

## ОБЗОРЫ

УДК 577.17

©Шпаков, Шпакова

### НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ГОРМОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ LGR-ПОВТОРЫ

*А.О. Шпаков\*, Е.А. Шпакова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44, факс: +7 (812) 552 30 12;  
эл.почта: alex\_shpakov@list.ru

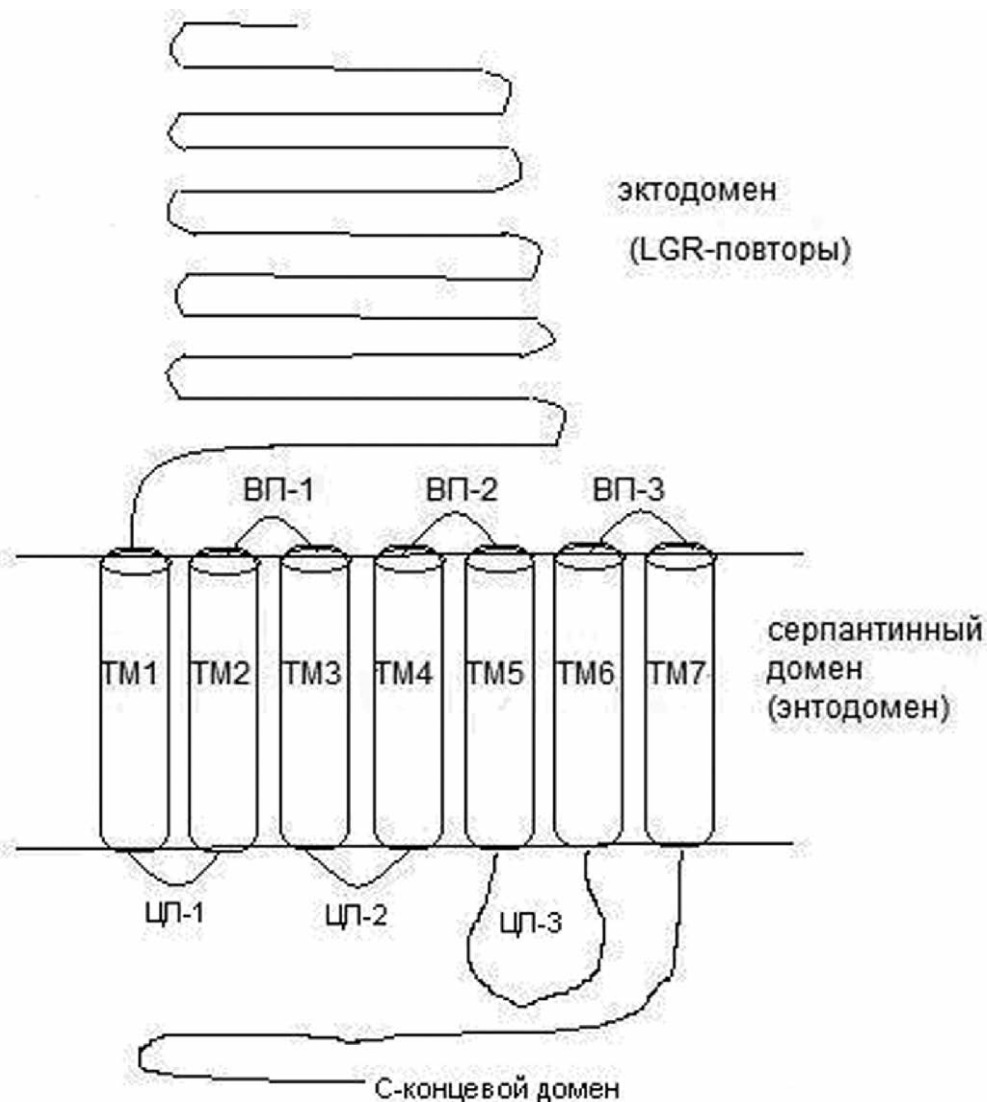
На протяжении последних лет были открыты низкомолекулярные непептидные регуляторы рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LGR-повторы (LGR-рецепторов). В обзоре проанализированы и систематизированы данные о структуре и молекулярных механизмах действия таких регуляторов, являющихся агонистами и антагонистами рецепторов лютеинизирующего, фолликулостимулирующего и тиреотропного гормонов. Эти регуляторы взаимодействуют с серпантинным доменом LGR-рецептора и запускают сопряженные с ним сигнальные каскады. Низкомолекулярные агонисты и антагонисты LGR-рецепторов рассматриваются как новое поколение лекарственных препаратов, которые способны с высокой эффективностью и селективностью регулировать функциональную активность сигнальных систем, чувствительных к гипоталамическим гликопротеиновым гормонам, в сравнении с ними более доступны и могут применяться перорально.

**Ключевые слова:** лютеинизирующий гормон, низкомолекулярный агонист, рецептор, тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, LGR-повтор.

**ВВЕДЕНИЕ.** Среди сопряженных с гетеротримерными G-белками рецепторов серпантинного типа, семь раз пронизывающих плазматическую мембрану, выделяется группа рецепторов, характерной особенностью которых является наличие в значительном по размеру внеклеточном домене (эктодомене) повторяющихся последовательностей – LGR-повторов, которые обогащены остатками лейцина и формируют  $\alpha$ -спиральные структуры [1]. К этой группе относятся рецепторы гликопротеиновых гипоталамических гормонов – фолликулостимулирующего (ФСГ) [2], лютеинизирующего (ЛГ) [3] и тиреотропного (ТТГ) [4], а также рецепторы релаксина (LGR7-рецептор) и родственного ему инсулиноподобного фактора 3 (LGR8-рецептор) [5, 6]. Все LGR-рецепторы, наряду с эктодоменом, имеют родопсин-подобный серпантинный домен (энтодомен), который включает семь трансмембранных участков (TM1–TM7), три внеклеточные петли (ВП-1–ВП-3), три цитоплазматические петли и локализованный в цитоплазме С-концевой домен (рис. 1).

*Принятые сокращения:* АКО – аминокислотный остаток; АЦ – аденилатциклаза; ВП – внеклеточная петля; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТМ – трансмембранный участок; ТТГ – тиреотропный гормон; ФЛС – фосфолипаза С; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЧХГ – хорионический гонадотропин человека.

\* - адресат для переписки



**Рисунок 1.**

Строение LGR-рецепторов. ВП-1, ВП-2 и ВП-3 – первая, вторая и третья внеклеточные петли, соответственно; TM1–TM7 – трансмембранные участки; ЦП-1, ЦП-2 и ЦП-3 – первая, вторая и третья цитоплазматические петли, соответственно.

Изучение LGR-рецепторов является одной из актуальных задач современной молекулярной эндокринологии, поскольку нарушение их функционирования приводит к развитию широкого спектра эндокринных заболеваний. В случае рецепторов гонадотропинов наблюдаются дисфункции в развитии половой и репродуктивной систем, которые приводят к бесплодию, гипогонадизму, преждевременному половому созреванию [7, 8]. Нарушение функций рецептора ТТГ и сопряженных с ним сигнальных каскадов вызывает развитие злокачественных новообразований и аденом щитовидной железы, аутоиммунных тиреоидитов [9]. Нарушение передачи релаксинового сигнала через LGR7-рецептор ведёт к многочисленным дисфункциям со стороны репродуктивной, сердечно-сосудистой, мочевыделительной и центральной нервной систем [10, 11].

