

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНФОСФАТАЗ РТР1В И ТСРТР НА ОСНОВЕ 4-ОКСО-1,4-ДИГИДРОЦИННОЛИНА

К.В. Деркач<sup>1\*</sup>, И.О. Захарова<sup>1</sup>, А.А. Бахтюков<sup>1</sup>, В.Н. Сорокоумов<sup>2</sup>, В.С. Кузнецова<sup>1</sup>, А.О. Шпаков<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44; \*эл. почта: derkach\_k@list.ru

<sup>2</sup>Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, 198504, Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский пр., 26

<sup>3</sup>Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, 199106, Санкт-Петербург, 21-я линия, 8А

Функциональные нарушения при ожирении во многом обусловлены снижением чувствительности тканей к инсулину и лептину. Одним из путей её восстановления является ингибирование протеинфосфотирозинфосфатазы 1В (РТР1В) и Т-клеточной протеинфосфотирозинфосфатазы (ТСРТР) — негативных регуляторов инсулинового и лептинового сигналинга. Несмотря на прогресс в разработке ингибиторов этих фосфатаз коммерческие препараты на их основе не разработаны, а механизмы действия мало изучены. Цель работы состояла в исследовании влияния новых производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина (PI04, PI06, PI07) на активность РТР1В и ТСРТР, а также в изучении влияния их пятидневного внутрибрюшинного введения (10 мг/кг/сутки) крысам Wistar с индуцированным диетой ожирением на массу тела и жира, метаболические и гормональные показатели, экспрессию генов фосфатаз и рецепторов инсулина и лептина в печени. Показано, что PI04 является мягким низкоселективным ингибитором обеих фосфатаз (РТР1В, IC<sub>50</sub>=3,42(2,60–4,51) мкМ; ТСРТР, IC<sub>50</sub>=4,16(3,49–4,95) мкМ), в то время как PI06 и PI07 предпочтительно ингибируют РТР1В (IC<sub>50</sub>=3,55(2,63–4,78) мкМ) и ТСРТР (IC<sub>50</sub>=1,45(1,18–1,78) мкМ) соответственно. PI04 значительно снижал потребление корма, массу тела и жира, ослаблял гипергликемию, нормализовал толерантность к глюкозе, базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина, индекс инсулиновой резистентности. Несмотря на анорексигенный эффект, PI06 и PI07 были менее эффективными, слабо влияя на глюкозный гомеостаз и чувствительность к инсулину. PI04 существенно повышал экспрессию генов *РТР1В* и *ТСРТР* и снижал экспрессию генов рецепторов инсулина и лептина. PI06 и PI07 слабо влияли на эти показатели. Таким образом, PI04 — ингибитор фосфатаз РТР1В и ТСРТР — с большей эффективностью в сравнении с ингибиторами РТР1В (PI06) и ТСРТР (PI07) восстанавливал метаболические и гормональные показатели у крыс с ожирением, что указывает на перспективность создания смешанных РТР1В/ТСРТР-ингибиторов для коррекции метаболических расстройств.

**Ключевые слова:** протеинфосфотирозинфосфатаза 1В; Т-клеточная протеинфосфотирозинфосфатаза; ингибитор; ожирение; аппетит; инсулин; лептин; печень

**DOI:** 10.18097/PBMC20226806427

### ВВЕДЕНИЕ

Фермент протеинфосфотирозинфосфатаза 1В (РТР1В, КФ 3.1.3.48) является негативным регулятором сигнальных путей, активируемых инсулином, лептином, инсулиноподобным фактором роста-1, эпидермальным фактором роста и рядом других ростовых факторов, действующих через рецепторы тирозинкиназного типа [1-3]. В случае инсулинового сигналинга, РТР1В дефосфорилирует и, тем самым, ингибирует гормон-активированный инсулиновый рецептор и функционально сопряжённые с ним белки-субстраты-1/2 инсулинового рецептора (IRS1/2-белки), которые фосфорилируются в процессе активации инсулинового рецептора гормоном [4, 5]. В случае лептинового сигналинга РТР1В осуществляет дефосфорилирование и ингибирование нерцепторной тирозинкиназы JAK2, ассоциированной с лептиновым рецептором, и IRS1/2-белков, которые стимулируются через JAK2-опосредуемый механизм [2, 6]. Ингибирование фосфатазы РТР1В приводит к снятию её негативного влияния на рецепторные и

пострецепторные звенья инсулинового и лептинового сигналинга и усилению активации внутриклеточных мишеней инсулина и лептина. Поскольку в условиях метаболических расстройств (абдоминального ожирения, сахарного диабета 2-го типа и метаболического синдрома) отмечается ослабление инсулиновых и лептиновых сигнальных путей, обусловленных длительной гиперинсулинемией и гиперлептинемией, применение ингибиторов РТР1В может стать одним из фармакологических подходов для их восстановления [3, 7]. Ингибирующий эффект на активность РТР1В может достигаться путём взаимодействия как с каталитическим, так и с аллостерическим сайтами фермента, причём аллостерическое взаимодействие предпочтительнее, поскольку оно является более специфичным. Это обусловлено тем, что аллостерический сайт в РТР1В, в сравнении с каталитическим сайтом, в большей степени отличается от аллостерических сайтов в родственных РТР1В тирозинфосфатазах — Т-клеточной протеинфосфотирозинфосфатазе (ТСРТР) и эндотелиальной фосфатазе SHP1 [3, 7, 8]. Важно

отметить, что ТСРТР также способна ослаблять инсулиновый и лептиновый сигнальные пути, действуя на их рецепторные и пострецепторные компоненты [1, 9]. Ингибиторы ТСРТР, подобно ингибиторам РТР1В, способны улучшать глюкозный гомеостаз и препятствовать ожирению при метаболическом синдроме и сахарном диабете 2-го типа [10]. Однако они характеризуются рядом серьезных побочных эффектов и онкогенным потенциалом, что, хотя и в существенно меньшей степени, присуще ингибиторам РТР1В [11, 12]. Вследствие этого предпринимаются попытки разработать препараты, которые являются мягкими, но селективными ингибиторами фосфатазы РТР1В, при этом слабо влияют на фосфатазу ТСРТР [3, 11].

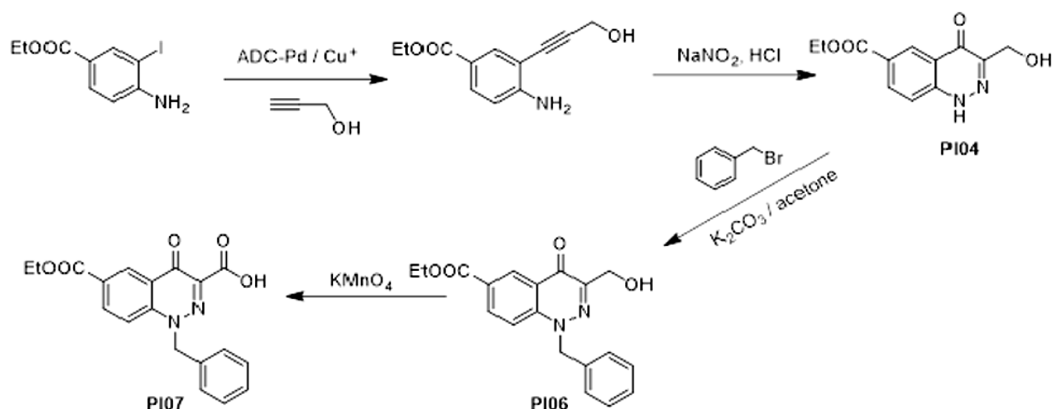
Несмотря на значительные усилия, предпринятые для разработки ингибиторов РТР1В, в настоящее время отсутствуют коммерческие препараты для подавления активности этого фермента [13]. Это во многом обусловлено побочными эффектами, которые выявляются в ходе их применения *in vivo* в доклинических исследованиях, а также риском усиления пролиферации клеток и возникновения очагов опухолевого роста [3, 14]. Парадоксально, но одной из причин сравнительно высокой токсичности синтетических ингибиторов РТР1В является стремление получить высокоактивные ингибиторы, действующие в основном на каталитический сайт фермента. Соответственно, необходима смена парадигмы создания таких ингибиторов, направленная на разработку мягких ингибиторов РТР1В, реализующих свои эффекты посредством взаимодействия с аллостерическим сайтом. При этом востребованность ингибиторов РТР1В остаётся высокой, поскольку они могут оказаться очень эффективными при лечении метаболических расстройств, ассоциированных с ожирением [14]. Среди разработанных в настоящее время аллостерических ингибиторов РТР1В значительную часть составляют гетероциклические соединения [2], в том числе

