность АЦ во фракциях тестикулярных мембран крыс.

По оси ординат — активность АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка; по оси абсцисс — отрицательный десятичный логарифм концентрации тиенопиримидиновых производных, М. Базальная активность АЦ составила  $26.9 \pm 1.6$  пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка.

( $10^{-4}$  М), —  $74 \pm 5$  и  $152 \pm 8$  пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка соответственно. Необходимо отметить, что вызываемый TP-23 прирост активности АЦ в отсутствие ХГЧ составил  $40 \pm 3$  пмоль цАМФ/мин на 1 мг белка. Сохранение, а при низких концентрациях и небольшое усиление АЦ эффекта ХГЧ в мембранах, предварительно обработанных тиенопиримидинами, указывают на отсутствие перекрывания связывающих поверхностей рецептора ЛГ, ответственных за специфическое связывание гонадотропина и исследуемых низкомолекулярных агонистов.

Для изучения активности TP-21, TP-22 и TP-23 в условиях *in vivo* использовали интратестикулярное введение, обеспечивающее их доставку в паренхиму яичек, непосредственно к мишеням действия тиенопиримидинов — клеткам Лейдига, а также внутрибрюшинные инъекции, при которых они сначала попадают в кровотоки и только затем достигают семенников. Уровень тестостерона измеряли через 1—5 ч после введения соединений, чтобы оценить динамику их стимулирующего влияния на продукцию тестостерона клетками Лейдига. При этом учитывали суточную динамику изменения уровня тестостерона в крови крыс с утренним максимумом и дальнейшим снижением в течение дня. В этой связи следует отметить, что при интратестикулярном введении животные во время инъекции получали местный наркоз и после прекращения его действия испытывали болевую реакцию, что в значительной степени меняло динамику изменения уровня тестостерона в ходе эксперимента. Так, у контрольных крыс, которым интратестикулярно вводили ДМСО, исчезал максимум концентрации тестостерона, и значение  $AUC_{12.00-16.00}$  (интегрированная площадь под кривой время—концентрация тестостерона) было достоверно ниже, чем у контрольных животных, получавших внутрибрюшинную инъекцию ДМСО (рис. 3, 4).

При интратестикулярном введении в дозе 10 мг/кг все соединения достоверно повышали уровень тестостерона, причем их эффект сохранялся длительное время (рис. 3). Через 5 ч после обработки соединениями TP-21,

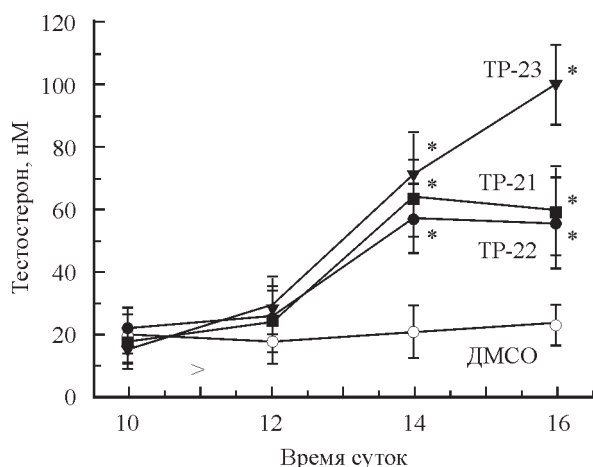


Рис. 3. Стимулирующее влияние соединений TR-21, TR-22 и TR-23 на уровень тестостерона при их интратестикулярном введении самцам крыс.

Символом  $\langle \rangle$  обозначено время (11.00) интратестикулярного введения тиенопиримидинов или ДМСО (контроль), звездочка — достоверные отличия от контроля ( $p < 0.001$ ), белые кружки — ДМСО, черные кружки — TR-21, черные квадратики — TR-22, черные треугольники — TR-23.

TR-22 и TR-23 прирост концентрации тестостерона над ее значениями в контрольной группе составил 32.8, 36.4 и 76.9 нМ. Значения AUC<sub>12.00–16.00</sub> (интегрированная площадь под кривой время—концентрация тестостерона за вычетом усредненного базального уровня гормона, который отмечали во всех группах в 10.00) для соединений TR-21, TR-22 и TR-23 составили  $113 \pm 31$  и  $192 \pm 57$  соответственно. Полученные данные указывают на способность всех изученных соединений стимулировать продукцию тестостерона клетками Лейдига при их непосредственном введении в паренхиму яичек, причем наиболее активным было соединение TR-23, а ряд эффективности (TR-23 > TR-21  $\approx$  TR-22) был сходным с таковым для АЦ эффектов тиенопиримидинов.

