

УДК 577.15

НОВЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ОСНОВЕ ТИЕНО-[2,3-*d*] ПИРИМИДИНА

© 2020 г. К. В. Деркач¹, А. А. Бахтюков¹, В. Н. Сорокоумов², А. О. Шпаков^{1,*}

Представлено академиком РАН Л. Г. Магазаником

Поступило 06.02.2020 г.

После доработки 06.02.2020 г.

Принято к публикации 06.02.2020 г.

Антагонисты рецептора тиреотропного гормона (ТТГ) необходимы для лечения ТТГ-зависимых опухолей и болезни Грейвса. Нами разработано соединение 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-иодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР48) и показано, что оно снижает стимулированную ТТГ активность аденилатциклазы в тироидальных мембранах крысы. Предварительная обработка крыс соединением ТР48 (в/б, 40 мг/кг) снижает повышение уровней общего и свободного тироксина в крови и повышение экспрессии генов тиреоглобулина и D2-дейодиназы в щитовидной железе, ответственных за синтез тиреоидных гормонов, которые вызываются интраназальным введением животным тиролиберина (300 мкг/кг). Эти данные указывают на то, что соединение ТР48 является функциональным антагонистом рецептора ТТГ и может быть использовано для коррекции тиреоидного статуса при гипертиреозе.

Ключевые слова: рецептор тиреотропного гормона, антагонист, тиенопиримидин, щитовидная железа

DOI: 10.31857/S2686738920020080

Разработка препаратов, позволяющих снизить активность рецептора тиреотропного гормона (ТТГ) и предотвратить развитие ТТГ-зависимых опухолей и гипертиреоидных состояний, включая болезнь Грейвса, представляет собой одну из актуальных проблем современной эндокринологии и онкологии. Основными причинами ТТГ-зависимых опухолей являются активирующие мутации в рецепторе ТТГ и сопряженных с ним G_s-белках и длительное повышение уровня ТТГ в крови, характерное для гипотиреоза [1], в то время как болезнь Грейвса вызывается гиперактивацией рецептора ТТГ специфическими к нему стимулирующими антителами [2]. Наибольшие перспективы при создании антагонистов и инверсионных агонистов рецептора ТТГ связывают с низкомолекулярными лигандами аллосте-

рического сайта рецептора, локализованного внутри образованного семью гидрофобными спиральями трансмембранного канала [3–5]. Низкомолекулярные лиганды способны ингибировать не только стимулированную ТТГ или стимулирующими антителами активность рецептора, но и снижать его базальную активность, перманентно повышенную при некоторых типах ТТГ-зависимых опухолей.

В отличие от низкомолекулярных лигандов, ТТГ с высокой аффинностью связывается с ортостерическим сайтом, расположенным во внеклеточном домене рецептора ТТГ [6]. Связывание ТТГ с рецептором в тироцитах приводит к стимуляции фермента аденилатциклазы (АЦ) через посредство G_s-белков и повышению внутриклеточного уровня цАМФ, а также к активации фосфолипазы Сβ и кальций-зависимых путей через посредство G_{q/11}-белков. Результатом этого является стимуляция продукции тироксина и повышение экспрессии генов белков, вовлеченных в синтез тиреоидных гормонов [4, 6]. Среди таких белков тиреоглобулин, являющийся поставщиком тирозина для синтеза тиреоидных гормонов, Na⁺/I⁻-котранспортер, доставляющий необходимый для синтеза тиреоидных гормонов йод в тироциты, и ферменты тиреопероксидаза, катали-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

зирующая йодирование тирозина в тиреоглобулине, и D2-дейодиназа, осуществляющая конверсию тироксина в 3,5,3'-трийодтиронин, эффекторный гормон тиреоидной оси.