производные 4-оксо-1,4-дигидроциннолина [15, 16]. Ранее нами было разработано новое производное 4-оксо-1,4-дигидроциннолина — соединение PI04, которое оказывало стимулирующее влияние на компоненты лептинового сигналинга в гипоталамических нейронах крысы [17].

Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании влияния соединения PI04 и его аналогов PI06 и PI07 — новых производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина — на активность фосфатаз РТР1В и ТСРТР в условиях *in vitro*, а также в изучении фармакологического эффекта их курсового введения на метаболические и гормональные показатели у крыс с индуцированным диетой ожирением. В экспериментах *in vivo* оценивали влияние производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина на пищевое поведение, глюкозный гомеостаз, инсулиновую и лептиновую резистентность, липидный статус, экспрессию генов тирозинфосфатаз и рецепторов инсулина и лептина в печени.

## МЕТОДИКА

Синтез производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина осуществляли с использованием комбинации реакций Соногаширы и Рихтера для формирования циннолиновой системы (рис. 1). В реакции Соногаширы в качестве катализатора были использованы ациклические диаминокарбеновые комплексы двухвалентного палладия, причём катализатор использовали в очень низких концентрациях, составляющих около 0,001 мольных процента. Применение такого катализатора обеспечивало высокий выход и селективность синтеза соединений, что снижало число стадий синтеза и упрощало процедуру очистки целевого продукта. Очистку производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина осуществляли с использованием адсорбционной колонной хроматографии на Silica Gel 60 (“Merck Millipore”, США), чистота целевых



**Рисунок 1.** Схема синтеза ингибиторов протеинфосфотирозинфосфатазы 1В на основе производных 4-оксо-1,4-дигидроциннолина. В качестве исходного соединения был избран этил 4-амино-2-йодбензоат, из которого путём обработки пропаргильовым спиртом в присутствии ациклического диаминокарбенового комплекса палладия (II) как катализатора, получали этил 4-амино-3-(3-гидроксипроп-1-ин-1-ил) бензоат. Далее с помощью реакции диазотирования с использованием нитрита натрия в соляной кислоте из этил 4-амино-3-(3-гидроксипроп-1-ин-1-ил)бензоата получали этил 3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилат (PI04), из которого последовательно получали этил 1N-бензил-3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилат (PI06) с помощью обработки PI04 бензилбромидом и 1-бензил-6-(этоксикарбонил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-3-карбоновую кислоту (PI07) с помощью окисления PI06 перманганатом калия.

соединений при этом составляла не менее 98%. Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили с использованием стеклянных пластин Polygram с нанесённым адсорбционным слоем SIL G/UV254 (SiO<sub>2</sub>, 0,2 мм) ("Macherey-Nagel", США).

Структура полученных соединений была доказана с помощью ЯМР-спектроскопии (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) и масс-спектрометрии высокого разрешения (electrospray ionization – time of flight, ESI-TOF). ЯМР-спектры целевых соединений регистрировали на приборах Bruker 400 Avance (400,13 МГц (<sup>1</sup>H) и 100,61 МГц (<sup>13</sup>C)) и Bruker DPX 300 (300,13 МГц (<sup>1</sup>H) и 75,47 МГц (<sup>13</sup>C)) ("Bruker", Германия) при комнатной температуре. Химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях относительно сигнала резонанса растворителя, константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц. Кратности сигналов описывались следующим образом: s = синглет, d = дублет, t = триплет, m = мультиплет. Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне масс 50-1200 на приборе BrukerMaxisTOF ("Bruker").

#### Данные ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрического анализа:

(1) Этил-3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилат (PI04), C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H NMR (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13,56 (s, 1H), 8,61 (d, J = 1,8 Гц, 1H), 8,22 (dd, J = 8,9; 1,9 Гц, 1H), 7,66 (d, J = 8,8 Гц, 1H), 5,00 (s, 1H), 4,54 (s, 2H), 4,36 (q, J = 7,1 Гц, 2H), 1,36 (t, J = 7,1 Гц, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 МГц, DMSO): δ 170,08; 165,28; 150,90; 143,77; 133,38; 126,92; 125,61; 121,45; 117,56; 61,55; 58,99; 14,63. Найдено: [M+H]<sup>+</sup> 249,0875; рассчитано: [M+H]<sup>+</sup> 249,0883.

(2) Этил-1-бензил-3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилат (PI06), C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H NMR (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,00 (d, J = 2,0 Гц, 1H), 8,24 (dd, J = 9,1; 2,0 Гц, 1H), 7,42 (d, J = 9,1 Гц, 1H), 7,38-7,27 (m, 3H), 7,24-7,17 (m, 2H), 5,64 (s, 2H), 4,87 (d, J = 6,4 Гц, 2H), 4,40 (q, J = 7,1 Гц, 2H), 3,43 (t, J = 6,4 Гц, 1H), 1,40 (t, J = 7,1 Гц, 3H); <sup>13</sup>C NMR (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 170,90; 165,13; 149,14; 143,05; 134,83; 134,18; 129,19; 128,48; 128,43; 126,67; 126,54; 123,00; 115,67; 77,33; 77,01; 76,69; 62,00; 61,52; 59,99; 14,32. Найдено: [M+H]<sup>+</sup> 339,1326; рассчитано: [M+H]<sup>+</sup> 339,1339.

(3) 1-Бензил-6-(этоксикарбонил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-3-карбоновая кислота (PI07), C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. <sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 МГц): δ 1,34 (t, J = 7,1 Гц, 3H), 4,39 (q, J = 7,1 Гц, 2H), 8,31 (d, J = 2,2 Гц, 1H), 8,11 (dd, J = 9,0 Гц; J = 2,2 Гц, 1H), 7,78 (d, J = 9,0 Гц, 1H), 7,22-7,16 (m, 2H), 7,35-7,22 (m, 3H), 14,66 (s, 1H, NH). Найдено: [M+H]<sup>+</sup> 353,1159; рассчитано: [M+H]<sup>+</sup> 353,1132.

