

ОГЛЯДИ

УДК 577.152.34: 577.151.042

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ИНГИБИТОРОВ ПРОПРОТЕИНКОНВЕРТАЗ

© В. К. КИБИРЕВ, Т. В. ОСАДЧУК

*Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua*

Обзор посвящен рассмотрению свойств пропротеинконвертаз (ПК) – внутриклеточных кальцийзависимых сериновых эндопротеиназ животных, которые играют первостепенную роль в процессинге неактивных предшественников протеинов и превращении их в биологически активные продукты. ПК вовлекаются также в развитие широкого круга заболеваний, включающих бактериальные и вирусные инфекции, рак, болезнь Альцгеймера, ожирение и т.д. Поэтому указанные энзимы рассматриваются как весьма перспективные мишени для создания современных терапевтических препаратов.

Для ПК идентифицировано всего несколько эндогенных макромолекулярных ингибиторов: pro7B2 (Proprotein 7B2) – специфический шаперон для PC2, граниноподобный предшественник нейроэндокринного протеина proSAAS – селективный лиганд для PC1 и серпин Spn4A (Serine Protease Inhibitor 4A) из *Drosophila melanogaster*, который ингибирует фурин и PC2. Методом направленного мутагенеза были созданы биоинженерные ингибиторы ПК.

В качестве ингибиторов пропротеинконвертаз рассмотрены некоторые фрагменты протеинов и пептидов, в частности полиаргинины и небольшие пептиды, содержащие псевдопептидную связь на участке расщепления пептидного субстрата.

Обсуждаются ингибиторные свойства многочисленных соединений непептидной природы: производные андрографолида, выделенного из растения *Andrographis paniculata* (для фурина $K_i = 2,6\text{--}200$ мкМ); некоторых аналогов пиридина, способных давать комплексы с ионами меди или цинка, ингибирующие фурин с $IC_{50} = 5\text{--}10$ мкМ; производных 2,5-дидезоксистерптамина, содержащих в структуре гуанидиновые группы (для фурина $K_i = 6\text{--}812$ нМ), а также ряда дикумаролов ($K_i = 1\text{--}185$ мкМ для фурина) и флавоноидов, которые ингибируют фурин с $K_i = 5\text{--}230$ мкМ. Рассмотрен ингибиторный эффект так называемых енединиил-аминокислот и пептидов на их основе (около 40 нМ для фурина), ингибирование PC2 N-ацилированными бициклическими гуанидинами ($K_i = 3,3\text{--}10$ мкМ) и производными пирролидин-дипиперазина ($K_i = 0,54\text{--}10$ мкМ), а также ингибиторную активность ряда гетероциклических соединений.

Показано, что некоторые из синтезированных производных могут служить в качестве соединений-лидеров для дизайна специфических ингибиторов отдельных ПК.

Ключевые слова: пропротеинконвертазы, ингибиторы протеаз, протеиновые и биоинженерные ингибиторы, ингибиторы пептидной и псевдопептидной природы, непептидные ингибиторы.

Пропротеинконвертазы (ПК) относятся к чрезвычайно специфичным внутриклеточным сериновым кальцийзависимым мультидоменным эндопротеиназам млекопитающих, которые структурно родственны бактериальному субтилизину и кексину дрожжей [1]. Поэтому их иногда называют пропротеинконвертазами субтилизинового/кексинового типа. ПК играют важную роль в процессинге многих белков [1–3].

Как известно, биосинтез биологически активных полипептидов протекает таким образом, что сначала в клетке синтезируются крупные неактивные предшественники белков (так называемые пропротеины), которые благодаря последующему ограниченному расщеплению пептидных связей превращаются затем в функционально активные продукты [4]. Настойчивые поиски энзимов, осуществляющих эти превращения, в 1990 г. увенчались откры-

тием протеиназ, ответственных за процессинг и «созревание» неактивных предшественников и превращения их в активные полипептиды. К настоящему времени идентифицировано девять представителей ПК [1–3], включающих семь протеиназ, которые специфичны к основным аминокислотам [5], и две субтилазы, специфичные к неполярным остаткам аминокислот [6]. Наиболее изученной пропротеинконвертазой животных является фурин (3.4.21.75), именуемый также SPC1 (Subtilisin-like Proprotein Convertase 1), или PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme). Рассмотрению его структуры и свойств посвящено несколько обзоров [2, 3, 7–10].