Специфическое связывание гормона с эктодоменом LGR-рецепторов вызывает в нем конформационные изменения, следствием чего является активация серпантинного домена (эндодомена). От активированного эндодомена гормональный

сигнал передается к  $\alpha$ -субъединице гетеротримерного G-белка, который сопряжён с эффекторными белками, ответственными за ответ клетки на действие гормона. Во взаимодействии с G-белками участвуют вторая и третья цитоплазматические петли LGR-рецепторов, а также N-концевой сегмент их С-концевого домена.

В настоящее время рассматриваются различные модели активации LGR-рецепторов гормонами [12]. Так для рецепторов гонадотропинов предлагаются две модели [13, 14]. В соответствии с первой из них, в отсутствие гормона эктодомен образует комплекс с ВП-2, соединяющей ТМ4 и ТМ5, вследствие чего серпантинный домен находится в неактивном состоянии. После связывания рецептора с  $\beta$ -субъединицей гормона, ЛГ или ФСГ, ВП-2 высвобождается из комплекса с эктодоменом, что ведет к изменению конформации серпантинного домена и вызывает активацию им гетеротримерного G-белка [13, 15, 16]. В соответствии со второй моделью, в процессе связывания рецептора с  $\beta$ -субъединицей гонадотропина в самом эктодоме происходят конформационные изменения, вызывающие активацию взаимодействующего с ним серпантинного домена и стимуляцию активности сопряженных с ним G-белков [17]. В этом случае эктодомен, образующий комплекс с молекулой гормона, выполняет функцию агониста.

Для рецептора ТТГ общепринятой является модель двух состояний, которая сходна с первой моделью гормональной активации рецепторов ЛГ и ФСГ [4, 18]. В соответствии с ней, рецепторы могут существовать в двух конформациях – неактивной (“закрытой”) и конституционно активной (“открытой”), между которыми устанавливается динамическое равновесие. Рецепторы, находящиеся в “открытой” конформации, взаимодействуют с  $G_s$ -белком в отсутствие гормона, что определяет их базальную активность. ТТГ с высокой аффинностью связывается с рецептором в “открытой” конформации, стабилизирует её, и в результате сдвигает равновесие в её сторону. Фактически гормон снимает ингибирующее влияние эктодомена на серпантинный домен рецептора ТТГ. В пользу этой модели свидетельствует то, что удаление эктодомена в несколько раз повышает базальную активность мутантного рецептора ТТГ, переводя его в конституционно активное состояние [19]. Так рецептор, лишённый эктодомена, в 4–6 раз более эффективно в сравнении с природной его формой повышает уровень cAMP и в 4–10 раз – уровень фосфоинозитидов. Таким образом, отсутствие эктодомена не влияет на сопряжение рецептора ТТГ с  $G_s$ - и  $G_{q/11}$ -белками. Другая модель активации рецептора ТТГ включает не только снятие ингибирующего влияния эктодомена, но и взаимодействие связанного с ТТГ эктодомена с “активирующим участком”, локализованным на границе эктодомена и серпантинного домена, непосредственно перед ТМ1 [4]. В этом случае комплекс эктодомена и ТТГ ведет себя как агонист, активирующий серпантинный домен рецептора.

Представленные выше молекулярные механизмы активации LGR-рецепторов гликопротеиновыми гормонами отличаются от тех, которые лежат в основе активации большинства других рецепторов серпантинного типа низкомолекулярными гормонами и гормоноподобными веществами (ретиналом, биогенными аминами, олигопептидами и др.). В случае активации этих рецепторов гормон взаимодействует с лигандсвязывающим сайтом, который расположен внутри трансмембранного канала, образуемого семью ТМ. Еще сравнительно недавно считали, что активация серпантинного домена рецепторов гликопротеиновых гормонов низкомолекулярными лигандами невозможна. Однако в последние годы обнаружено множество различных по химической структуре низкомолекулярных агонистов и антагонистов рецепторов гонадотропинов и ТТГ. Это принципиально изменило существующие в настоящее время подходы к созданию регуляторов функциональной активности рецепторов ЛГ, ФСГ и ТТГ и послужило основой для разработки на их основе нового поколения фармакологических препаратов, предназначенных для лечения широкого спектра заболеваний, связанных с нарушением функционирования

гипоталамо-гипофизарно-гонадальной и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной осей. Систематизации и анализу данных, касающихся низкомолекулярных регуляторов рецепторов гликопротеиновых гормонов, а также перспективам их применения в практической медицине и будет посвящён настоящий обзор.

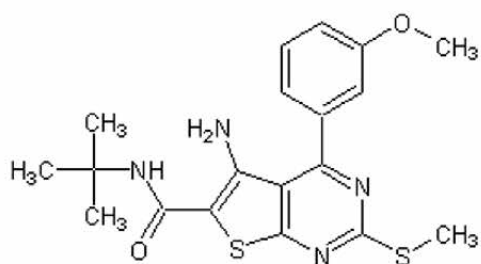
### 1. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА.

Эндогенными лигандами рецептора ЛГ являются ЛГ и хорионический гонадотропин человека (чХГ), которые состоят из высоко консервативной  $\alpha$ -субъединицы и более вариабельной  $\beta$ -субъединицы, определяющей специфичность связывания гормона. Они, как отмечалось выше, связываются с эктодоменом и активируют сАМР-зависимые сигнальные каскады. В течение многих лет выделяемые из мочи беременных женщин в первом триместре беременности чХГ и ЛГ, а в последние годы и рекомбинантные формы гормонов, широко применяются для лечения бесплодия и задержки полового созревания. Димер, состоящий из двух  $\beta$ -субъединиц чХГ, и дегликозилированный чХГ являются антагонистами гонадотропинов и могут быть использованы в качестве эффективных контрацептивных препаратов. Однако применение гонадотропинов и их производных в гормональной терапии ограничено необходимостью их инъекционного введения и высокой стоимостью. Вследствие этого поиск и разработка низкомолекулярных непептидных лигандов рецепторов ЛГ, которые активны при пероральном введении и существенно дешевле, является одной из актуальных задач современной фармакологии.