Измерение активности фосфатаз RTP1B и TCPTP и их ингибирование с помощью флуорогенного субстрата 6,8-дифтор-4-метилумбеллиферилфосфата (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate, DiFMUP) осуществляли, как описано ранее [18] с некоторыми модификациями. Рекombинантный белок RTP1B человека (#ab51277, "Abcam", Великобритания)

растворяли в 25 mM Tris-HCl-буфере (pH 7,5), содержащем 20% глицерин, 2 mM β-меркаптоэтанол, 1 mM EDTA и 1 mM дитиотреитол до достижения конечной концентрации 1 мкг/мл. Аликвоты с этим раствором RTP1B замораживали и хранили при температуре -20°C. Активная форма рекомбинантного белка TCPTP человека была получена от фирмы "Sigma-Aldrich" (#SRP0218, США) в виде водного буферного раствора в концентрации 2,9 мг/мл, который аликвотировали, замораживали и хранили при температуре -80°C. DiFMUP (#D6567, "Molecular Probes, ThermoFisher Scientific", США) растворяли в N,N-диметилформамиде до конечной концентрации 10 mM, аликвоты замораживали и хранили при температуре -20°C. В качестве стандарта использовали флуорохром 6,8-дифтор-7-гидрокси-4-метилкумарин (6,8-difluoro-7-hydroxy-4-methylcoumarin, DiFMU) (#D6566, "Molecular Probes, ThermoFisher Scientific"). Для определения значений IC<sub>50</sub> (концентрация, вызывающая 50% торможение ферментативной активности) анализ флуоресценции проводили в чёрных плоскостонных 96-луночных планшетах, каждая лунка объёмом по 100 мкл. Фосфатазы RTP1B или TCPTP предварительно инкубировали с тестируемыми соединениями в течение 5 мин при 37°C в диапазоне их концентраций от 0,1 мкМ до 80 мкМ в 50 mM Na-HEPES-буфере (pH 6,9), содержащем 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM дитиотреитола и 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Реакцию отщепления фосфогруппы инициировали после добавления флуорогенного субстрата DiFMUP в соответствующем разведении, что вызывало накопление флуоресцирующего продукта. Для регистрации кинетических кривых RTP1B добавляли к реакционной смеси в концентрации 80 нг/мл, а DiFMUP в концентрации 25 мкМ. В случае TCPTP реакцию проводили в присутствии фермента в той же концентрации 80 нг/мл, но концентрация субстрата DiFMUP была выше и составила 35 мкМ. Возбуждение флуоресценции гидролизованного DiFMUP и флуоресцирующего стандарта DiFMU осуществляли при длине волны 355 нм, эмиссию регистрировали при 460 нм в течение 6-10 мин с интервалами 30 с, используя микропланшетный ридер Fluorockan Ascent FL ("Thermo Electron Corporation", Финляндия). На основании проведенных измерений определяли скорость реакции (V<sub>o</sub>) в нулевой точке для каждой концентрации тестируемого вещества с помощью программы GraphPad Prism. Полученные данные использовали для расчёта значений IC<sub>50</sub>, которые позволяют сравнить эффективность тестируемых соединений.

В экспериментах *in vivo* использовали самцов крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария в пластиковых контейнерах по 5 особей в каждом, с нормальным циклом день-ночь (12 ч / 12 ч) и температурой 22±3°C, со свободным доступом к пище и воде. Ожирение вызывали добавлением в пищевую рацион двухмесячных животных высокожировой добавки, которая включала 52,4% свиного сала, 41,7% творога,

## ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТАЗ PTP1B И TCPTP

5% печёночного паштета, 0,5% L-метионина, 0,2% пекарских дрожжей и 0,2% хлорида натрия, как описано ранее [19]. Животные в зависимости от возраста в течение 16 недель получали от 5 г до 7 г этой высокожировой смеси в сутки как дополнение к стандартному сухому корму. Контрольные крысы вместо высокожировой добавки потребляли только стандартный сухой корм. После 16-недельной высокожировой диеты в группах с ожирением отбирали животных, которые имели повышенную массу тела, постпрандиальную гипергликемию и нарушенную толерантность к глюкозе (не менее 60% крыс). Толерантность к глюкозе оценивали с помощью глюкозотолерантного теста (ГТТ), при проведении которого крысам внутривенно (в/вр) вводили раствор глюкозы из расчёта 2 г/кг и измеряли её уровень в крови до (точка 0) и через 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после нагрузки. Уровни глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены животных, измеряли с помощью тест-полосок “One Touch Ultra” (США) и портативного глюкометра (“Life Scan Johnson & Johnson”, Дания). Забор крови осуществляли в условиях местной анестезии, используя раствор лидокаина (2–4 мг/кг). Основываясь на результатах ГТТ, рассчитывали интегрированную площадь под глюкозной концентрационной кривой ( $AUC_{0-120}$ ), как описано ранее [20]. Критериями отбора были повышение массы тела на 10% и более, повышение уровня глюкозы на 30% и более, повышение значений  $AUC_{0-120}$  в ГТТ на 20% и более по сравнению со средними значениями в контроле.

На следующем этапе формировали 5 групп (в каждой по 10 животных) — контроль (“К”), ожирение без обработки (“ОЖ”), ожирение с пятидневной обработкой соединениями PI04 (“ОЖ+PI04”), PI06 (“ОЖ+PI06”) и PI07 (“ОЖ+PI07”). Все тестируемые ингибиторы PTP1B растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили внутривенно в суточной дозе 10 мг/кг (в объёме 200 мкл), базируясь на результатах предварительных экспериментов. Контрольные крысы и животные группы “ОЖ” вместо препаратов получали ДМСО в том же объёме (200 мкл).

В ходе 5 дней эксперимента, животных переводили на стандартный сухой корм без ограничений в пище и воде. В каждой группе у половины животных ( $n=5$ ) в конце эксперимента (в день, последующий за последней инъекцией препарата, в 10.00), проводили ГТТ, в ходе которого оценивали не только концентрацию глюкозы, но и концентрации лептина и инсулина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки. Уровни инсулина и лептина в крови крыс измеряли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа Rat Insulin ELISA (“Mercodia AB”, Швеция) и ELISA for Leptin, Rat (“Cloud-Clone Corp.”, США). После этого животных наркотизировали с помощью хлоральгидрата (400 мг/кг в/бр), декапитировали и оценивали у них массу эпидидимального и абдоминального жира. Вторую половину животных из каждой группы ( $n=5$ ) в те же сроки наркотизировали, декапитировали и забирали у них образцы печени для оценки экспрессии генов *PTP1B*, *TCPTP* и *SHPI*, кодирующих тирозинфосфатазы PTP1B, TCPTP и SHP1, а также генов *INSR* и *LEPR*, кодирующих инсулиновый и лептиновый рецепторы.

Для оценки экспрессии генов в печени из её образцов выделяли суммарную РНК, используя для этого Extract RNA Reagent (“Евроген”, Россия). Образцы, содержащие 1 мкг РНК, транскрибировали в кДНК с помощью случайных Random-праймеров и реагента MMLV RT kit (“Евроген”). Амплификацию осуществляли в смеси, содержащей 10 нг продукта обратной транскрипции, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров и набор qPCRmix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”), как описано ранее [21]. Амплифицированные сигналы регистрировали с помощью прибора Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”). Нуклеотидные последовательности используемых в работе праймеров представлены в таблице 1. Полученные данные были обработаны методом  $\Delta\Delta C_t$  и выражены как кратность экспрессии целевого гена относительно соответствующего контроля [22]. Результаты нормированы на экспрессию генов, кодирующих 18S-РНК и  $\beta$ -актин.