Ранее на основе структуры тиено-[2,3-*d*]пиримидина нами и другими авторами были разработаны регуляторы рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГ) [7–9], чей аллостерический сайт сходен с таковым рецептора ТТГ [10]. Группой Марвина Гершенгорна на основе тиено-[2,3-*d*]пиримидина был создан **антагонист рецептора ТТГ с52, подавляющий ТТГ-индуцированную продукцию тиреоидных гормонов в тироцитах, но при этом влияющий на активность рецептора ЛГ** [11]. Цель исследования состояла в разработке и изучении нового тиено-[2,3-*d*]пиримидинового производного 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-йодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР48) с активностью функционального антагониста рецептора ТТГ, способного ингибировать базальную и стимулированную тиролиберинем продукцию тиреоидных гормонов у самцов крыс.

ТР48 получали добавлением к раствору 5-амино-4-(4-йодфенил)-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоновой кислоты (2 ммоль) в диметилформамиде (10 мл) раствора трет-бутиламина (4 ммоль) и диизопропилэтиламина (4 ммоль) в дихлорметане (10 мл) с последующей обработкой 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламмоний-тетрафторборатом (2.4 ммоль). После перекристаллизации ТР48 очищали на силикагеле в системе дихлорметан–ацетон (20:1). Выход составил 75%, т. пл. 193–195°C. Спектр ЯМР ^1H , δ (400 МГц, CDCl_3): 7.91 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.41 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.94 (*s*, 2H), 5.25 (*s*, 1H), 2.66 (*s*, 3H), 1.47 (*s*, 9H). По данным масс-спектрометрии масса иона $[\text{M} + \text{K}^+]$ для ТР48 составила 536.9868 (вычислено 536.9886; $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{IN}_4\text{O}_2\text{S}_2\text{K}$). Спектры ^1H -ЯМР регистрировали с помощью спектрометра “Bruker Avance III 400” (Германия), масс-спектры высокого разрешения – с помощью спектрометра “Bruker micrOTOF” (Германия).

Для экспериментов использовали трехмесячных самцов крыс Wistar, все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и правилами и требованиями “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС).

Выделение фракций плазматических мембран из семенников и щитовидной железы крыс и определение в них активности АЦ (АТФ-пирофосфатлиазы циклизующей, НФ 4.6.1.1) проводили, как описано ранее [9, 12]. Мембраны (50–100 мкг белка) инкубировали в течение 12 мин при 37°C в смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ,

37 КБк $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы. Радиоактивность измеряли на счетчике “LKB 1209/1215 RackBeta” (Швеция). Активность АЦ выражали в пмоль цАМФ/мин/мг белка. ТР48 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), в контрольные пробы добавляли растворитель. Преинкубацию мембран с ТР48 проводили в течение 10 мин при +4°C для обеспечения его связывания с рецептором ТТГ.

Для изучения активности ТР48 в условиях *in vivo* его растворяли в ДМСО и вводили крысам (в/б, 40 мг/кг). Контрольным крысам вводили ДМСО. Тиролиберин («Sigma», США) вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг, как описано ранее [13]. Первый забор крови осуществляли в 10.00, в 10.30 крысам групп ТР и ТР-ТРН в/б вводили ТР48 (группам К и ТРН – ДМСО), в 11.00 крысам групп ТРН и ТР-ТРН и/н вводили тиролиберин (группам К и ТР – физиологический раствор), в 12.30 и 14.00 проводили второй и третий заборы крови (в каждой группе $n = 6$). Образцы крови получали из хвостовой вены, используя местный наркоз (анестезия 2% раствором лидокаина, 2–4 мг/кг). Уровни свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина в крови определяли с помощью наборов “Иммунотех” (Россия), уровень тестостерона – с помощью набора “Алкор-Био” (Россия).

Для проведения ПЦР в реальном времени из щитовидной железы крыс выделяли тотальную РНК, используя TRI-reagent (“Molecular Research Center, Inc.”, США). Обратную транскрипцию проводили, используя набор “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit”. Амплификацию проводили в смеси, содержащей 10 нг ПЦР-продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, qPCRMix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”, Россия). Сигнал детектировали с помощью амплификатора “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). В качестве референсных использовали гены 18S-rРНК (18S rRNA) и β -актина (Actb). Полученные данные рассчитывали с помощью метода $\text{delta-delta } C_t$.