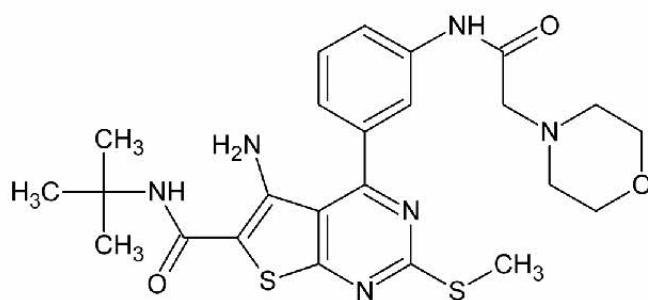
Первые низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, относящиеся к классам тиенопиридинов и тиенопиримидинов, были открыты в 2002 г. [20]. Наиболее эффективными среди них были вещество Org41841, *N*-трет-бутил-5-амино-4-(3-метоксифенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*D*]пиримидин-6-карбоксамид (вещество 1, рис. 2) и его аналог Org43553 (вещество 2, рис. 2), которые относятся к тиенопиримидинам и активируют рецептор ЛГ со значениями  $EC_{50}$  20 и 1,7 нМ соответственно [20, 21]. Так Org43553 активирует рецептор ЛГ с эффективностью, составляющей 80% от таковой самого ЛГ, причем его действие является селективным – Org43553 в 10 раз слабее связывается с рецептором ФСГ и в 1000 раз слабее с рецептором ТТГ. Org41841 в дозе 50 мг/кг при пероральном введении вызывает овуляцию у 40% мышей. Вещество Org43553 также активно в условиях *in vivo*, как индуктор овуляции, и сопоставимо по эффективности действия с чХГ. Org41841 и Org43553 запатентованы фирмой “Organon Biosciences” и предполагаются для широкого применения в качестве агонистов рецепторов гонадотропинов [22].

Вещество Org43553 является аллостерическим агонистом рецептора ЛГ, связываясь с его серпантинным доменом, о чём свидетельствуют следующие факты. Во-первых, исследуя химерные рецепторы, сочетающие в себе различные домены и участки рецепторов ЛГ и ТТГ, установлено, что Org43553 стимулирует только те рецепторы, которые содержат серпантинный домен рецептора ЛГ, в то время как для связывания ЛГ и других гликопротеиновых гормонов требуется эктодомен соответствующего им рецептора. Во-вторых, несмотря на то, что Org43553 увеличивает диссоциацию [ $^{125}$ I]чХГ от рецептора ЛГ и снижает связывание с ним [ $^{125}$ I]чХГ, его действие, как показывают кинетические исследования, осуществляется не по конкурентному механизму. Следовательно, вызываемые Org43553 конформационные изменения в серпантинном домене влияют на связывающие характеристики эктодомена. Сходный результат достигается заменами некоторых аминокислотных остатков (АКО) в ТМ рецептора ЛГ, которые аллостерически модулируют связывание гонадотропинов с эктодоменом [23]. В-третьих, Org43553 также не по конкурентному механизму снижает вызываемую ЛГ стимуляцию активности фосфолипазы С (ФЛС) [21]. В-четвёртых, в присутствии ЛГ на 32% снижается связывание [ $^3$ H]Org43553 с рецептором ЛГ, что указывает на аллостерическую модель взаимного влияния эктодомена и серпантинного домена.

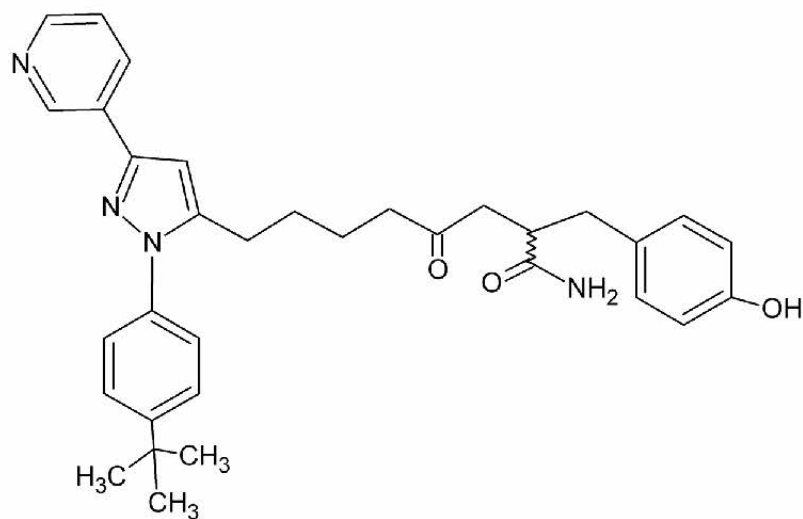
1



2



3



**Рисунок 2.**

Низкомолекулярные агонисты рецептора лютеинизирующего гормона.



Вещество Org43553 обладает селективностью в отношении регуляции различных сигнальных каскадов, реализуемых через активированный рецептор ЛГ [14]. Так оно является мощным агонистом рецептора, вызывающим стимуляцию активности аденилатциклазы (АЦ) и сАМР-зависимых сигнальных каскадов, осуществляемую через  $G_s$ -белок, но очень слабо и только в сравнительно высоких концентрациях (10–100 нМ) влияет на активность ФЛС, которая функционально сопряжена с рецептором ЛГ через  $G_q$ -белок [14]. Вещество Org43553, как отмечалось выше, ингибирует стимуляцию ЛГ активности ФЛС, но практически не влияет на стимулирующее действие гормона в отношении АЦ. Следует отметить, что некоторые мутации в рецепторе ЛГ влияют на передачу гормонального сигнала к АЦ, но не эффективны в отношении ФЛС-зависимого сигнального пути [24]. В свою очередь, замена остатка аланина, который локализован в сигнальном пептиде  $\beta$ -субъединицы ЛГ в третьей от его С-конца позиции (Ala<sup>3</sup>), на остаток треонина, усиливает стимуляцию мутантным гормоном активности ФЛС, но резко ослабляет его способность активировать АЦ [25].

Вещество Org41841 является частичным агонистом для рецептора ЛГ, который активирует АЦ со значением  $EC_{50}$  220 нМ с максимальным стимулирующим АЦ эффектом, составляющим 34% от такового, вызываемого ЛГ [26]. Наряду с этим оно является также частичным антагонистом рецептора ТТГ, серпантинный домен которого высоко гомологичен таковому в рецепторе ЛГ. Так Org41841 активирует АЦ с  $EC_{50}$  7700 нМ с максимальным АЦ эффектом, составляющим 23% от эффекта, вызываемого ТТГ. Обнаружение этого факта стало отправной точкой для поиска и разработки низкомолекулярных лигандов рецептора ТТГ [27].

Для конструирования лигандсвязывающего сайта, расположенного внутри трансмембранного канала рецептора ЛГ, с которым взаимодействует Org41841, был применён сайт-направленный мутагенез. АКО, формирующие лигандсвязывающий сайт серпантинного домена рецептора ТТГ, заменяли соответствующими по локализации АКО в рецепторе ЛГ. Вследствие таких замен лигандсвязывающий сайт рецептора ТТГ по структуре приближался к лигандсвязывающему сайту рецептора ЛГ. Следует отметить, что в качестве мишеней сайт-направленного мутагенеза были избраны только те АКО, которые различаются в рецепторах ТТГ и ЛГ. Эти АКО локализованы в ВП-2, ТМ5 и ТМ6 рецепторов. Обнаружено, что замена L570F в ВП-2 ведёт к снижению значения  $EC_{50}$  для вещества Org41841 до 800 нМ, а двойная замена L570F/F585T и L570F/Y643F – до 1000 нМ. Одновременная замена девяти АКО (I560V и L570F в ВП-2, P577T, A579S, L580Q, A581V и F585T в ТМ5, Y643F и I648A в ТМ6), которые формируют лигандсвязывающий сайт, локализованный в серпантинном домене рецептора ТТГ, на соответствующие АКО рецептора ЛГ, приводит к мутантному рецептору, для которого вещество Org41841, как и в случае рецептора ЛГ, является полным агонистом. Максимальный стимулирующий АЦ эффект Org41841 при активации им мутантного рецептора сходен по величине с таковым ТТГ, а значение  $EC_{50}$  в этом случае составляет 2700 нМ. Полученные данные указывают на важную роль остатков L570F, F585T и Y643F для формирования гидрофобной поверхности лигандсвязывающего сайта рецептора ЛГ [26]. Ключевым для взаимодействия с веществом Org41841 также является отрицательно заряженный остаток Glu<sup>506</sup>, локализованный в ТМ3 и высоко консервативный во многих рецепторах, сопряженных с G-белками, в том числе в рецепторах гонадотропинов и ТТГ. Его замена на аланин полностью блокирует связывание вещества Org41841 с рецептором ЛГ и активацию им АЦ. Предполагается, что боковая карбоксильная группа Glu образует водородную связь с аминок группой низкомолекулярного лиганда, обеспечивая его эффективное связывание [26, 28].