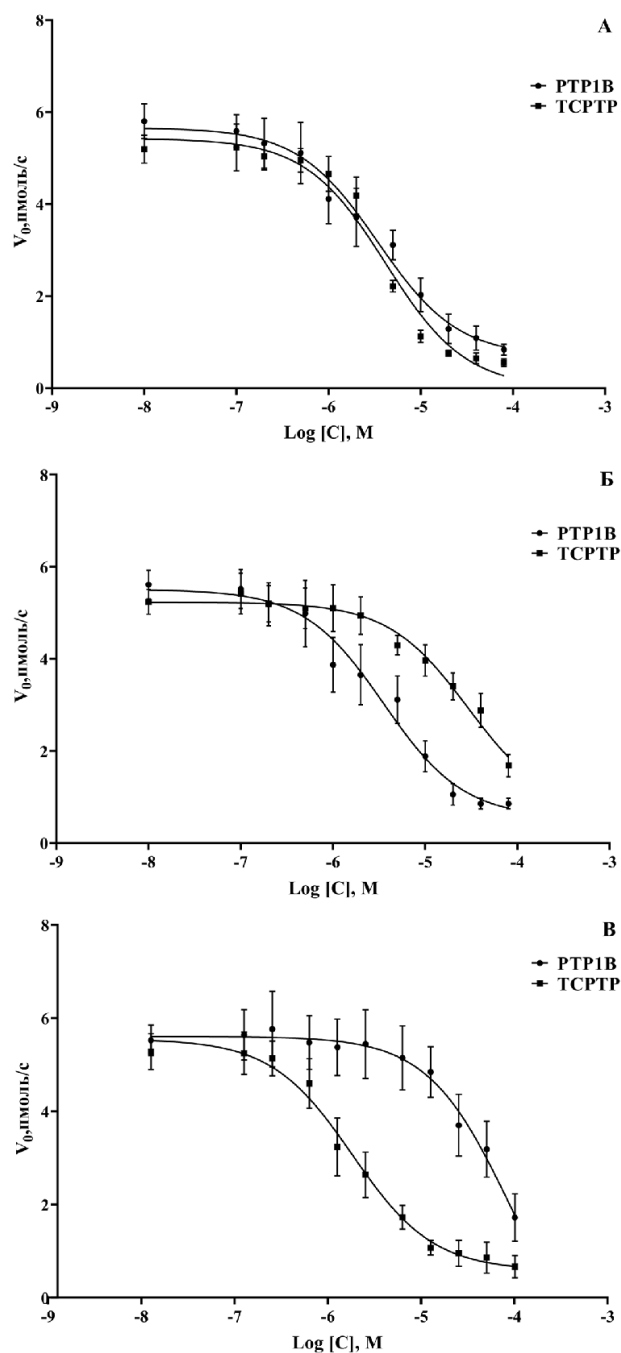
Таблица 1. Праймеры, используемые для оценки экспрессии целевых генов в печени крыс, и их характеристика

Гены	Прямой (For) и обратный (Rev) праймеры	Размер продукта (bp)	Температура отжига (°C)	Идентификатор Genbank
<i>PTP1B</i>	(For) CAACCGAGGAGGAACAAAAGG	129	57	NM_012637
	(Rev) CAGTCTGTCAAGTGAACATACCCG			
<i>TCPTP</i>	(For) GTGGAAGAGAGCAGTGAGAGT	216	56	NM_053990
	(Rev) GGCTTCAGGTCTTGCTTTGC			
<i>SHPI</i>	(For) CAGACTGTTCCCTCCACGTTT	193	56	NM_053908
	(Rev) TGGTCATCCACCCTGACTGA			
<i>INSR</i>	(For) CTGGAGAAGTCTCGGTCATT	139	56	NM_017071
	(Rev) GGCCATAGACACGGAAAAGAAG			
<i>ObRB</i>	(For) GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG	81	57	NM_012596
	(Rev) CAAGCTGTATCGACACTGATTTCTTC			
<i>Actb</i>	(For) CTGGCACCACACCTTCTACA	125	55	NM_031144.3
	(Rev) AGGTCTCAAACATGATCTGGGT			
<i>18S rRNA</i>	(For) GGACACGGACAGGATTGACA	50	56	XM_039106097.1
	(Rev) ACCCACGGAATCGAGAAAGA			

Статистический анализ осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Результаты представляли как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента, для сравнения большего числа выборок — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . При расчёте значений  $IC_{50}$  для ингибиторов фосфатаз в экспериментах *in vitro* данные представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка ( $M \pm SE$ ). Средние значения  $IC_{50}$  и 95% доверительный интервал были рассчитаны с помощью программы GraphPad Prism 8 (“GraphPad Software”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что все три тестируемых соединения характеризуются активностью ингибиторов тирозинфосфатаз, но их специфичность по отношению к РТР1В и ТСРТР существенно различалась, на что указывают формы кинетических кривых (рис. 2) и рассчитанные на их основе значения  $IC_{50}$  (табл. 2). Соединение Р104 имело сходные значения  $IC_{50}$  для обеих фосфатаз, РТР1В и ТСРТР. В свою очередь, Р106 более эффективно в отношении РТР1В, в то время как Р107 — в отношении ТСРТР, на что указывают более низкие значения  $IC_{50}$ , находящиеся в микромолярном диапазоне концентраций для активных ингибиторов (табл. 2). Основываясь на этом, можно заключить, что соединение Р104 проявляет активность смешанного ингибитора РТР1В/ТСРТР, соединение Р106 — ингибитора РТР1В, соединение Р107 — ингибитора ТСРТР. Если оценивать ингибирующее влияние Р104 и Р106 на активность фосфатазы РТР1В, то значения  $IC_{50}$  для них близки и даже ниже таковых для ряда природных ингибиторов РТР1В, а также их синтетических производных и аналогов [23–27]. В то же время Р104 и Р106 уступают по эффективности ряду недавно синтезированных препаратов, имеющих более низкие значения  $IC_{50}$ , таким как  $Cu^{2+}$ -комплекс 4-{{3-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-1-ил}метил}бензойной кислоты и производные имидазолидин-2,4-диона [28, 29], а также природному соединению аспергорахину А, выделенному из экстракта почвенного гриба *Aspergillus gorakhpurensis* [30]. Однако ни один из этих ингибиторов, которые *in vitro* более активны в сравнении с нашими препаратами, не изучен в условиях *in vivo*, что ставит вопрос об их фармакологической релевантности. Для фосфатазы ТСРТР соединения Р104 и Р107 по значениям  $IC_{50}$  были близки другим известным в настоящее время ингибиторам ТСРТР, как природным [27], так и синтетическим [31]. Несмотря на то, что в большинстве случаев исследователи ставят целью разработать ингибиторы, которые являются селективными и высокоэффективными по отношению к фосфатазе РТР1В и слабо или вовсе не влияют



**Рисунок 2.** Концентрационные кривые ингибирования активности тирозинфосфатаз РТР1В и ТСРТР с помощью производных 4-оксо-1,4-дигидроиннолина. А — соединение Р104, Б — соединение Р106, В — соединение Р107.

**Таблица 2.** Значения  $IC_{50}$  для исследуемых ингибиторов тирозинфосфатаз РТР1В и ТСРТР (в мкМ)

Ингибитор	РТР1В	ТСРТР
Р104	3,42 (2,60–4,51)	4,16 (3,49–4,95)
Р106	3,55 (2,63–4,78)	29,2 (19,1–46,7)
Р107	68,2 (35,1–176,8)	1,45 (1,18–1,78)

Примечание. Данные по  $IC_{50}$  представлены как средние по 8 опытам. Значения  $IC_{50}$  представлены как средняя и 95% доверительный интервал.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТАЗ РТР1В И ТСРТР

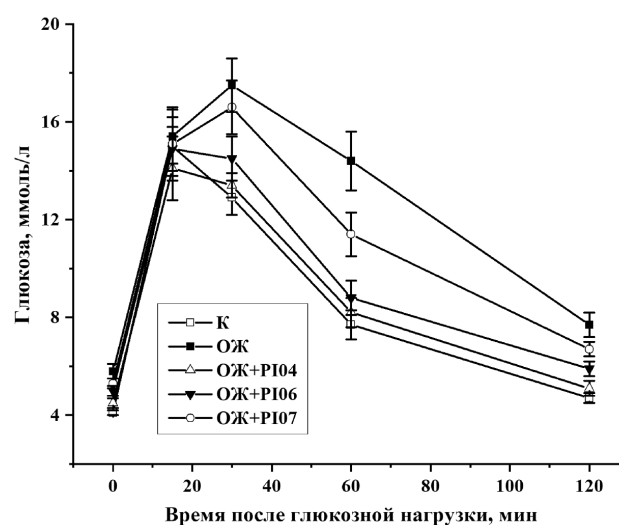
на активность ТСРТР, такая стратегия может оказаться ошибочной. Это обусловлено тем, что сильно выраженное ингибирование активности РТР1В может, с одной стороны, привести к крайне нежелательным токсическим эффектам, что и наблюдают в экспериментах *in vivo*, и, с другой стороны, вызвать компенсаторное повышение активности других фосфатаз, в первую очередь, ТСРТР, способных функционально заменить РТР1В [11, 28, 29, 32]. Вследствие этого мягкие, низкоселективные ингибиторы фосфатаз могут оказаться предпочтительней высокоактивных, селективных ингибиторов РТР1В и ТСРТР, что в экспериментах *in vivo* и продемонстрировали наши исследования.