Статистический анализ данных осуществляли, используя программу “Microsoft Office Excel 2007”, нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$, данные представлены как $M \pm SD$.

В экспериментах *in vitro* показано, что преинкубация с ТР48 (10^{-6} и 10^{-4} М) фракций мембран,

Таблица 1. Влияние обработки крыс соединением TP48 на базальные и стимулированные тиролиберином уровни свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина в крови

| Группа | fT4, пмоль/л | tT4, нмоль/л | fT3, пмоль/л | tT3, нмоль/л |
|---|--------------|---------------|--------------|--------------|
| <i>До начала обработки</i> | | | | |
| К | 40.7 ± 1.6 | 80.2 ± 4.1 | 4.2 ± 0.2 | 4.6 ± 0.3 |
| TP | 39.3 ± 1.0 | 82.7 ± 2.9 | 3.9 ± 0.2 | 4.2 ± 0.3 |
| TRH | 41.5 ± 1.8 | 83.8 ± 4.5 | 4.3 ± 0.2 | 4.0 ± 0.2 |
| TP+TRH | 40.1 ± 1.4 | 82.5 ± 3.0 | 4.1 ± 0.3 | 4.0 ± 0.2 |
| <i>Через 2 ч после введения ДМСО (К, TRH) или TP48 (TP, TP+TRH) и через 1.5 ч после введения физиологического раствора (К, TP) или тиролиберина (TRH, TP+TRH)</i> | | | | |
| К | 39.4 ± 1.4 | 81.7 ± 2.9 | 4.0 ± 0.3 | 4.3 ± 0.3 |
| TP | 36.4 ± 1.3 | 72.8 ± 3.9 | 3.1 ± 0.3 | 2.9 ± 0.3* |
| TRH | 50.4 ± 2.0* | 110.7 ± 5.0* | 5.7 ± 0.4* | 6.1 ± 0.3* |
| TP+TRH | 45.3 ± 1.9 | 99.3 ± 5.2* | 5.3 ± 0.3* | 5.7 ± 0.3* |
| <i>Через 3.5 ч после введения ДМСО (К, TRH) или TP48 (TP, TP+TRH) и через 3 ч после введения физиологического раствора (К, TP) или тиролиберина (TRH, TP+TRH)</i> | | | | |
| К | 38.8 ± 1.5 | 79.3 ± 3.9 | 4.4 ± 0.2 | 4.2 ± 0.3 |
| TP | 32.2 ± 1.2* | 66.2 ± 5.7 | 2.2 ± 0.2* | 3.2 ± 0.4 |
| TRH | 57.0 ± 1.8* | 128.3 ± 6.3* | 6.3 ± 0.3* | 6.2 ± 0.2* |
| TP+TRH | 45.9 ± 1.8*# | 105.0 ± 5.9*# | 5.2 ± 0.4 | 5.3 ± 0.4 |

Примечание. * – Различия между контролем и группами TP, TRH и TP+TRH статистически значимы при $P < 0.05$; # – различия между группами TRH и TP+TRH статистически значимы при $P < 0.05$. $M \pm SEM$. $n = 6$.

выделенных из щитовидной железы крыс, не влияла на базальную активность АЦ, но ингибировала стимулирующий эффект ТТГ (10^{-8} М). В отсутствие TP48 прирост активности АЦ, вызываемый ТТГ, составил 57.7 ± 1.6 пмоль цАМФ/мин/мг белка, после преинкубации с 10^{-6} и 10^{-4} М TP48 снижался до 42.3 ± 1.2 и 14.1 ± 0.8 пмоль цАМФ/мин/мг белка соответственно ($P < 0.05$). Соединение TP48 не влияло на базальную и стимулированную хорионическим гонадотропином (10^{-8} М), агонистом рецептора ЛГ, активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс (данные не представлены). Таким образом, TP48 ингибирует АЦ эффект ТТГ в тироидальных мембранах, препятствуя гормональной активации рецептора ТТГ и функционируя, тем самым, как его антагонист, но не влияет на активность рецептора ЛГ в тестикулярных мембранах, что указывает на специфичность его действия.