В 2007 г. были открыты производные пиразола, которые также являются агонистами рецептора ЛГ [29]. Наиболее активным среди них было вещество 3 (рис. 2), которое в условиях *in vitro* стимулирует АЦ со значением  $EC_{50}$  20 нМ и активирует рецептор ЛГ с эффективностью 70% от таковой гормона. Как и производные тиенопиримидинов, вещество 3 не конкурирует с  $[^{125}I]$ чХГ за связывание с рецептором ЛГ, что свидетельствует в пользу его взаимодействия с серпантинным доменом рецептора. Интраперитонеальное введение вещества 3 крысам вызывает повышение уровня тестостерона в сыворотке крови, что указывает на мимикрирование этим низкомолекулярным агонистом эффектов ЛГ и чХГ в условиях *in vivo* [29].

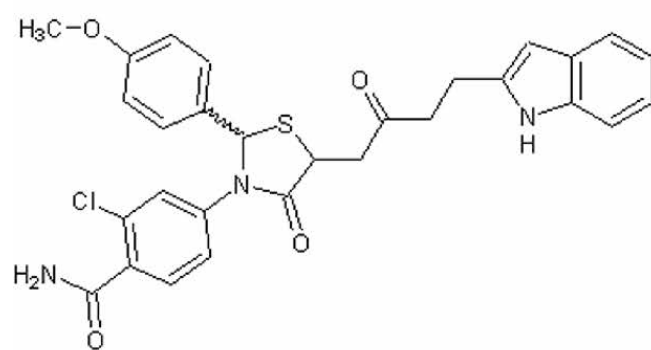
## 2. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА.

ФСГ сходен по структуре с ЛГ и чХГ, также состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и связывается с эктодоменом рецептора ФСГ. Как выделенный из мочи ФСГ, так и его рекомбинантная форма применяются для лечения бесплодия и эндокринных заболеваний, связанных с нарушением секреции гонадотропинов. Наряду с ФСГ, широко применяют менопаузальный гонадотропин, являющийся смесью ФСГ и ЛГ в соотношении 1:1, который выделяют из мочи постменопаузальных женщин. Поскольку ФСГ необходимо вводить ежедневно, предпринимаются попытки к созданию препаратов пролонгированного действия. Среди них димер, включающий сшитые между собой  $\beta$ -субъединицы чХГ и ФСГ, а также гипергликозилированные аналоги ФСГ [30, 31]. Однако, как и в случае ЛГ и чХГ, имеются существенные проблемы в плане применения ФСГ в практической медицине, вследствие чего ведется поиск низкомолекулярных лигандов рецептора ФСГ непептидной природы.

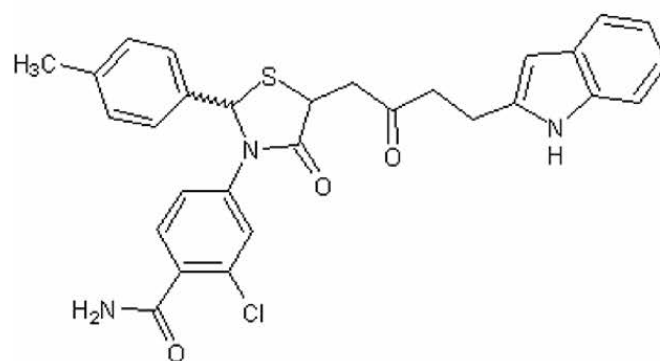
Обнаружено, что высокой активностью агонистов рецептора ФСГ обладают производные тиазолидин-4-она [32–34]. На первом этапе на основе скрининга 120 тысяч соединений были обнаружены два вещества, которые со значениями  $EC_{50}$  20–50 мкМ активировали рецептор ФСГ и стимулировали АЦ (вещества 4 и 5, рис. 3). В дальнейшем с помощью направленного скрининга 42 тысяч соединений были идентифицированы более эффективные их аналоги – вещества 6, 7 и 8 (рис. 3), которые, являясь полными агонистами рецептора ФСГ, повышали уровень сАМР со значениями  $EC_{50}$  2, 6 и 1 нМ соответственно. Эффективность этих веществ определяется их конфигурацией – *цис*-изомеры на два порядка активнее *транс*-изомеров, что свидетельствует в пользу высокой стереоселективности взаимодействия производных тиазолидин-4-она с рецептором ФСГ. Замена тиазолидинового кольца на  $\gamma$ -лактамное также приводит к агонисту, который эффективно связывается с рецептором и со значением  $EC_{50}$  25 нМ стимулирует активность АЦ [35].

Действие производных тиазолидин-4-она специфично по отношению к рецептору ФСГ, поскольку они не влияют на стимуляцию АЦ, осуществляемую через другие сопряженные с  $G_s$ -белками рецепторы. В условиях *in vivo* вещество 6 вызывает стимуляцию продукции прогестерона в клетках линии Y1 надпочечников мыши ( $EC_{50}$  980 нМ) и эстрадиола в клетках яичников крысы ( $EC_{50}$  10,5 нМ), причём его действие сходно с таковым ФСГ, хотя и уступает ему по эффективности [33]. Ни одно из производных тиазолидин-4-она не замещает  $[^{125}I]$ ФСГ, что указывает на их связывание с трансмембранным каналом серпантинного домена рецептора. С помощью химерных рецепторов, совмещающих различные участки рецепторов ФСГ и ТТГ, установлено, что производные тиазолидин-4-она взаимодействуют с N-концевой частью серпантинного домена рецептора ФСГ, включающей TM1, TM2 и ВП-1, и вызывают конформационные изменения в цитоплазматических петлях рецептора, которые ведут к активации  $G_s$ -белков и запуску сАМР-зависимых каскадов. Таким образом, производные тиазолидин-4-она являются аллостерическими регуляторами рецептора ФСГ и могут быть применены в клинике как индукторы овуляции.