Эффективность влияния синтезированных нами ингибиторов тирозинфосфатаз на метаболические и гормональные показатели оценивали на модели индуцированного диетой ожирения у самцов крыс Wistar. В группе крыс с ожирением (“ОЖ”), в сравнении с контрольными животными, были повышены масса тела и жировой ткани, соотношение жировой ткани к общей массе тела, нарушена толерантность к глюкозе, о чём свидетельствует повышение значения  $AUC_{0-120}$  для глюкозной кривой в ГТТ, повышены уровни глюкозы, инсулина, лептина и индекс ИР, как базовые, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки (табл. 3, рис. 3). Полученные данные указывают на развитие у животных группы “ОЖ” отчётливо выраженных признаков метаболического синдрома — ожирения, нарушенной толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гиперлептинемии.

Пятидневное лечение с помощью соединения Р104, в одинаковой степени ингибирующего РТР1В и ТСРТР, приводило к значительному снижению потребления корма, оцениваемого по его калорийности, массы тела и жировой ткани и соотношения массы жировой ткани к общей массе тела, нормализовало уровни глюкозы,

инсулина и лептина и снижало индекс ИР (табл. 3). Наряду с этим, повышалась чувствительность к глюкозе, на что указывают более низкое расположение глюкозной кривой в ГТТ в группе “ОЖ+Р104” и значимое снижение значения  $AUC_{0-120}$  в сравнении с группой “ОЖ” (рис. 3, табл. 3).

Лечение Р106, селективным в отношении РТР1В, было менее эффективным. Оно снижало потребление корма и массу абдоминального (но не эпидидимального) жира, долю жировой ткани, базовый и стимулированный глюкозой уровни инсулина и лептина, уровень глюкозы и индекс ИР через 120 мин после глюкозной нагрузки. При этом соединение Р106 значимо не влияло на общую массу тела, базовый уровень глюкозы и на индекс ИР в отсутствие глюкозной нагрузки, отмечалась слабо выраженная тенденция к снижению значения  $AUC_{0-120}$  ( $p=0,051$  в сравнении с группой “ОЖ”) (табл. 3).



**Рисунок 3.** Концентрационные кривые влияния ингибиторов фосфатаз на ГТТ у крыс с ожирением.

**Таблица 3.** Потребление корма, масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина, лептина и индекс ИР до и через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также значения  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в глюкозотолерантном тесте у крыс с ожирением, и влияние на эти показатели ингибиторов тирозинфосфатаз

	К	ОЖ	ОЖ+Р104	ОЖ+Р106	ОЖ+Р107
Масса тела, г	372±6	419±11 <sup>a</sup>	384±5 <sup>b</sup>	393±9	380±8 <sup>b</sup>
Масса АЖ, г	4,8±0,2	11,8±0,6 <sup>a</sup>	6,4±0,4 <sup>a,b</sup>	7,1±0,5 <sup>a,b</sup>	6,3±0,5 <sup>a,b</sup>
Масса ЭЖ, г	3,5±0,1	6,2±0,4 <sup>a</sup>	4,1±0,2 <sup>b</sup>	5,3±0,3 <sup>a</sup>	4,3±0,3 <sup>b</sup>
Доля жира, %	2,25±0,04	4,26±0,14 <sup>a</sup>	2,71±0,12 <sup>a,b</sup>	3,14±0,13 <sup>a,b</sup>	2,76±0,16 <sup>a,b</sup>
Корм, г/крысу/день [ккал/крысу/день]	20,1±0,4	25,11±0,7 <sup>a</sup>	18,3±1,6 <sup>b</sup>	19,4±1,3 <sup>b</sup>	17,1±2,0 <sup>b</sup>
Глюкоза баз., мМ*	4,14±0,14	5,76±0,30 <sup>a</sup>	4,52±0,20 <sup>b</sup>	4,98±0,22	5,06±0,20 <sup>a</sup>
Глюкоза-120, мМ*	4,66±0,16	7,36±0,37 <sup>a</sup>	5,18±0,29 <sup>b</sup>	5,74±0,29 <sup>a,b</sup>	6,22±0,27 <sup>a</sup>
Инсулин баз., нг/мл*	0,65±0,05	1,29±0,15 <sup>a</sup>	0,57±0,04 <sup>b</sup>	0,68±0,09 <sup>b</sup>	0,81±0,10
Инсулин-120, нг/мл*	0,72±0,07	1,82±0,24 <sup>a</sup>	0,69±0,08 <sup>b</sup>	0,82±0,12 <sup>b</sup>	1,02±0,12
Индекс ИР баз., усл. ед.*	2,71±0,15	7,59±1,24 <sup>a</sup>	2,57±0,25 <sup>b</sup>	3,43±0,50	4,14±0,69
Индекс ИР-120, усл. ед.*	3,30±0,20	13,71±2,33 <sup>a</sup>	3,55±0,40 <sup>b</sup>	4,81±0,87 <sup>b</sup>	6,37±0,89 <sup>a</sup>
Лептин баз., нг/мл*	1,01±0,11	3,04±0,24 <sup>a</sup>	1,80±0,24 <sup>b</sup>	1,74±0,23 <sup>b</sup>	1,13±0,14 <sup>b</sup>
Лептин-120, нг/мл*	1,18±0,15	5,62±0,72 <sup>a</sup>	2,18±0,33 <sup>b</sup>	2,40±0,37 <sup>b</sup>	1,48±0,19 <sup>b</sup>
$AUC_{0-120}$ , усл. ед.*	1033±44	1545±104 <sup>a</sup>	1070±56 <sup>b</sup>	1161±61	1351±66 <sup>a</sup>

Примечание. АЖ – абдоминальный жир, ЭЖ – эпидидимальный жир. \* – число животных равно пяти, в остальных случаях n=10. Различия с контролем (a) и с группой “ОЖ” (b) статистически значимы при  $p<0,05$ . Данные представлены как  $M\pm SD$ , \* – n=5, в остальных случаях n=10.

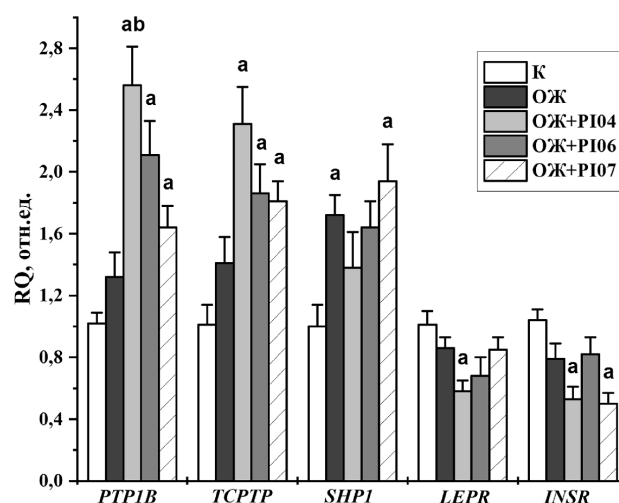
Важно, что для уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки сохранялись значимые различия с контролем (табл. 3). Лечение PI07, селективным в отношении TCPTP, снижало массу тела и жировой ткани, долю жировой ткани и уровни лептина, но не влияло на уровни глюкозы, инсулина и индекс ИР (табл. 3), а также не улучшало толерантность к глюкозе, оцениваемую в ГТТ (рис. 3, табл. 3).