Введение самцам крыс TP48 через 3.5 ч приводило к снижению уровней fT4 и fT3, что указывает на его способность подавлять базальную продукцию тиреоидных гормонов, стимулированную циркулирующим в крови животных эндогенным ТТГ (табл. 1). Наряду со снижением базального уровня тиреоидных гормонов, через 3.5 ч после обработки TP48 в ткани щитовидной железы сни-

жалась экспрессия гена *Nis*, кодирующего Na^+/I^- -котранспортер, и подавлялась экспрессия гена *Tshr*, кодирующего рецептор ТТГ (рис. 1).

Обработка крыс тиролиберином, стимулирующим продукцию ТТГ тиреотрофами гипофиза, повышала уровни всех функционально важных форм тиреоидных гормонов, в наибольшей степени через 3 ч, и вызывала значительное повышение экспрессии генов *Tg*, *TPO* и *Dio2*, кодирующих тиреоглобулин, тиреопероксидазу и D2-дейодиназу, и снижение экспрессии гена *Tshr* в щитовидной железе. Отмечали также тенденцию к повышению экспрессии гена *Nis*, но различия с контролем не были статистически значимыми (табл. 1, рис. 1). Предварительная обработка крыс с помощью TP48 снижала стимулированные тиролиберином уровни тироксина и экспрессию генов *Tg* и *Dio2* при сохранении низкого уровня экспрессии гена *Tshr* (табл. 1, рис. 1). Ослабление экспрессии ряда генов тиреоидогенеза при обработке крыс TP48 указывает на то, что чувствительность тироцитов к стимулирующему влиянию ТТГ снижается, поскольку ТТГ является основным позитивным регулятором экспрессии этих генов [14]. Снижение ответа на ТТГ обусловлено как присущей TP48 активностью функционального антагониста рецептора ТТГ, так и вызы-

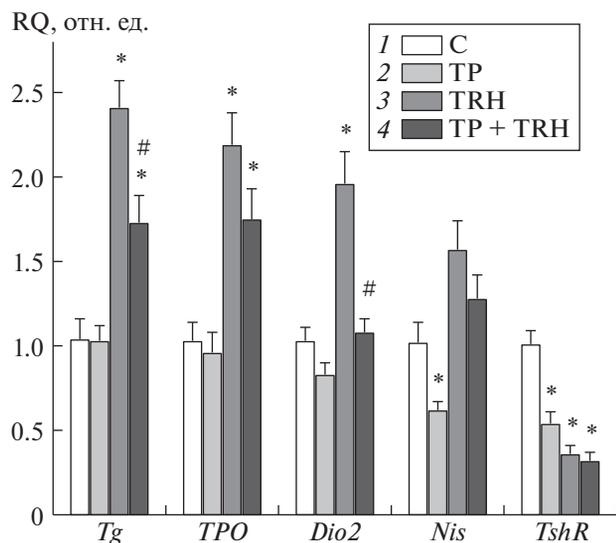


Рис. 1. Влияние соединения TP48 на экспрессию генов белков, вовлеченных в синтез тиреоидных гормонов, в щитовидной железе крыс в отсутствие и при их обработке тиролиберином. 1 – контроль (К), 2 – обработка TP48, в/б, 40 мг/кг (TP), 3 – обработка тиролиберином, и/н, 300 мкг/кг (TRH), 4 – последовательная обработка TP48 и тиролиберином (TP+TRH).