4



5



6

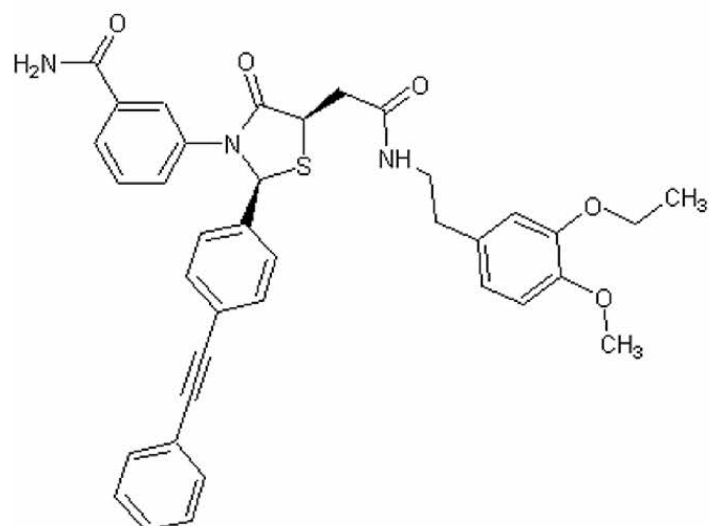
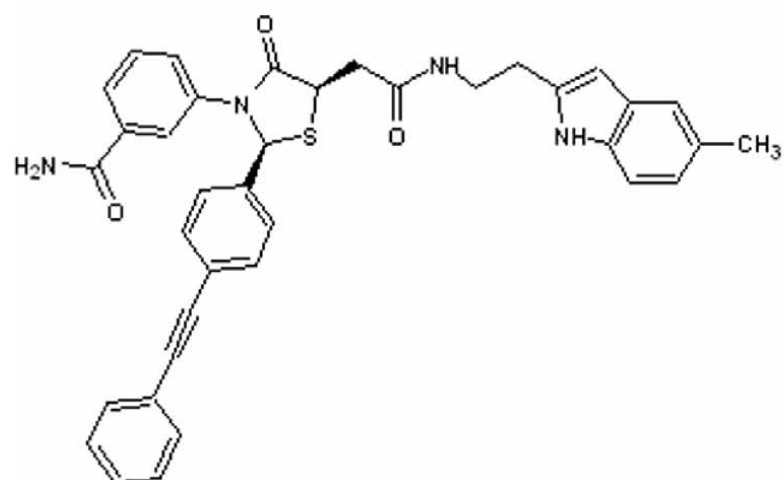


Рисунок 3.

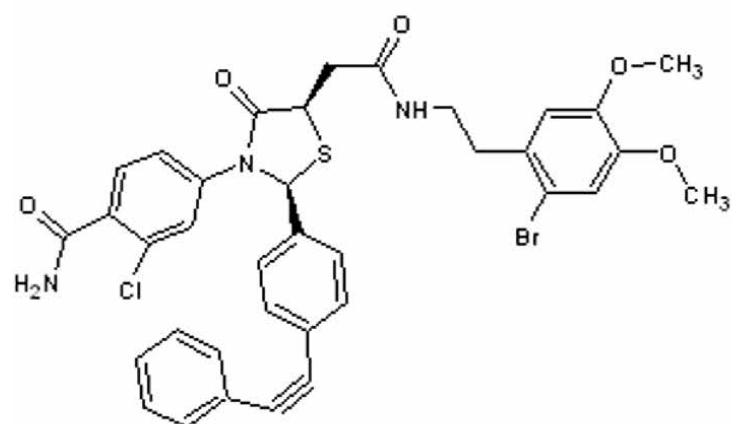
Низкомолекулярные агонисты рецептора фолликулостимулирующего гормона.



7



8



9

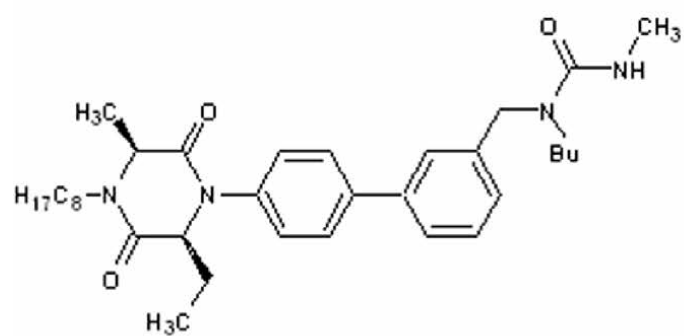


Рисунок 3.

Низкомолекулярные агонисты рецептора фолликулостимулирующего гормона (продолжение).

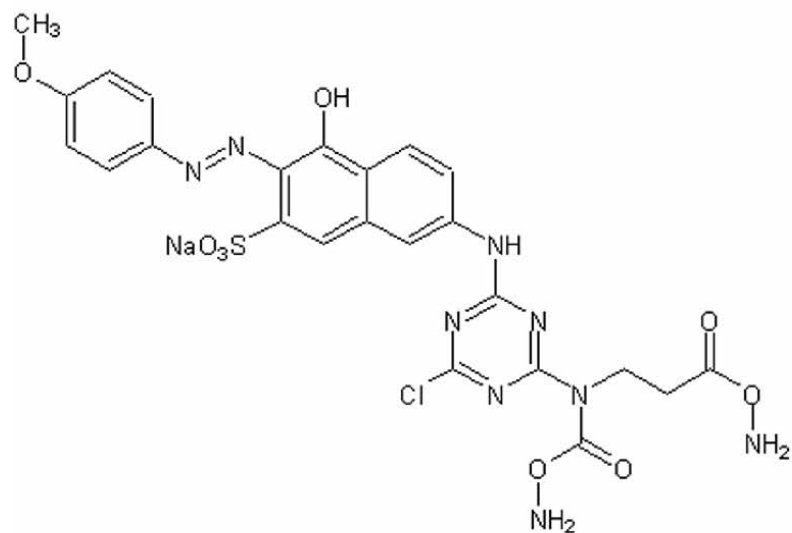
Другим классом веществ, агонистов рецептора ФСГ, являются бифенильные производные, которые были обнаружены в результате скрининга двух миллионов соединений и по времени открытия стали первыми низкомолекулярными лигандами для рецептора ФСГ [36, 37]. Наиболее активным среди них является вещество 9 (рис. 3), в котором в *пара*-положении одного фенильного радикала расположено дикетопиперазиновое кольцо, модифицированное гидрофобным октильным радикалом, а в *мета*-положении другого фенильного радикала – N-бутильное производное мочевины [37]. Вещество 9 стимулирует АЦ со значением  $EC_{50}$  1,2 нМ, являясь частичным агонистом рецептора ФСГ. В настоящее время получены и другие агонисты рецептора ФСГ на основе тетрагидрохинолина, гексагидрохинолина, карбазола, тиено[2,3-*D*]пиримидина, изоксазолилтиазола и пиразола [22]. Наиболее эффективные из них запатентованы фармацевтическими компаниями (“Organon Biosciences”, “Serono RBI”, “ARS Holding”, “Arena”).