ПК участвуют в процессинге неактивных пропротеинов, к числу которых относятся предшественники различных гормонов, факторов роста и дифференцировки, рецепторов поверхности клеток, молекул клеточной адгезии, экстрацеллюлярных металлопротеиназ, протеинов плазмы крови, ионных каналов, энзимов системы свертывания крови и др. [10]. Поэтому ПК играют первостепенную роль в эмбриогенезе, гомеостазе и других важных биологических процессах. Наряду с этим пропротеинконвертазы способны активировать жизненно важные протеины многих патогенов [1–3, 7]. Так, для развития бактериальной инфекции необходимо, чтобы в инфицированных клетках хозяина фурин или другие ПК осуществили расщепление соответствующих бактериальных токсинов, например, сибирской язвы и дифтерии, токсинов представителей родов *Shiga* и *Bordetella*, экзотоксина А рода *Pseudomonas* [2, 7]. Для распространения некоторых вирусных заболеваний требуется расщепление гликопротеинов таких вирусных патогенов, как ВИЧ-1, птичий грипп H5N1, геморрагическая лихорадка Эбола, корь, цитомегаловирусные заболевания и флавивирусные инфекции [3, 7]. Фурин и другие ПК вносят свой вклад также в течение таких заболеваний, как атеросклероз [11], рак и метастазирование [12, 13], нейродегенеративные заболевания, например, болезнь Альцгеймера [14], нарушение метаболизма, в частности, ожирение [15] или диабет [16], а также, гиперхолестеролемию, обуславливающая высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний [17].

В связи со сказанным выше, ПК рассматривают как чрезвычайно перспективные мишени для создания новейших терапевтических и лечебных препаратов [1, 2, 7, 18–21]. Развитие упомянутых заболеваний теоретически возможно предотвратить за счет уменьшения

активности ПК, что может быть достигнуто блокированием энзиматической активности ПК при помощи соответствующих ингибиторов [3, 7, 18–21].

Для предотвращения побочных эффектов используемых ингибиторов необходимо, чтобы они были высокоспецифичными по отношению к конкретной пропротеинконвертазе. При разработке современных ингибиторов ПК именно создание специфических ингибиторов является самой важной проблемой [18, 19].

Целью обзора является изложение новых сведений о различных классах низкомолекулярных ингибиторов пропротеинконвертаз, о принципах их создания, о строении, эффективности и селективности действия этих соединений. Обсуждению свойств ингибиторов предшествует раздел, в котором приведены основные данные о пропротеинконвертазах и их свойствах.

Пропропротеинконвертазы и их свойства

Существует семь ПК животных: фурин, именуемый также SPC1 (Subtilisin-like Proprotein Convertase 1), или PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme); протеиназа PC1 (Proprotein Convertase 1), называемая также PC3 или SPC3; PC2 (SPC2); PC4 (SPC5); PACE4 (SPC4); PC6/SPC6 (обозначаемая PC5) и, наконец, LPC (Lymphoma Proprotein Convertase), известная также как PC7, либо SPC7. Специфичность их по отношению к субстратам и ингибиторам определяется, как и для других протеиназ, особенностью строения связывающего центра каждой ПК. Соответствующие центры этих ПК эволюционно консервативны и высоко гомологичны, что создает проблемы при разработке специфических ингибиторов ПК. В большинстве случаев участок, который узнают ПК и затем осуществляют процессинг своих природных субстратов, характеризуется наличием одной или двух расположенных рядом основных аминокислот в пределах следующего мотива, содержащего кластер основных аминокислот: Arg/Lys/His-(X) n -X/Lys/Arg-Arg-↓, где $n = 1, 3$ и X – любая аминокислота, кроме Cys [19, 20]. Сопоставление первичных структур ПК с последовательностью аминокислот фурина [5, 18, 22] показало, что по сравнению с фурином у других ПК часто наблюдаются замены остатков Glu 230 и Glu 257, которые взаимодействуют с подцентрами P₅–P₆ субстратов. Это обуславливает снижение плотности отрицательного заряда связывающих центров шести ПК по сравнению с фурином. У двух ПК (PC1/3 и PC2), у которых