Далее исследовали влияние тиенопиримидиновых производных на уровень тестостерона при внутривнутрибрюшинном введении. Соединения TR-21 и TR-22 сравнительно слабо влияли на уровень тестостерона у крыс, и спустя 3 и 5 ч различия в уровне гормона с контрольной группой не были статистически значимыми (рис. 4). Соединение TR-23 было более эффективным и через 1 и 3 ч после внутривнутрибрюшинного введения достоверно повышало уровень тестостерона в плазме крови. Значение AUC<sub>12.00–16.00</sub> для группы, обработанной TR-23, было на 44 и 63 % выше, чем в группах, обработанных соединениями TR-21 и TR-22.

Полученные данные указывают на то, что при внутривнутрибрюшинном введении соединение TR-23 способно эффективно повышать уровень тестостерона и может рассматриваться как прототип для разработки стимуляторов стероидогенеза на основе низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ. При подкожном введении крысам ХГЧ в дозе 250 МЕ на крысу отмечали более выраженный подъем тестостерона через 3 и 5 ч после инъекции. Прирост концентрации тестостерона над уровнем гормона в контрольной группе составил  $131 \pm 12$  и  $64 \pm 9$  нМ, что в среднем в 6–7 раз выше прироста уровня тестостерона, вызываемого TR-23 через 3 и 5 ч после внутривнутрибрюшинной инъекции.

## Обсуждение

Показано, что все синтезированные и изученные нами тиенопиримидиновые производные стимулируют активность АЦСС в тестикулярных мембранах, причем максимальный стимулирующий эффект TR-23, наиболее активного из изученных соединений, достигал максимума уже в концентрации  $10^{-5}$  М. Поскольку АЦ является основным эффекторным белком, ответственным за ЛГ-опосредуемый стероидогенез (Dufau, 1998; Manna et al., 2009), стимулирующий эффект тиенопиримидинов на активность АЦСС свидетельствует об их способности стимулировать синтез и секрецию Т в клетках Лейдига, что и было подтверждено в экспериментах *in vivo*.

Установлено, что эффект TR-21, TR-22 и TR-23 на активность АЦ по величине существенно уступал таковому ХГЧ. Сходную картину мы ранее отмечали и для стимулирующих эффектов тиенопиримидиновых производных TR01 и TR02 в семенниках и яичниках крыс (Шпаков и др., 2014б). Показано также, что повышение уровня тестостерона при внутривнутрибрюшинном способе введения крысам соединения TR-23, наиболее активного стимулятора стероидогенеза *in vivo*, было выражено значительно слабее, чем при подкожном введении ХГЧ. Эти данные указывают на то, что активация АЦСС тиенопиримидинами в условиях *in vitro* и вызываемое ими усиление продукции тестостерона *in vivo* протекают более мягко в сравнении с гонадотропинами. Поскольку основным побочным эффектом гонадотропинов является гиперактивация ЛГ-зависимых сигнальных каскадов в клетках Лейдига семенников и в фолликулярных клетках яичников, ведущая к десенситизации рецепторов ЛГ и развитию резистентности репродуктивных тканей к гонадотропинам, более низкая активность тиенопиримидинов как стимуляторов АЦСС и стероидогенеза позволяет предотвратить или по крайней мере ослабить эти процессы. Применение ЛГ и ХГЧ по механизму обратных связей приводит к нарушению секреции гонадотрофами гипофиза эндогенного ЛГ и гипоталамическими нейронами его рилизинг-фактора — люлиберина, что после отмены гона-