### 3. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТАГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА.

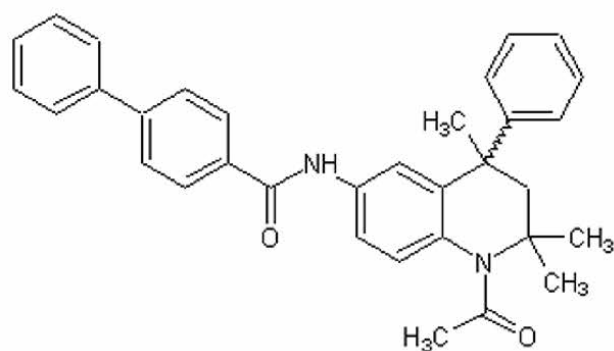
В отличие от рецептора ЛГ, в случае рецептора ФСГ синтезированы не только агонисты, но и антагонисты этого рецептора, причем первый из них – производное диазонафталинсульфокислоты – был обнаружен ещё в 2002 г. [38]. Этот антагонист, 7-{4-[бис-(2-карбамоил-этил)-амино]-6-хлор-(1,3,5)-триазин-2-иламино)-4-гидрокси-3-(4-метокси-фенилазо)-нафтален}-2-сульфоновая кислота (вещество 10, рис. 4), снижает связывание [ $^{125}$ I]ФСГ с рецептором, однако его ингибирующее влияние реализуется не по конкурентному механизму, что может свидетельствовать в пользу аллостерической модели регуляции лигандсвязывающего сайта эктодомена при связывании вещества 10 с серпантинным доменом. Вещество 10 является высоко селективным для рецептора ФСГ и не влияет на функциональную активность других рецепторов гликопротеиновых гормонов. Оно дозозависимо ингибирует повышение уровня сАМР, вызываемое ФСГ, и блокирует эффекты гормона, реализуемые через сАМР-зависимые сигнальные каскады. Вещество 10 блокирует стимуляцию ФСГ стероидогенеза как в линии клеток Y1 надпочечников мыши, так и в первичной культуре клеток яичников крысы. Кроме того в клетках яичников обнаружено блокирование этим веществом стимулирующего эффекта ФСГ на активность ароматазы, регуляция которой осуществляется через посредство сАМР-зависимых сигнальных путей. Введение вещества 10 полностью блокирует овуляцию, что может указывать на перспективность его применения в качестве нового средства для контрацепции [38].

Другими антагонистами рецептора ФСГ являются производные 6-амино-4-фенил-тетрагидрохинолина, созданные на основе структурно близких им производных тетрагидрохинолина с активностью агонистов [39]. Наиболее активным из них оказалось вещество 11 (рис. 4), у которого в положении 6 находится бифенильный радикал. Значения  $IC_{50}$  для ингибирования им стимулированной ФСГ активности АЦ в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (клетки линии GFSHR-17 яичников крысы) составляют 10 и 540 нМ, соответственно. Обработка веществом 11 в значительной степени ингибирует вызываемую ФСГ стимуляцию роста незрелых фолликулов мыши и на 78% снижает овуляцию. Вещество 11 практически не влияет на связывание [ $^{125}$ I]ФСГ с рецептором, что свидетельствует о его взаимодействии с трансмембранным каналом серпантинного домена. Поскольку как вещество 11, так и вещество 10 не способны сами стимулировать активность АЦ, то можно предположить, что они блокируют активацию серпантинного домена эктодоменом, но не способны, в отличие от агонистов, вызывать в серпантинном домене такие конформационные изменения, которые ведут к активации им  $G_s$ -белка [39].

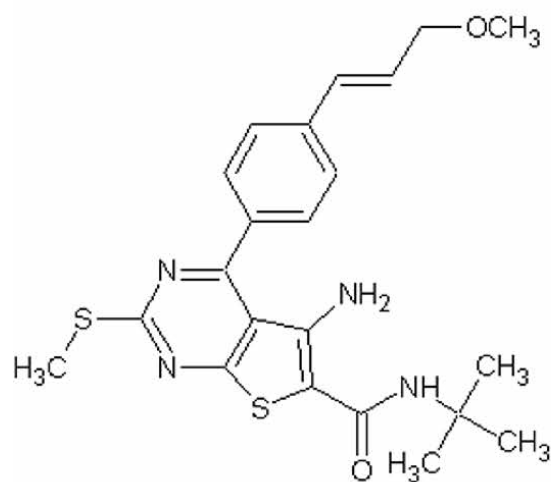
10



11



12



**Рисунок 4.**

Низкомолекулярные антагонисты рецепторов фолликулостимулирующего (вещества 10 и 11) и тиреотропного (вещество 12) гормонов.

В настоящее время запатентованы четыре антагониста, которые относятся к классам аминоксиламидов, пиперазинов, пиррол[2,1-*c*]-бензодиазепинов и индола [22]. Следует отметить, что все антагонисты, исключая производные пиперазина, содержат бифенильные радикалы, которые являются, как полагают важнейшей структурной детерминантой, необходимой для эффективного взаимодействия низкомолекулярных лигандов с серпантинным доменом рецептора ФСГ.

#### 4. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА.

Обнаружение у вещества Ovg41841 (агонист рецептора ЛГ) способности стимулировать рецептор ТТГ позволило создать на его основе эффективный антагонист рецептора ТТГ – вещество 12 (рис. 4) [27]. Моделирование лигандсвязывающего сайта, локализованного в трансмембранном канале рецептора ТТГ, показало, что он, в отличие от рецептора ЛГ, содержит сильно гидрофобные АКО, расположенные в интерфейсах ТМ4/ВП-2, ТМ5/ВП-2 и ТМ6/ВП-3 и формирующие вход во внутреннее пространство сайта. Основываясь на этих результатах, метоксигруппа, присоединенная в *мета*-положении к фенильному радикалу, связанному в молекуле Ovg41841 с тиенопиримидиновым кольцом, была заменена на более гидрофобную метоксипропиленовую группу, присоединенную в пара-положение фенила [27]. Вследствие такой модификации вещество 12 стало более эффективно взаимодействовать с лигандсвязывающим сайтом серпантинного домена рецептора ТТГ и, в частности, с ВП-2. Показано также, что аминокислота вещества Ovg41841, которое является частичным агонистом рецептора ТТГ, взаимодействует с остатком Glu3.37, в то время как аминокислота вещества 12 не доступна для такого взаимодействия. Вероятно, перечисленные выше структурные особенности и наделяют вещество 12 свойствами антагониста.

Вещество 12 в концентрации 30 мкМ на 71% снижает стимулирующий АЦ эффект ТТГ. Значение  $IC_{50}$  для ингибирования им активности рецептора ТТГ составляет 4,2 мкМ. Наряду с этим, в условиях *in vivo* вещество 12 отчетливо снижает вызываемую ТТГ и тиреоидстимулирующими антителами (TsAb) активацию экспрессии мРНК тиреопероксидазы в первичной культуре тиреоцитов человека [27]. Следует, однако, отметить, что вещество 12 способно, хотя и с низкой эффективностью, активировать рецептор ЛГ – его стимулирующий АЦ эффект составляет 17% от такового самого гормона. Это необходимо учитывать при разработке новых лигандов рецептора ТТГ, чтобы избежать побочных эффектов его низкомолекулярных антагонистов.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Обнаружение способности низкомолекулярных лигандов непептидной природы активировать LGR-рецепторы гипофизарных гликопротеиновых гормонов путём взаимодействия с их серпантинным доменом, заставляет рассматривать рецепторы ЛГ, ФСГ и ТТГ, как двухкомпонентную систему, состоящую из внеклеточного регуляторного домена и вполне самодостаточного серпантинного домена, который структурно близок классическим рецепторам серпантинного типа, активируемым небольшими по размеру лигандами. Действительно, как отмечалось выше, рецептор ТТГ, лишенный эктодомена, хотя и не отвечает на стимуляцию ТТГ, но сохраняет способность активировать G-белки и функционально сопряженные с ними ферменты-генераторы вторичных посредников – АЦ и ФЛС [19]. Обнаружено также, что серпантинный домен рецептора ФСГ определяет специфичность его активации гликопротеиновым гормоном [40]. Мутации T3.32A, T3.32I, I5.54T, D6.30N и D6.30G в серпантинном домене этого рецептора не только приводят к повышению его базальной активности, но и делают мутантный рецептор чувствительным к чХГ и ТТГ при сохранении чувствительности к ФСГ [41–44]. Предполагается, что причиной этого является не столько изменение связывающих характеристик эктодомена рецептора, сколько значительное снижение порога