Гены *Tg*, *TPO*, *Dio2*, *Nis* и *Tshr* кодируют тиреоглобулин, тиреопероксидазу, D2-дейодиназу, Na⁺/I⁻-ко-транспортер и рецептор ТТГ. Уровень экспрессии мРНК генов нормировали по экспрессии мРНК генов *18S rRNA* и *Actb*. Значения RQ рассчитывали по отношению к группе К. * – различия между контролем и группами TP, TRH и TP+TRH статистически значимы при $P < 0.05$; # – различия между группами TRH и TP+TRH статистически значимы при $P < 0.05$. $M \pm SEM$. $n = 6$.

ваемым им снижением экспрессии гена *Tshr*. Уровень тестостерона при обработке TP48 не менялся, что указывает на отсутствие его влияния на рецепторы ЛГ в семенниках крыс (данные не представлены).

Таким образом, на основе структуры тиено-[2,3-*d*]пиримидина разработано новое соединение TP48 с активностью функционального антагониста рецептора ТТГ, которое *in vitro* снижало стимулированную ТТГ активность АЦ в тироидальных мембранах, при введении крысам снижало у них базальные и стимулированные тиролиберином уровни тиреоидных гормонов, а также подавляло экспрессию генов тироидогенеза в щитовидной железе.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 19-75-20122). ЯМР и масс-спектрометрические исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров

СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования” и “Методы анализа состава вещества”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowe C.W., Paul J.W., Gedye C., et al. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2017. V. 24. P. R191–R202. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0010>
2. Rapoport B., McLachlan S.M. // *Thyroid*. 2007. V. 17. P. 911–922.
3. Neumann S., Gershengorn M.C. // *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 2011. V. 72. P. 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.03.002>
4. Nunez Miguel R., Sanders J., et al. // *Auto Immun. Highlights*. 2017. V. 8. P. 2. <https://doi.org/10.1007/s13317-016-0090-1>
5. Marcinkowski P., Hoyer I., Specker E., et al. // *Thyroid*. 2019. V. 29. P. 111–123. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
6. Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A., et al. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2017. V. 8. P. 86. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
7. van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., et al. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2008. V. 378. P. 503–514. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
8. Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2015. V. 6. P. 142. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
9. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtuykov A.A., et al. // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell. Biol.* 2016. V. 10. P. 294–300. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
10. Hoyer I., Haas A.K., Kreuchwig A., et al. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. P. 213–217. <https://doi.org/10.1042/BST20120319>
11. Neumann S., Kleinau G., Costanzi S., et al. // *Endocrinology*. 2008. V. 149. P. 5945–5950. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0836>
12. Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., et al. // *Cell Tissue Biol.* 2014. V. 8. P. 488–498. <https://doi.org/10.1134/S1990519X1406008X>
13. Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., et al. // *Horm. Metab. Res.* 2015. V. 47. P. 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
14. Carvalho D.P., Dupuy C. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017. V. 458. P. 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>

NEW THIENO-[2,3-*d*]PYRIMIDINE-BASED FUNCTIONAL ANTAGONIST FOR THE RECEPTOR OF THYROID STIMULATING HORMONE

K. V. Derkach^a, A. A. Bakhtyukov^a, V. N. Sorokoumov^b, and A. O. Shpakov^{a,#}

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

^b *Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Presented by Academician of the RAS L.G. Magazanik

The antagonists of thyroid stimulating hormone (TSH) receptor are required for the treatment of TSH-dependent tumors and Graves disease. We have developed the 5-amino-*N*-(*tert*-butyl)-4-(4-iodophenyl)-2-(methylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (TP48) and it was shown that it reduces TSH-stimulated adenylyl cyclase activity in the rat thyroid membranes. Pretreatment of rats with the compound TP48 (i.p., 40 mg/kg) reduces the increase in the plasma levels of total and free thyroxin and an increase in the expression of the genes encoding the thyroglobulin and D2-deiodinase, responsible for thyroid hormones synthesis, which are stimulated by intranasal administration of thyroliberin (300 µg/kg). These data indicate that the compound TP48 is a functional antagonist of the TSH receptor and can be used to correct thyroid status in hyperthyroidism.

Keywords: receptor of thyroid stimulating hormone, antagonist, thienopyrimidine, thyroid gland