Glu 230 и Glu 257 заменяются на нейтральные остатки аминокислот, отмечается сниженная чувствительность к положительному заряду в подцентрах P₅ и P₆ лигандов, тогда как субстратная специфичность трех ПК (фурина, PACE4 и PC5) должна быть весьма близкой, поскольку у PACE4 и PC5 происходят замены остатков глутаминовой кислоты в положениях 230 и 257 на Asp, что практически не влияет на плотность отрицательного заряда. Для повышения специфичности создаваемых ингибиторов к различным ПК авторы предлагают вместо коротких пептидов типа RVKR использовать при синтезе новых ингибиторов более длинный мотив [K/R]-X-V-X-K-R, учитывающий взаимодействия с ферментами подцентров P₅ и P₆ ингибиторов [18, 22].

Говоря о специфичности действия ПК, следует также учитывать то, что эффективность протеолиза природных субстратов различными ПК зависит от уровня их экспрессии в различных тканях, от внутриклеточной локализации ПК и от pH среды различных компартментов, в которых локализованы конкретные ПК. Сведения, касающиеся ПК, представлены в табл. 1. Для ее создания помимо ссылок, указанных в таблице, использованы также данные нескольких обзоров [1, 2, 7–9, 12, 18, 23].

ПК обладают сходной доменной структурой [1–3, 5, 7, 18]. В качестве примера на рис. 1 представлена доменная организация фурина [7]. После отщепления сигнального пептида в структуре зимогенов всех ПК обнаруживаются следующие участки. Во-первых, пропептид, состоящий из 81–104 аминокислотных остатков, который содержит на С-конце последовательность, отвечающую сайту автокаталитического расщепления. Просегмент непосредственно примыкает к каталитическому домену, ингибируя его активность. За каталитическим доменом располагается средний домен, который включает около 150 аминокислот, именуемый гомо В- или Р-доменом и, наконец, С-концевой домен. Каталитические домены ПК обнаруживают наибольшую консервативность своих первичных структур. Это обеспечивает 35% гомологии данного участка у всех семи членов ПК, тогда как Р-домен проявляет всего 15% идентичности, а пропептиды и С-концевые домены характеризуются слабой гомологией.

Пропептиды действуют в качестве внутримолекулярных шаперонов, помогая правильному фолдингу молекулы протеина. За исключением PC2 отщепление пропептида от

неактивного предшественника происходит у ПК в эндоплазматическом ретикулуме автокаталитически и является необходимым условием для транспорта ПК за пределы этого компартмента. После гидролиза пептидной связи, соединяющей пропептид с остальной молекулой, пропептид остается все еще в ассоциированном состоянии с ферментом до тех пор, пока внутри пропептида не произойдет еще одно расщепление пептидной связи в TGN (*trans-Golgi network*)/эндосомальной системе.

Конвертазы PC5/6 и PACE4 активируются на поверхности клетки, где они связываются с гепарансульфатом протеогликанов [23], а PC1/3 и PC2 – в плотной коре секреторных гранул.

Опыты по делеции или замене аминокислот показали, что Р-домен стабилизирует каталитический домен, влияет на специфичность ПК и зависимость их активности от pH и концентрации Ca²⁺.

Показано, что С-концевые домены важны для внутриклеточного перемещения, сортировки и прикрепления к мембране.