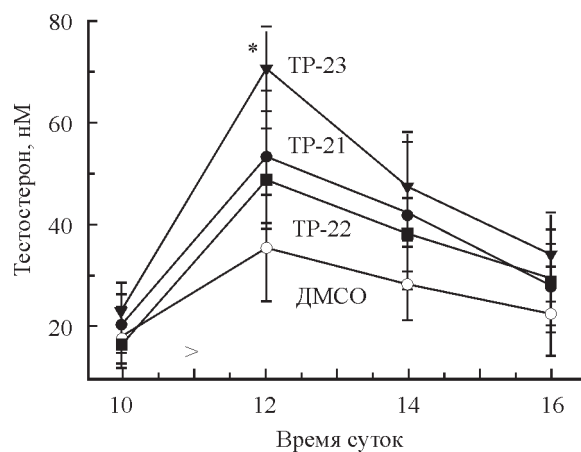


Рис. 4. Стимулирующее влияние TR-21, TR-22 и TR-23 на уровень тестостерона при их внутривнутрибрюшинном введении самцам крыс.

Символом  $\langle \rangle$  обозначено время (11.00) внутривнутрибрюшинной инъекции тиенопиримидиновых производных или ДМСО (контроль), звездочка — достоверные отличия от контроля ( $p < 0.05$ ), белые кружки — ДМСО, черные кружки — TR-21, черные квадратики — TR-22, черные треугольники — TR-23.

дотропинов ведет к развитию гипогонадотропных состояний. При применении же низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ подобные связи действуют только на уровне негативного влияния тестостерона на активность начальных звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Более того, поскольку повышение уровня тестостерона при действии тиенопиримидинов не столь выражено, как при действии гонадотропинов, то и ингибирующее влияние тестостерона на выработку эндогенных гонадотропинов и люлиберина проявляется слабее (Шпаков, 2015; Nataraja et al., 2015).

Синтезированные нами аналоги TP-21 и TP-22 в условиях *in vitro* в концентрации  $10^{-4}$  М стимулировали базальную активность АЦ на 84 и 70 % и были сопоставимы по этому показателю с ранее синтезированным соединением TP-01, которое в той же концентрации повышало активность АЦ в 2 раза (Шпаков и др., 2014б). При этом TP-21 и TP-22 заметно уступали как соединению TP-23 (+149 %), так и ранее изученному TP-02 (+178 %). Таким образом, с точки зрения способности активировать АЦ наиболее эффективной оказалась замена остатка изоникотиновой кислоты в варьруемой части соединения TP-01, структурного аналога соединения Org 43553, на остаток 2-хлорникотиновой кислоты (TP-23), в то время как замены изоникотиновой кислоты на 2-метоксиникотиновую (TP-21) и *N*-оксида изоникотиновую (TP-22) кислоты были менее эффективными. Следует отметить, что ранее синтезированное соединение TP-02 хотя и обладало наиболее высокой активностью в условиях *in vitro*, не было активным *in vivo* при внутрибрюшинном и пероральном введении самцам крысам, что, вероятно, связано с его низкой устойчивостью или плохим всасыванием в желудочно-кишечном тракте (Деркач и др., 2014). Вследствие этого дальнейшее использование остатка тиофен-3-карбоновой кислоты в качестве варьруемой группы тиенопиримидиновых производных оказалось нецелесообразным.

Как уже отмечалось, соединение TP-23 более эффективно, чем TP-21 и TP-22, повышало уровень тестостерона как при интратестикулярном, так и при внутрибрюшинном способах введения. Однако необходимо отметить тот факт, что при интратестикулярном введении TP-23 было обнаружено усиление во времени его стимулирующего влияния на продукцию тестостерона, в то время как при внутрибрюшинной инъекции этот эффект TP-23 быстро достигал максимума. Через 1 ч после внутрибрюшинной инъекции прирост уровня тестостерона составил 34.8 нМ, а затем начинал снижаться и через 3 и 5 ч составил уже 18.9 и 10.7 нМ. Приведенная динамика изменения стимулирующего эффекта соединения TP-23 на продукцию тестостерона существенно отличается от той, которая была получена при изучении соединения TP-01 при его интратестикулярном и внутрибрюшинном введениях самцам крыс. В случае интратестикулярного введения соединения TP-01 отмечали примерно одинаковое повышение уровня тестостерона в крови животных в течение всех 5 ч эксперимента с тенденцией к снижению этого показателя в его конце, в то время как при внутрибрюшинном введении TP-01 было выявлено усиление его стимулирующего эффекта на уровень тестостерона через 3 и 5 ч после инъекции (Деркач и др., 2014). В этом отношении динамика изменения эффекта TP-01 на уровень тестостерона более близка таковой, показанной нами для соединений TP-21 и TP-22. Среди возможных причин обнаруженных различий в динамике стимулирующего