активации серпантинного домена. Замена высоко консервативного остатка Asp6.30 в серпантинных доменах рецепторов ЛГ и ТТГ также приводит к значительному повышению их базальной активности, но, в отличие от рецептора ФСГ, не влияет на специфичность мутантных рецепторов к гормонам. Природные мутации этого остатка в рецепторе ФСГ приводят к синдрому спонтанной гиперстимуляции яичников [44], в рецепторе ЛГ – к преждевременному половому созреванию мальчиков [8], в рецепторе ТТГ – к гиперфункционирующим аденомам щитовидной железы и аутосомальному доминантному гипертиреозу [45, 46]. Таким образом, направленное воздействие на серпантинный домен LGR-рецепторов гликопротеиновых гормонов, минуя эктодомен, является важнейшим уровнем регуляции их функциональной активности и контроля над сигнальными каскадами, запускаемыми гонадотропинами и ТТГ.

Следует отметить, что сходная ситуация может реализовываться и в случае других LGR-рецепторов, в частности рецепторов релаксина (LGR7) и инсулиноподобного фактора 3 (LGR8). В пользу этого свидетельствует сходство структурно-функциональной организации и механизмов регуляции этих рецепторов и рецепторов гликопротеиновых гормонов. Серпантинный домен в рецепторах LGR7 и LGR8 в значительной степени определяет как функциональную активность рецепторов, так и специфичность связывания гормонов с их эктодомом. Известно, что релаксин Н2 с одинаковой эффективностью связывается с обоими рецепторами, в то время как релаксин Н3 – только с LGR7. В случае химерного рецептора, состоящего из эктодомена LGR7 и серпантинного домена LGR8, выявлено снижение стимуляции активности АЦ, вызываемое релаксином Н3, и резкое снижение способности релаксина Н3 замещать меченый [<sup>32</sup>P] релаксин Н2 [47]. Замещение в химерном рецепторе ВП-2 LGR8 на таковую LGR7 восстанавливало связывание релаксина Н3 и стимуляцию этим гормоном АЦ. Необходимо подчеркнуть, что ВП-2 играет ключевую роль в формировании лигандсвязывающего сайта серпантинного домена рецепторов гликопротеиновых гормонов. Следовательно, по аналогии с рецепторами ЛГ, ФСГ и ТТГ, для рецепторов LGR7 и LGR8 должны существовать низкомолекулярные регуляторы их функциональной активности, которые, с учетом дороговизны и низкой доступности релаксина и родственных ему пептидов, могут стать перспективными и востребованными препаратами для лечения заболеваний, связанных с нарушением функций рецепторов LGR7 и LGR8.

В заключение отметим, что наряду с веществами, способными взаимодействовать с трансмембранным каналом LGR-рецепторов, эффективными регуляторами их функционального сопряжения с G-белками являются синтетические пептиды, соответствующие участкам цитоплазматических петель рецептора, непосредственно активирующими G-белки, как это показано нами для релаксинового рецептора LGR7 [48, 49] и другими авторами для рецептора ФСГ [50]. Это создаёт предпосылки еще для одного уровня регуляции сигнальной трансдукции, осуществляемой через LGR-рецепторы. Однако для эффективного применения пептидных регуляторов в условиях *in vivo* необходимо модифицировать их таким образом, чтобы они могли доставляться непосредственно к клеткам-мишеням [51]. Преимуществом низкомолекулярных агонистов непептидной природы как раз и является способность этих веществ адресно поступать в те органы и ткани, на которые направлено их регуляторное влияние.

Работа поддержана “Фондом содействия отечественной науке” и грантом РФФИ № 06-04-48809.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Oh D.Y., Kim K., Kwon H.B., Seong J.Y. (2006) *Int. Rev. Cytol.*, **252**, 163-218.
2. Dias J.A., Cohen B.D., Lindau-Shepard B., Nechamen C.A., Peterson A.J., Schmidt A. (2002) *Vitam. Horm.*, **64**, 249-322.
3. Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D.L. (2002) *Endocr. Rev.*, **23**, 141-174.



4. *Szkudlinski M.W., Fremont V., Ronin C., Weintraub B.D.* (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 473-502.
5. *Hsu S.Y., Nakabayashi K., Nishi S., Kumagai J., Kudo M., Sherwood O.D., Hsueh A.J.* (2002) *Science*, **295**, 671-674.
6. *Kumagai J., Hsu S.Y., Matsumi H., Roh J.S., Fu P., Wade J.D., Bathgate R.A., Hsueh A.J.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31283-31286.
7. *Misrahi M., Beau I., Meduri G., Bouvattier C., Atger M., Loosfelt H., Ghinea N., Hai M.V., Bougneres P.F., Milgrom E.* (1998) *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, **12**, 35-66.
8. *Themmen A.P.N., Huhtaniemi I.T.* (2000) *Endocr. Rev.*, **21**, 551-583.
9. *Davies T.F., Ando T., Lin R.Y., Torner Y., Latif R.* (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 1972-1983.
10. *Ivell R., Einspanier A.* (2002) *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 343-348.
11. *Bathgate R.A.D., Hsueh A.J.W., Sherwood O.D.* (2006) in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (J.D. Neill ed.) Academic Press, San Diego, pp. 679-768.
12. *Vassart G., Pardo L., Costagliola S.* (2004) *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 119-126.
13. *Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F.* (2007) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **260**, 126-136.
14. *Van Koppen C.J., Zaman G.J.R., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., Van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G.J.M.* (2008) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, DOI 10.1007/s00210-008-0318-3.
15. *Nishi S., Hsu S.Y., Zell K., Hsueh A.J.* (2000) *Endocrinology*, **141**, 4081-4090.
16. *Karges B., Gidenne S., Aumas C., Haddad F., Kelly P.A., Milgrom E., De Roux N.* (2005) *Mol. Endocrinol.*, **19**, 2086-2098.
17. *Yi C.S., Song S., Ryu K.S., Ji I., Ji T.H.* (2002) *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 932-940.
18. *Vlaeminck V., Ho S.C., Rodien P., Vassart G., Costagliola S.* (2002) *Mol. Endocrinol.*, **16**, 736-746.
19. *Zhang M., Tong K.P., Fremont V., Chen J., Narayan P., Puett D., Weintraub B.D., Szkudlinski M.W.* (2000) *Endocrinology*, **141**, 3514-3517.
20. *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) *Chembiochem.*, **3**, 1023-1026.
21. *Heitman L.H., Oosterom J., Bongers K.M., Timmers C.M., Wiegerinck P.H.G., Ijzerman A.P.* (2007) *Mol. Pharmacol.*, **73**, 518-524.
22. *Heitman L.H., Ijzerman A.P.* (2008) *Med. Res. Rev.*, DOI 10.1002/med.20129.
23. *Hong S., Ryu K.S., Oh M.O., Ji I., Ji T.H.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4166-4171.
24. *Nakabayashi K., Kudo M., Kobilka B., Hsueh A.J.W.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30264-30271.
25. *Jiang M., Lamminen T., Pakarinen P., Hellman J., Manna P., Herrera R.J., Huhtaniemi I.* (2002) *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 201-212.
26. *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) *J. Biol. Chem.*, **281**, 9841-9844.
27. *Neumann S., Kleinau G., Costanzi S., Moore S., Jiang J.K., Raaka B.M., Thomas C.J., Krause G., Gershengorn M.C.* (2008) *Endocrinology*, DOI: 10.1210/en.2008-0836.
28. *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) *J. Med. Chem.*, **49**, 3888-3896.
29. *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) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2080-2085.
30. *Bouloux P.M., Handelsman D.J., Jockenhovel F., Nieschlag E., Rabinovich J., Frasa W.L., de Bie J.J., Woortman G., Itskovitz-Eldor J.* (2001) *Hum. Reprod.*, **16**, 1592-1597.