Поскольку ПК относятся к семейству сериновых протеиназ, то в их активных центрах находится триада аминокислот Ser, His и Asp, а также остаток Asn, участвующий в связывании субстрата во впадине для оксианиона [3, 5]. В каталитическом домене располагаются также два участка связывания ионов кальция. Главной особенностью структуры связывающих центров всех пропротеинконвертаз по сравнению с бактериальным субтилизином является повышенное содержание остатков аминокислот с отрицательно заряженными боковыми цепями (Glu или Asp). Это обстоятельство объясняет то, что ПК специфичны к полипептидам, содержащим в сайте расщепления основные аминокислоты: Arg и Lys [5, 10].

Ингибиторы пропротеинконвертаз

Сведения об ингибиторах ПК суммированы в таблицах 2–4. По химической природе они являются протеинами, пептидами, псевдопептидами или соединениями непептидной природы [18–21], а по характеру ингибирования – обратимыми или необратимыми ингибиторами. Учитывая механизм снижения скорости ферментативной реакции, рассматриваемые соединения были отнесены к конкурентным или неконкурентным ингибиторам, к суицидным инактиваторам и к классу медленно взаимодействующих, но прочно связывающихся ингибиторов [19].

Таблиця 1. Пропрометионконвертази и их свойства

Название ПК (другое наименование энзима)	Ткани, в которых обнаружена ПК	Внутриклеточная локализация	Функции ПК (последствия выключения гена ПК)	Мотив узнавания аминокислотной последовательности у субстратов	Литература
Фуриин (PASE, Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme или SPC1, Subtilisin-like Proprotein Convertase 1) КФ 3.4.21.75	Повсеместно, но в разных тканях уровень экспрессии различный	TGN (<i>trans</i> -Golgi network), эндосомальная система, поверхность клеток; циркулирует между TGN и поверхностью клетки за счет эндосом.	Процессинг пропротеинов конституционного пути во всех клетках. (Нокаутные мыши умирают на ранних стадиях эмбриогенеза, обнаруживая множественные дефекты развития)	R- X- R/K- R↓, Наличие аргинина в P6, P4 и P2 усиливает эффективность действия фурина; минимальная последовательность, узнаваемая фурином: R-X-X-R	[7, 10]
PC2, Proproteин Convertase 2 (SPC2, Subtilisin-like Proproteин Convertase 2) КФ 3.4.21.94	В эндокринных и нейроэндокринных тканях	TGN, секреторные гранулы	Активация прогормонов и пронейропептидов регулируемого пути. Необходимо присутствие карбоксипептидаз E и/или D; Транспорт, фолдинг и активация PC2 регулируется протеином 7B2. (Нокаутные мыши жизнеспособны, но обнаружено замедление их роста и другие аномалии)	R- X- R- R↓ Узнает сайт с локализацией не только пары (R-R, K-R), но и одного остатка основной аминокислоты. Расщепляет последовательность K-↓P в продинорфине	[24,25]
PC1/3 (SPC3) КФ 3.4.21.93	В эндокринных и нейроэндокринных тканях	TGN, секреторные гранулы	Активация прогормонов и пронейропептидов с образованием более крупных биоактивных пептидов. Активность PC1/3 регулируется pro-SAAS (Около 40% PC1 ноль мышей умирает до рождения и еще 40% – после рождения)	R- X- R- R↓	[24, 25]
PASE4 (SPC4) КФ 3.4.21.B25*	Подобно фурину экспрессируется повсеместно	Возможно в TGN	Роль не вполне ясна. Функции сходны с фурином (Четвертая часть нокаутных мышей умирает в эмбриональном состоянии)	R-X-R/K-R	[26, 27]