эффекта тиенопиримидиновых производных на продукцию тестостерона наиболее вероятной является высокая активность атома хлора в остатке 2-хлорникотиновой кислоты в структуре TP-23, что может приводить к гидролизу или модификации молекулы этого соединения в результате его попадания в кровоток при внутрибрюшинном введении. В структуре соединений TP01, TP-21 и TP-22 высокореакционно-способные группы отсутствуют, что обеспечивает им более высокую стабильность в биологических системах. Однако это не объясняет довольно неожиданного нарастания продукции тестостерона при интратестикулярном введении TP-23.

Прирост уровня тестостерона при внутрибрюшинном введении TP-23 выше, чем для соединения TP-01, наиболее активного в условиях *in vivo* из ранее исследованных тиенопиримидинов (Деркач и др., 2014). Это указывает на высокую специфическую биологическую активность TP-23 как стимулятора синтеза и секреции андрогенов и на перспективность разработки на его основе новых низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ. В то же время необходимы дальнейшие исследования, которые позволят оценить, каким образом временная динамика изменения уровня тестостерона после парентерального введения тиенопиримидинов влияет на их терапевтический потенциал. Важно отметить, что выраженный ранний пик концентрации тестостерона после внутрибрюшинного введения TP-23 по величине значительно уступает таковому при введении гонадотропинов, что даже при такой необычной для других тиенопиримидинов динамике обеспечивает сравнительно мягкую стимуляцию стероидогенеза. Исключительно важное значение этот факт имеет для экстракорпорального оплодотворения и других вспомогательных репродуктивных технологий, где в настоящее время широко используют гонадотропины. Применение ХГЧ и рекомбинантного ЛГ ведет к тяжелым осложнениям, наиболее опасным из которых является синдром гиперстимуляции яичников, и главными причинами этого является мощная, неконтролируемая активация зависимых от ЛГ сигнальных каскадов (Van de Lagemaat et al., 2009; Fiedler, Ezcurra, 2012).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-00126). ЯМР и масс-спектрометрические исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Магнитно-резонансные методы исследования» и «Методы анализа состава вещества», изучение активности АЦ и иммуноферментные исследования выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

#### 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. 459 : 326—329.)
- 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 con-

taining LRR-repeats and their interaction with heterotrimeric G proteins. *Tsitologiya*. 51 (8) : 637—649.)

Шпаков А. О. 2015. Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология*. 57 (3) : 167—176. (Shpakov A. O. 2015. New achievements in the development and study of the mechanism of action of low molecular agonists of receptors of thyrotropin and luteinizing hormones. *Tsitologiya*. 57 (3) : 167—176.)

Шпаков А. О., Дарьин Д. В., Деркач К. В., Лобанов П. С. 2014а. Стимулирующее влияние тиенопиримидиновых производных на аденилатциклязную 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. 2014б. 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.)

Derkach K. V., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Berstein L. M., Shpakov A. O. 2015. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Int. J. Endocrinol.* 2015 : 245459.

Dufau M. L. 1998. The luteinizing hormone receptor. *Annu. Rev. Physiol.* 60 : 461—496.

Fiedler K., Ezcurra D. 2012. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 : 32.

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.

Griesinger G., Schultze-Mosgau A., Dafopoulos K., Schroeder A., Schroer A., von Otte S., Hornung D., Diedrich K., Felberbaum R. 2005. Recombinant luteinizing hormone supplementation to recombinant follicle-stimulating hormone induced ovarian hyperstimulation in the GnRH-antagonist multiple-dose protocol. *Hum. Reprod.* 20 : 1200—1206.

Han B., Wang Z. Q., Xue L. Q., Ma J. H., Liu W., Liu B. L., Wu J. J., Pan C. M., Chen X., Zhao S. X., Lu Y. L., Wu W. L., Qiao J., Song H. D. 2012. Functional study of an aberrant splicing variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor. *Mol. Hum. Reprod.* 18 : 129—135.