31. Klein J., Lobel L., Pollak S., Lustbader B., Ogden R.T., Sauer M.V., Lustbader J.W. (2003) *Hum. Reprod.*, **18**, 50-56.
32. Maclean D., Holden F., Davis A.M., Scheuerman R.A., Yanofsky S., Holmes C.P., Fitch W.L., Tsutsui K., Barrett R.W., Gallop M.A. (2004) *J. Comb. Chem.*, **6**, 196-206.
33. Yanofsky S.D., Shen E.S., Holden F., Whitehorn E., Aguilar B., Tate E., Holmes C.P., Scheuerman R., MacLean D., Wu M.M., Frail D.E., Lopez F.J., Winneker R., Arey B.J., Barrett R.W. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 13226-13233.
34. Wrobel J., Jetter J., Kao W., Rogers J., Di L., Chi J., Perez M.C., Chen G.C., Shen E.S. (2006) *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5729-5741.
35. Pelletier J.C., Rogers J., Wrobel J., Perez M.C., Shen E.S. (2005) *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 5986-5995.
36. Guo T., Adang A.E., Dolle R.E., Dong G., Fitzpatrick D., Geng P., Ho K.K., Kultgen S.G., Liu R., McDonald E., McGuinness B.F., Saionz K.W., Valenzano K.J., van Straten N.C., Xie D., Webb M.L. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1712-1716.
37. Guo T., Adang A.E., Dong G., Fitzpatrick D., Geng P., Ho K.K., Jibilian C.H., Kultgen S.G., Liu R., McDonald E., Saionz K.W., Valenzano K.J., van Straten N.C., Xie D., Webb M.L. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1717-1720.
38. Arey B.J., Deecher D.C., Shen E.S., Stevis P.E., Meade E.H., Wrobel J., Frail D.E., Lopez F.J. (2002) *Endocrinology*, **143**, 3822-3829.
39. Van Straten N.C., van Berkel T.H., Demont D.R., Karstens W.J., Merckx R., Oosterom J., Schulz J., van Someren R.G., Timmers C.M., van Zandvoort P.M. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 1697-1700.
40. Costagliola S., Urizar E., Mendive F., Vassart G. (2005) *Reproduction*, **130**, 275-281.
41. Smits G., Olatunbosun O., Delbaere A., Pierson R., Vassart G., Costagliola S. (2003) *New Engl. J. Med.*, **349**, 760-766.
42. Vasseur C., Rodien P., Beau I., Desroches A., Gerard C., de Poncheville L., Chaplot S., Savagner F., Croue A., Mathieu E., Lahlou N., Descamps P., Misrahi M. (2003) *New Engl. J. Med.*, **349**, 753-759.
43. Montanelli L., Delbaere A., Di Carlo C., Nappi C., Smits G., Vassart G., Costagliola S. (2004) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 1255-1258.
44. Montanelli L., Van Durme J.J., Smits G., Bonomi M., Rodien P., Devor E.J., Moffat-Wilson K., Pardo L., Vassart G., Costagliola S. (2004) *Mol. Endocrinol.*, **18**, 2061-2073.
45. Parma J., Duprez L., Van Sande J., Cochaux P., Gervy C., Mockel J., Dumont J.E., Vassart G. (1993) *Nature*, **365**, 649-651.
46. Duprez L., Parma J., Van Sande J., Allegeier A., Leclere J., Schwartz C., Delisle M.J., Decoulx M., Orgiazzi J., Dumont J.E., Vassart G. (1994) *Nature*, **377**, 396-401.
47. Sudo S., Kumagai J., Nishi S., Layfield S., Ferraro T., Bathgate R.A., Hsueh A.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7855-7862.
48. Шпаков А.О., Перцева М.Н., Гурьянов И.А., Власов Г.П. (2005) *Биол. мембраны*, **22**, 435-442.
49. Shpakov A.O., Gur'yanov I.A., Kuznetsova L.A., Plesneva S.A., Shpakova E.A., Vlasov G.P., Pertseva M.N. (2007) *Neurosci. Behav. Physiol.*, **37**, 705-714.
50. Grasso P., Deziel M.R., Reichert L.E. (1995) *Regul. Pept.*, **60**, 177-183.
51. Shpakov A.O., Pertseva M.N. (2007) in: *Signal Transduction Research Trends* (N.O. Grachevsky ed.) Nova Science Publishers, Inc., NY, pp. 45-93.

Поступила: 15. 10. 2008.

**LOW-MOLECULAR REGULATORS OF POLYPEPTIDE HORMONES RECEPTORS  
CONTAINING LGR-REPEATS**

*A.O. Shpakov, E.A. Shpakova*

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
Thorez av., 44, St. Petersburg, 194223 Russia; fax: +7 (812) 552 30 12; e-mail: alex\_shpakov@list.ru

During the last years the low-molecular non-peptidic regulators of the polypeptide hormones receptors containing LGR-repeats were identified. In the review the data on the structure and the molecular mechanisms of action of these regulators as agonists and antagonists of the luteinizing, follicle-stimulating and thyrotropin hormones are analyzed and systematized. The regulators interact with the serpentine domain of LGR-receptor and trigger the signaling cascades coupled with the receptor. Low-molecular agonists and antagonists of the LGR-receptors are considered as a new generation of the drugs that regulates the functional activity of sensitive to pituitary glycoprotein hormones signaling systems with high efficiency and selectivity. These regulators are more accessible compared to the hormones and can be use orally.

**Key words:** luteinizing hormone, low-molecular agonist, receptor, thyrotropin hormone, follicle-stimulating hormone, LGR-repeat.