Таблица 1. Продолжение

PC4 (SPC5) КФ 3.4.21.B24*	Экспрессируется лишь в тестикул- лярных клетках зародыша	Не определено	Активирует пробелки в ре- продуктивном секреторном пути; играет ключевую роль в процессах оплодотворения, созревания сперматозоидов и их слиянии с яйцеклеткой. (У нокаутных мышей снижена фертильность)	R/K/H-X-X/R/KR↓, наи- более предпочтителен мотив KXKR	[28]
PC5/6 (SPC6-A, SPC6-B) КФ 3.4.21. B26* Существует две изоформы: А – рас- творимая и В – свя- занная с мембраной	PC5/6В домини- рует в тканях ки- шечника и почек; PC5/6А – в других тканях	TGN, секреторные гранулы	Форма PC5/6-А функцио- нально сходна с PC2 и PC1/3; (Нокаутные по PC6В мыши умирают на ранних стадиях эмбриогенеза)	Аналогична фуруину. Рас- щепляет фактор роста и дифференцировки II (Gdf II) на участке RSRR↓ N	[29–31]
LPC, Lymphoma Protein Convertase, PC7 или PC8 (SPC7) КФ 3.4.21.B27*	Повсеместно, но более высокий уровень экспрес- сии в лимфоидных тканях	TGN, эндосомальная система, поверхность клеток	Роль не ясна. От других ПК отличается процессом акти- вации зимогена, а также ло- кализацией и циркуляцией в клетке. (У нокаутных мышей не наблюдается видимых из- менений)	Arg-Xaa-(Lys/Arg)-Arg	[2, 32]
SKI-1, Subtilisin / Kexin-Isozyme-1 или SIP-1, Site-1 Protease КФ 3.4.21.112	Во многих тканях	В аппарате Гольджи и других органеллах	(Нокаутные мыши умирают в эмбриональном состоянии)	Расщепляет предшествен- ник нейротропного фак- тора мозга BDNF (Brain- Derived Neurotrophic Factor) на участке RGLT↓ SL	[33]
PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin- like/Kexin type 9) КФ 3.4.21. ?	Экспрессируется главным образом в печени, кишечни- ке и почках	В эндоплазматиче- ском ретикулуме превращается в гете- родимер просегмент- PCSK9	Влияет на уровень липопро- теинов низкой плотности в плазме. Для активности ионы кальция не требуются (Для PCSK9 ноль мышей характе- рен рост поглощения холесте- рина печенью)	Автокаталитическое рас- щепление в последова- тельности: VFAQ ₁₅₂ ↓ SIP	[7, 34]

*Представлен номер согласно предварительным данным информационной системы по ферментам BRENDA

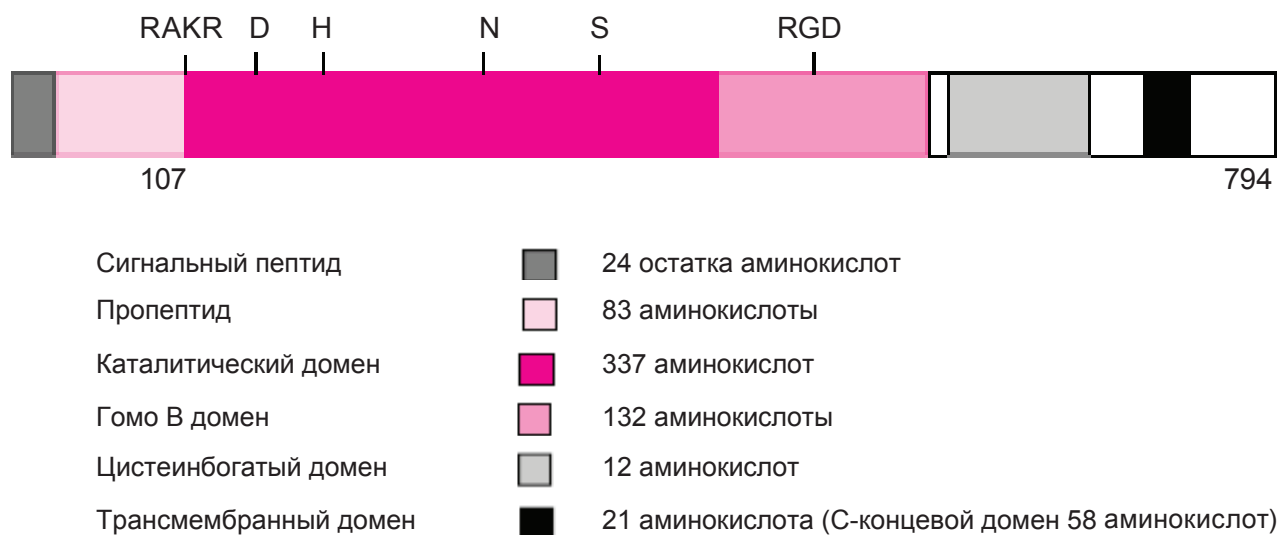


Рис. 1. Мультидоменная структура фурина человека [7]