Полученные данные указывают на то, что наиболее эффективным для восстановления метаболических и гормональных показателей является соединение PI04, которое ингибирует и RPT1B и TCPTP. Обе фосфатазы, являясь негативными регуляторами инсулинового и лептинового сигнала в ЦНС и на периферии, вовлечены в развитие инсулиновой и лептиновой резистентности; они отвечают за повышение аппетита и накопление избытка жировой ткани при метаболических расстройствах [1, 3, 7, 9, 10]. При этом более селективные ингибиторы оказались менее эффективными. Так PI06, имея сходное с соединением PI04 значение  $IC_{50}$  для RPT1B, намного слабее влиял на чувствительность к глюкозе и инсулину и в меньшей степени снижал общую массу тела. Причиной этого, как мы полагаем, является то, что при ингибировании фосфатазы RPT1B её функции, по крайней мере, частично могут выполнять другие тирозинфосфатазы, в первую очередь, TCPTP. И, напротив, в случае PI07 селективное ингибирование TCPTP может приводить к компенсаторной активации RPT1B. Это обусловлено наличием общих мишеней для RPT1B и TCPTP. Обе фосфатазы дефосфорилируют активированные гормонами фосфорформы рецепторов лептина и инсулина, а также ассоциированную с лептиновым рецептором JAK2-тирозинкиназу [3, 10]. Это подавляет лептиновые и инсулиновые сигнальные пути и снижает чувствительность тканей-мишеней к лептину и инсулину. Следует, однако, отметить, что имеются и существенные различия в мишенях фосфатаз RPT1B и TCPTP. Так, фосфатаза RPT1B дефосфорилирует IRS1/2-белки, сопрягающие инсулиновый рецептор с нижележащими SH2-доменсодержащими белками [3, 4], в то время как фосфатаза TCPTP дефосфорилирует транскрипционный фактор STAT3, активируемый через фосфорформу лептинового рецептора и контролирующий экспрессию STAT3-зависимых генов [10]. Тот факт, что PI07 значимо снижает уровни лептина, но слабо влияет на уровни инсулина, инсулиновую чувствительность и глюкозный гомеостаз, может быть обусловлен как раз тем, что фосфатаза TCPTP, которую он ингибирует, в большей степени вовлечена в регуляцию лептинового сигналинга [10].

Помимо наших данных, имеются работы, в которых обнаружен выраженный анорексигенный эффект низкоселективных ингибиторов RPT1B и TCPTP, но сам феномен остаётся малоизученным. Целастрол (Celastrol) — природный пентациклический тритерпен — при введении мышам снижал активность обеих фосфатаз в аркуатном ядре гипоталамуса, действуя по аллостерическому механизму, и в значительной степени снижал потребление ими пищи и массу тела. Анорексигенные эффекты

обусловлены в основном активацией лептинового сигналинга в гипоталамических нейронах [33]. Показано также, что как одновременный нокаут генов *RPT1B* и *TCPTP* в гипоталамусе мышей с ожирением, так и совместное введение ингибитора RPT1B и антагониста глюкокортикоидных гормонов RU486, ослабляющего экспрессию TCPTP, подавляют потребление пищи, нормализуют массу тела и жировой ткани, улучшают толерантность к глюкозе, инсулиновую и лептиновую чувствительность [1]. При этом ингибирование фосфатаз по отдельности было менее эффективным, как и в нашем случае.

Подавление активности RPT1B и TCPTP может запускать ряд компенсаторных механизмов, направленных на ослабление эффектов их ингибиторов. Среди них изменение экспрессии генов как фосфатаз, так и компонентов инсулинового и лептинового сигналинга. В печени нами была изучена экспрессия генов, которые кодируют фосфатазы RPT1B, TCPTP и родственную им фосфатазу SHP1, а также генов, кодирующих инсулиновый и лептиновый рецепторы. В группе “ОЖ” значимых изменений экспрессии генов фосфатаз RPT1B и TCPTP отмечено не было, в то время как экспрессия гена SHP1 умеренно повышалась (рис. 4). Повышение экспрессии гена фосфатазы SHP1 у крыс с ожирением и нарушенной толерантностью к глюкозе согласуется с её негативной ролью в регуляции пищевого поведения и глюкозного гомеостаза [34]. Так, установлено, что у мышей с индуцированным диетой ожирением экспрессия этой фосфатазы повышена [35], а ингибирование этого фермента (или нокаут кодирующего его гена) предотвращают развитие метаболических нарушений [34, 36]. Нами не было выявлено существенных изменений экспрессии генов, кодирующих инсулиновый и лептиновый рецепторы. В связи с этим необходимо отметить, что ряд авторов выявили в печени



**Рисунок 4.** Экспрессия генов, кодирующих тирозинфосфатазы RPT1B, TCPTP и SHP1 и рецепторы инсулина и лептина в печени крыс с ожирением и влияние на неё обработки ингибиторами фосфатаз PI04, PI06 и PI07. Различия с контролем (a) и группой “ОЖ” (b) статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n=5$  в каждой группе.

грызунов с индуцированным диетой ожирением как умеренное снижение экспрессии генов инсулинового и лептинового рецепторов, рассматривая это как одно из проявлений инсулиновой и лептиновой резистентности [37-39], так и некоторое повышение экспрессии лептинового рецептора как компенсаторную реакцию на ослабление лептинового сигналинга [40].

Введение животным PI04 приводило к значительному повышению в сравнении с контролем экспрессии генов *PTP1B* и *TCPTP*, а также к снижению экспрессии генов обоих рецепторов (рис. 4). При этом экспрессия гена *SHPI* в группе “ОЖ+PI04” не отличалась от таковой в контроле. Полученные данные свидетельствуют о существовании двух компенсаторных механизмов — первый, состоящий в повышении экспрессии *PTP1B* и *TCPTP*, направленный на ослабление ингибирующего влияния PI04 на активность этих фосфатаз, и второй, заключающийся в снижении экспрессии инсулинового и лептинового рецепторов, обеспечивает ослабление мощности входящего инсулинового и лептинового сигналов в условиях ослабления негативной их регуляции. В группах “ОЖ+PI06” и “ОЖ+PI07” также отмечали повышение экспрессии генов *PTP1B* и *TCPTP*, но оно было выражено слабее. При этом в группе “ОЖ+PI07” сохранялся повышенный уровень экспрессии гена *SHPI* (рис. 4). Экспрессия генов рецепторов менялась слабо, и только в группе “ОЖ+PI07” было выявлено значимое снижение экспрессии гена *LEPR* (рис. 4). Ослабление экспрессии гена лептинового рецептора, как и значимое снижение уровня лептина, может быть обусловлено избирательным усилением лептинового сигналинга в печени крыс с ожирением, получавших лечение PI07 — ингибитором *TCPTP*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные указывают на то, что соединение PI04, проявляющее свойства ингибитора сразу двух фосфатаз — *PTP1B* и *TCPTP* — с большей эффективностью, в сравнении с разработанными нами селективными ингибиторами *PTP1B* (PI06) и *TCPTP* (PI07), улучшает метаболические и гормональные показатели у крыс с индуцированным диетой ожирением. Это, как мы полагаем, обусловлено тем, что одновременное ингибирование фосфатаз *PTP1B* и *TCPTP* предотвращает компенсаторное перераспределение между ними функций негативных регуляторов инсулинового и лептинового сигналинга, наблюдаемое при селективном ингибировании одной из них. Впервые исследованное нами влияние смешанных *PTP1B/TCPTP*-ингибиторов на экспрессию генов фосфатаз в печени поддерживает эту точку зрения, поскольку только в случае PI04 мы отмечали существенное повышение экспрессии генов обеих фосфатаз. Всё вышесказанное указывает на целесообразность смены вектора разработки ингибиторов *PTP1B* в пользу создания более мягких и менее селективных аналогов. В этом отношении