Hanssen R. G. J. M., Timmers C. M. 2003. Thieno[2,3-d]pyrimidines with combined LH and FSH agonistic activity. WO2003020726.

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.

Leão Rde B., Esteves S. C. 2014. Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (San Paulo)*. 69 : 279—293.

Manna P. R., Dyson M. T., Stocco D. M. 2009. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* 15 : 321—333.

Menon K. M., Menon B. 2012. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors — a perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356 : 88—97.

Nataraja S. G., Yu H. N., Palmer S. S. 2015. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6 : 142.

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.

Pietilä E. M., Tuusa J. T., Apaja P. M., Aatsinki J. T., Hakalahti A. E., Rajaniemi H. J., Petaja-Repo U. E. 2005. Inefficient maturation of the rat luteinizing hormone receptor. A putative way to regulate receptor numbers at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 280 : 26 622—26 629.

Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F. 2007. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260 : 126—136.

Razi M. H., Mohseni F., Dehghani Firouzabadi R., Janati S., Yari N., Etebary S. 2014. Results from adding recombinant LH for assisted reproductive technology treatment: a randomized control trial. *Iran J. Reprod. Med.* 12 : 111—116.

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.

Поступила 15 III 2016

THE STIMULATING EFFECT OF THIENOPYRIMIDINES, THE STRUCTURAL ANALOGS OF ORG 43553, ON THE ACTIVITY OF ADENYLYL CYCLASE IN THE TESTES AND ON THE TESTOSTERONE PRODUCTION IN MALE RATS

K. V. Derkach,<sup>1</sup> A. S. Legkodukh,<sup>2</sup> D. V. Dar'in,<sup>2</sup> A. O. Shpakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223, and <sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034; e-mail: alex\_shpakov@list.ru

The regulation of the functional activity of luteinizing hormone (LH) receptor can be carried out by using gonadotropins or low-molecular weight agonists of this receptor, which, unlike gonadotropins, bind to an allo-

steric site located in the transmembrane channel of the receptor. Thienopyrimidine derivatives, the analogs of the compound Org 43553, the greatest interest among the low-molecular weight agonists. The aim of the work was synthesis of the novel thienopyrimidine derivatives, such as 5-amino-*N*-(*tert*-butyl)-4-(3-(2-methoxynicotinamido) phenyl)-2-(methylthio)thieno [2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (TP-21), 4-(3-(5-amino-6-(*tert*-butyl-carbamoyl)-2-) methylthio)thieno[2,3-*d*] pyrimidine-4-yl)phenyl)carbamoyl)pyridine 1-oxide (TP-22) and 5-amino-*N*-(*tert*-butyl)-4-(3-(2-chloronicotinamido)-2-(methylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (TP-23), and the study of their effects *in vitro* on adenylyl cyclase (AC) activity in testicular membranes of rats as well *in vivo* on the testosterone level in the case of their intratesticular and intraperitoneally administration into male rats. The compounds TP-21, TP-22 and TP-23 stimulated the basal AS activity in rat testicular membranes with the EC<sub>50</sub> values, such as 1556, 358 and 372 nM, and ranked according to their efficiency in the following order: TP-23 > TP-21 ≈ TP-22. In the case of combined action of thienopyrimidines (10<sup>-4</sup> M) and human chorionic gonadotropin (hCG, 10<sup>-8</sup> M), the AC stimulating effect of gonadotropin was preserved, but at a concentration of 10<sup>-4</sup> M, the additivity of AC effects of thienopyrimidines and hCG was observed. The TP-21, TP-22 and TP-23, when i. t. administered into male rats at a dose of 10 mg/kg, increased the testosterone levels, and, 5 h after treatment, the increase of concentration of testosterone over its value in the control group was 32.8, 36.4 and 76.9 nM respectively. When administered intraperitoneally, TP-21 and TP-22 had a little effect on the testosterone level, while the compound TP-23 showed significant increase in the testosterone level at 1 and 3 h (the increase over control amounted 34.8 and 18.9 nM). The data obtained indicate a high activity of TP-23, as a stimulator of the synthesis and secretion of testosterone, as well as the prospect of development on its basis of highly effective agonists of LH receptor.

**Key words:** thienopyrimidine, low-molecular weight agonists, luteinizing hormone receptor, testosterone, adenylyl cyclase.

---