Протеиновые ингибиторы ПК

Эндогенные ингибиторы. Регуляция активности протеиназ является существенным моментом для контроля функций клетки. Активность пропротеинконвертаз может изменяться, в частности, под влиянием различных факторов, например, из-за варьирования ионного окружения, либо в результате посттрансляционного процессинга ПК, или при взаимодействии с белковыми ингибиторами, структура которых является хорошим стартовым материалом для создания фармакологически важных соединений. Для ПК идентифицировано всего несколько таких ингибиторов: pro7B2 (**Pro**protein 7B2) [см. обзоры 35, 36, табл. 2], граниноподобный предшественник нейроэндокринного протеина proSAAS [35, 37, 38], серпин Spn4A (**Serine Protease Inhibitor**) [39, 41] и CRES (**Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic protein**) [40].

Pro7B2 – секреторный протеин с молекулярной массой 27 кДа – является специфическим шапероном ПК PC2, который предохраняет proPC2 от предварительной активации, стабилизирует зимоген в конформации, необходимой для транспорта и защищает PC2 от тепловой и рН-индуцированной денатурации [36]. Обнаружено, что 7B2 является прочно связывающимся ингибитором PC2 ($K_i = 6,7$ нМ) [43], а его С-концевой домен, содержащий 31 аминокислотный остаток, также является мощным ингибитором PC2. Этот фрагмент связывается с PC2 на наномольном уровне, но не инактивирует такие ПК, как PC1/PC3 и PC7, хотя слабо ингибирует PC6 с $K_i \sim 1$ мкМ [36].

Следующий ингибитор – это нейроэндокринный протеин proSAAS, который является селективным лигандом PC1 [37], ингибируя ее на наномольном уровне. Он, однако, лишь слабо инактивирует PC2. Оказалось, что фрагменты С-концевого участка proSAAS способны снижать активность PC1 ($K_i = 1,5\text{--}7,4$ нМ), фурина и PC2 ($K_i \sim 1,0\text{--}10,0$ мкМ) [38].

G. A. Cornwall с соавторами показал [39], что родственный цистатину сперматогенный протеин придатков яичек (обозначаемый как CRES, **Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic protein**) конкурентно ингибирует активность PC2 с K_i 25 нМ. Являясь специфическим ингибитором PC2, CRES не ингибирует PC1, фурин, а также субтилизин.

В 2004 г. было найдено [40, 41], что серпин Spn4A (**Serine Protease Inhibitor**) – продукт гена *Spn4* плодовой мушки *Drosophila melanogaster* – является мощным ингибитором фурина человека (K_i 13 пкМ) и PC2 дрозофилы (K_i 3,5 нМ) [41]. В реакционной петле Spn4A содержит последовательность аминокислот, отвечающую мотиву сайта расщепления фурином различных предшественников протеинов: $-\text{Arg}^{\text{P}4}\text{-Arg-Lys-Arg}^{\text{P}1}\text{-I}$. С указанными ПК Spn4A дает стехиометрический комплекс 1 : 1 и ингибирует энзимы в соответствии с кинетикой медленного, но прочного связывания. На сегодняшний день Spn4A является самым мощным из известных природных ингибиторов ПК.