необходимо отметить, что многие природные ингибиторы фосфатазы *PTP1B* характеризуются сравнительно низкими эффективностью и селективностью, что, возможно, имеет определённые преимущества в отношении более мягкой, “физиологичной” регуляции сигнальных путей, контролируемых инсулином, лептином и ростовыми факторами, действующими через рецепторы тирозинкиназного типа.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Определение концентрации гормонов иммуноферментным методом было выполнено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-0152-22-00.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу за животными и их использованию в исследовании осуществляли в строгом соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 3-4/2021, 27 апреля 2021 г.).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dodd G.T., Xirouchaki C.E., Eramo M., Mitchell C.A., Andrews Z.B., Henry B.A., Cowley M.A., Tiganis T. (2019) Intranasal targeting of hypothalamic *PTP1B* and *TCPTP* reinstates leptin and insulin sensitivity and promotes weight loss in obesity. *Cell Rep.*, **28**(11), 2905-2922.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.08.019
2. Köhn M. (2020) Turn and face the strange: A new view on phosphatases. *ACS Cent. Sci.*, **6**(4), 467-477. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00909
3. Liu R., Mathieu C., Berthelet J., Zhang W., Dupret J.M., Rodrigues Lima F. (2022) Human protein tyrosine phosphatase 1B (*PTP1B*): From structure to clinical inhibitor perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(13), 7027. DOI: 10.3390/ijms23137027
4. Yip S.C., Saha S., Chernoff J. (2010) *PTP1B*: A double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, **35**(8), 442-449. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.03.004
5. Sorokoumov V.N., Shpakov A.O. (2017) Protein phosphotyrosine phosphatase 1B: Structure, function, role in the development of metabolic disorders and their correction by the enzyme inhibitors. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **53**(4), 259-270. DOI: 10.1134/S0022093017040020
6. Villamar-Cruz O., Loza-Mejía M.A., Arias-Romero L.E., Camacho-Arroyo I. (2021) Recent advances in *PTP1B* signaling in metabolism and cancer. *Biosci. Rep.*, **41**(11), BSR20211994. DOI: 10.1042/BSR20211994



7. Krishnan N., Koveal D., Miller D.H., Xue B., Akshinthala S.D., Kragelj J., Jensen M.R., Gauss C.M., Page R., Blackledge M., Muthuswamy S.K., Peti W., Tonks N.K. (2014) Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nat. Chem. Biol.*, **10**(7), 558-566. DOI: 10.1038/nchembio.1528
8. Zhang Z.Y., Dodd G.T., Tiganis T. (2015) Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol. Sci.*, **36**(10), 661-674. DOI: 10.1016/j.tips.2015.07.003
9. Loh K., Fukushima A., Zhang X., Galic S., Briggs D., Enriori P.J., Simonds S., Wiede F., Reichenbach A. et al (2011) Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab.*, **14**(5), 684-699. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.09.011
10. Wang Y.N., Liu S., Jia T., Feng Y., Xu X., Zhang D. (2021) T cell protein tyrosine phosphatase in glucose metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 682947. DOI: 10.3389/fcell.2021.682947
11. Li X., Wang L., Shi D. (2016) The design strategy of selective PTP1B inhibitors over TCPTP. *Bioorg. Med. Chem.*, **24**(16), 3343-3352. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.035
12. Javier G.M. (2021) Computational insight into the selective allosteric inhibition for PTP1B versus TCPTP: A molecular modelling study. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**(15), 5399-5410. DOI: 10.1080/07391102.2020.1790421
13. Campos-Almazán M.I., Hernández-Campos A., Castillo R., Sierra-Campos E., Valdez-Solana M., Avitia-Domínguez C., Téllez-Valencia A. (2022) Computational methods in cooperation with experimental approaches to design protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors in type 2 diabetes drug design: A review of the achievements of this century. *Pharmaceuticals (Basel)*, **15**(7), 866. DOI: 10.3390/ph15070866
14. Singh S., Singh Grewal A., Grover R., Sharma N., Chopra B., Kumar Dhingra A., Arora S., Redhu S., Lather V. (2022) Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg. Chem.*, **121**, 105626. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105626
15. Zhi Y., Gao L.X., Jin Y., Tang C.L., Li J.Y., Li J., Long Y.Q. (2014) 4-Quinolone-3-carboxylic acids as cell-permeable inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**(14), 3670-3683. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.028
16. Bakke J., Haj F.G. (2015) Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **37**, 58-65. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.09.020
17. Zakharova I.O., Sorokoumov V.N., Bayunova L.V., Derkach K.V., Shpakov A.O. (2018) 4-Oxo-1,4-dihydrocinnoline derivative with phosphatase 1B inhibitor activity enhances leptin signal transduction in hypothalamic neurons. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **54**(4), 273-280. DOI: 10.1134/S0022093018040
18. Welte S., Baringhaus K.H., Schmider W., Müller G., Petry S., Tennagels N. (2005) 6,8-Difluoro-4-methylumbiliferyl phosphate: A fluorogenic substrate for protein tyrosine phosphatases. *Anal. Biochem.*, **338**(1), 32-38. DOI: 10.1016/j.ab.2004.11.047
19. 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. DOI: 10.1155/2015/245459
20. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms this effect. *PLOS One*, **14**(3), e0213779. DOI: 10.1371/journal.pone.0213779
21. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Sorokoumov V.N., Stepochkina A.M., Romanova I.V., Morina I.Yu., Zakharova I.O., Bayunova L.V., Shpakov A.O. (2021) The effects of separate and combined treatment of male rats with type 2 diabetes with metformin and orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor on steroidogenesis and spermatogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(1), 198. DOI: 10.3390/ijms23010198
22. Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, **3**(6), 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73
23. Yang Y., Tian J.Y., Ye F., Xiao Z. (2020) Identification of natural products as selective PTP1B inhibitors via virtual screening. *Bioorg. Chem.*, **98**, 103706. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103706
24. de-la-Cruz-Martínez L., Duran-Becerra C., González-Andrade M., Páez-Franco J.C. et al (2021) Indole- and pyrazole-glycyrhethinic acid derivatives as PTP1B inhibitors: Synthesis, *in vitro* and *in silico* studies. *Molecules*, **26**(14), 4375. DOI: 10.3390/molecules26144375
25. Martínez-Aldino I.Y., Villaseca-Murillo M., Morales-Jiménez J., Rivera-Chávez J. (2021) Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium sp.* IQ-429. *Bioorg. Chem.*, **115**, 105166. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105166
26. Wu J.M., Zhou Q.Q., Xie X.Y., Xu J.B. (2021) Khayalactone- and phragmalin-type limonoids with PTP1B inhibitory activity from *Trichilia sinensis* Benth. *Fitoterapia*, **154**, 105025. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.105025
27. Yamazaki H., Tsuge H., Takahashi O., Uchida R. (2021) Germacrene sesquiterpenes from leaves of *Eupatorium chinense* inhibit protein tyrosine phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **53**, 128422. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128422
28. Li X., Niu M., Wang A., Lu L., Englert U., Feng S., Zhang L., Yuan C. (2021) Synthesis, structure and *in vitro* biological properties of a new copper(II) complex with 4-[[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-1-yl]methyl]benzoic acid. *Acta Crystallographica. Section C, Structural Chemistry*, **77**(Pt 10), 641-648. DOI: 10.1107/S2053229621009748
29. Ma Y., Ding T.T., Liu Y.Y., Zheng Z.H., Sun S.X., Zhang L.S., Zhang H., Lu X.H., Cheng X.C., Wang R.L. (2021) Design, synthesis, biological evaluation and molecular dynamics simulation studies of imidazolidine-2,4-dione derivatives as novel PTP1B inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **579**, 40-46. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.047
30. Ji Y., Zhou Q., Liu G., Zhu T., Wang Y., Fu Y., Li Y., Li R., Zhang X., Dong M., Sauriol F., Gu Y., Shi Q., Lu X., Ni Z. (2021) New protein tyrosine phosphatase inhibitors from fungus *Aspergillus gorakhpurensis* F07ZB1707. *RSC Adv.*, **11**(17), 10144-10153. DOI: 10.1039/d1ra00788b
31. Nian Q., Berthelet J., Zhang W., Bui L.C., Liu R., Xu X., Duval R., Ganesan S., Leger T., Chomienne C., Busi F., Guidez F., Dupret J.M., Rodrigues Lima F. (2019) T-cell protein tyrosine phosphatase is irreversibly inhibited by etoposide-quinone, a reactive metabolite of the chemotherapy drug etoposide. *Mol. Pharmacol.*, **96**(2), 297-306. DOI: 10.1124/mol.119.116319
32. Sharma B., Xie L., Yang F., Wang W., Zhou Q., Xiang M., Zhou S., Lv W., Jia Y., Pokhrel L., Shen J., Xiao Q., Gao L., Deng W. (2020) Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *Eur. J. Med. Chem.*, **199**, 17376. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.17376

33. Kyriakou E., Schmidt S., Dodd G.T., Pfuhlmann K., Simonds S.E., Lenhart D., Geerlof A., Schriever S.C., de Angelis M., Schramm K.W., Plettenburg O., Cowley M.A., Tiganis T., Tschöp M.H., Pfluger P.T., Sattler M., Messias A.C. (2018) Celastrol promotes weight loss in diet-induced obesity by inhibiting the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP in the hypothalamus. *J. Med. Chem.*, **61**(24), 11144-11157. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01224
34. Sharma Y., Ahmad A., Yavvari P.S., Kumar Muwal S., Bajaj A., Khan F. (2019) Targeted SHP-1 silencing modulates the macrophage phenotype, leading to metabolic improvement in dietary obese mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **16**, 626-636. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.04.020.
35. Xu E., Charbonneau A., Rolland Y., Bellmann K., Pao L., Siminovich K.A., Neel B.G., Beauchemin N., Marette A. (2012) Hepatocyte-specific Ptpn6 deletion protects from obesity-linked hepatic insulin resistance. *Diabetes*, **61**(8), 1949-1958. DOI: 10.2337/db11-1502
36. Krüger J., Wellenhofer E., Meyborg H., Stawowy P., Östman A., Kintscher U., Kappert K. (2016) Inhibition of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 increases insulin sensitivity in high-fat diet-induced insulin-resistant mice. *FEBS Open Bio.*, **6**(3), 179-189. DOI: 10.1002/2211-5463.12000
37. Meier D.A., Hennes M.M., McCune S.A., Kissebah A.H. (1995) Effects of obesity and gender on insulin receptor expression in liver of SHHF/Mcc-FaSp rats. *Obes. Res.*, **3**(5), 465-470. DOI: 10.1002/j.1550-8528.1995.tb00176.x
38. Liu Z.J., Bian J., Liu J., Endoh A. (2007) Obesity reduced the gene expressions of leptin receptors in hypothalamus and liver. *Horm. Metab. Res.*, **39**(7), 489-494. DOI: 10.1055/s-2007-981680
39. Munkong N., Thim-Uam A., Pengnet S., Hansakul P., Somporn N., Naowaboot J., Tocharus J., Tocharus C. (2022) Effects of red rice bran extract on high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Prev. Nutr. Food. Sci.*, **27**(2), 180-187. DOI: 10.3746/pnf.2022.27.2.180
40. Wrann C.D., Ehmer U., Lautenbach A., Kuhlmann S., Nave H. (2010) Obesity and NK cells affect the expression of the long form of the leptin receptor Ob-Rb in liver of F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **62**(1), 1-8. DOI: 10.1016/j.etp.2008.12.006

Поступила в редакцию: 15. 09. 2022.  
После доработки: 08. 11. 2022.  
Принята к печати: 10. 11. 2022.

## CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW 4-OXO-1,4-DIHYDROCINNOLINE-BASED INHIBITORS OF THE TYROSINE PHOSPHATASE PTP1B AND TCPTP

**K.V. Derkach<sup>1\*</sup>, I.O. Zakharova<sup>1</sup>, A.A. Bakhtyukov<sup>1</sup>, V.N. Sorokoumov<sup>2</sup>, V.S. Kuznetsova<sup>1</sup>, A.O. Shpakov<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
44 Thorez ave., St. Petersburg, 194223 Russia; \*e-mail: derkach\_k@list.ru

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, 26 Universitetsky ave., Peterhof, St. Petersburg, 198504 Russia

<sup>3</sup>Medical Faculty, St. Petersburg State University, 8A 21<sup>st</sup> Line, St. Petersburg, 199106 Russia

Functional disorders in obesity are largely due to a decrease in tissue sensitivity to insulin and leptin. One of the ways to restore it is inhibition of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and T-cell protein phosphotyrosine phosphatase (TCPTP), negative regulators of the insulin and leptin signaling. Despite progress in the development of inhibitors of these phosphatases, commercial preparations based on them have not been developed yet, and the mechanisms of action are poorly understood. The aim of the work was to study the effect of new derivatives of 4-oxo-1,4-dihydrocinnoline (PI04, PI06, PI07) on the activity of PTP1B and TCPTP, as well as to study the effect of their five-day administration (i.p., 10 mg/kg/day) to Wistar rats with diet-induced obesity on body weight and fat, metabolic and hormonal parameters, and gene expression of phosphatase and insulin and leptin receptors in the liver. It has been shown that PI04 is a mild, low selective inhibitor of both phosphatases (PTP1B, IC<sub>50</sub>=3.42(2.60–4.51) μM; TCPTP, IC<sub>50</sub>=4.16(3.49–4.95) μM), while PI06 and PI07 preferentially inhibit PTP1B (IC<sub>50</sub>=3.55 (2.63–4.78) μM) and TCPTP (IC<sub>50</sub>=1.45(1.18–1.78) μM), respectively. PI04 significantly reduced food intake, body weight and fat, attenuated hyperglycemia, normalized glucose tolerance, basal and glucose-stimulated levels of insulin and leptin, and insulin resistance index. Despite the anorexigenic effect, PI06 and PI07 were less effective, having little effect on glucose homeostasis and insulin sensitivity. PI04 significantly increased the expression of the *PTP1B* and *TCPTP* genes and decreased the expression of the insulin and leptin receptor genes. PI06 and PI07 had little effect on these indicators. Thus, PI04, the inhibitor of PTP1B and TCPTP phosphatases, restored metabolic and hormonal parameters in obese rats with greater efficiency than inhibitors of PTP1B (PI06) and TCPTP (PI07). This indicates the prospect of creating mixed PTP1B/TCPTP inhibitors for correction of metabolic disorders.

**Key words:** protein phosphotyrosine phosphatase 1B; T-cell protein phosphotyrosine phosphatase; inhibitor; obesity; appetite; insulin; leptin; liver

**Funding.** The work is supported by the IEPHB Research Program No. 075-0152-22-00.

Received: 15.09.2022; revised: 08.11.2022; accepted: 10.11.2022.