Показано, что интер-альфа-ингибиторный протеин (I α Ip), функционирующий в плазме крови как эндогенный ингибитор сериновых протеиназ, способен снижать активность фурина *in vitro* и оказывать значительный

Таблица 2. Ингибиторы пропротеинконвертаз протеиновой и пептидной природы*

Название и природа ингибитора	Эффективность действия ингибитора	Литература
Макромолекулярные (протеиновые) ингибиторы <i>Эндогенные ингибиторы</i>		
Протеин Pro7B2 (Pro protein 7B2) секреторных гранул нейроэндокринных клеток	$K_i = 6,7$ нМ (PC2); не ингибирует PC1	[35, 36, 43]
Подобный гранину предшественник нейроэндокринного протеина, обозначаемый ProSAAS	$IC_{50} = 590$ нМ (<i>m</i> PC1); не ингибирует PC2	[37, 38]
Родственный цистатину сперматогенный протеин придатков яичек, CRES (C ystatin- R elated E pididymal S permatogenic protein)	$K_i = 25$ нМ (PC2); не ингибирует PC1 и фурин	[39]
Серпин Spn4A (S erine p rotease inhibitor 4) плодовой мушки <i>Drosophila melanogaster</i>	$K_i = 13$ пкМ (<i>h</i> Фурин) и 3,5 нМ (PC2)	[40, 41]
Интер-альфа ингибиторный протеин (I α I p)	30 мкг/мл ингибитора блокирует активность фурина <i>in vitro</i> на ~ 90% за 10 мин	[44]
Протеиназный ингибитор 8 (PI8)	$K_i = 53,8$ пкМ (<i>h</i> Фурин)	[45]
<i>Биоинженерные продукты**</i>		
Двойной мутант α_1 AT, содержащий последовательность аминокислот RIPR ³⁵⁸ (α_1 -PDX)	$K_i = 1,4$ нМ (<i>h</i> Фурин); ингибирует PC6B и PC3; не инактивирует PACE4 и PC7	[46–48]
α_2 -Макроглобулин, содержащий на участке P ₄ -P' ₂ реакционной петли мотив R ⁶⁸³ SKR ⁶⁸⁶ SL	Ингибирует процессинг профактора фон Виллебранда, TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1), растворимой формы gp 160 ВИЧ	[51]
Мутант третьего домена овомукоида индюка с последовательностью RCKR ¹⁸	$K_{ass} = 1,1 \cdot 10^7$ М (<i>h</i> Фурин)	[50]
Тройной мутант эглина С, содержащий последовательность RVKR ⁴ LD R ⁴² R ⁴⁵ D ⁴⁹ -эглин С	$K_i = 1,6$ нМ (<i>h</i> Фурин) $K_i = 330$ пкМ (<i>h</i> Фурин)	[52–54]
<i>Различные протеины</i>		
Ингибитор активатора плазминогена (PAI-1)	$IC_{50} = 480$ нМ	[42]
<i>Фрагменты протеинов и пептидов</i>		
31-членный С-концевой фрагмент pro7B2	K_i в пределах наномолей (PC2); $K_i = 1$ мкМ (PC6); не ингибирует PC1/PC3 и PC7	[36]
Фрагменты С-концевого участка proSAAS	$K_i = 1,5$ –7,4 нМ (<i>m</i> PC1); $K_i \sim 1$ –10 мкМ (<i>m</i> PC2, <i>m</i> Фурин);	[38]
Полипептиды – производные продоменов ПК	K_i в пределах наномолей	[56–58]

Таблица 2. Продолжение

36-членный фрагмент С-концевой части гистона H1.2; Его 14-членный фрагмент; 9-членный фрагмент Циклические пептиды, содержащие 10, 12 или 14 аминокислот	K_i 510 нМ (<i>m</i> Фурин) $K_i = 17$ нМ (<i>m</i> Фурин) $K_i = 27$ нМ (<i>m</i> Фурин) Нестабильны и менее активны, чем нонапептид	[61]
Циклические пептиды и псевдопептиды – фрагменты протеиназного ингибитора-2 (BSPI-2, Barley Serine Proteinase Inhibitor 2)	$K_i \sim 0,8-66$ мкМ (<i>h</i> Фурин); $K_i \sim 0,5$ мкМ (PC1/3)	[60]
Гистатин-3, его N-концевой фрагмент и ряд мутантов	$K_i = 2$ мкМ (<i>h</i> Фурин и <i>r</i> PC7)	[59]
30-членные пептиды – производные последовательности аминокислот 367–394 α_1 -PDX: Ациклинеский пептид Циклический пептид	Ингибируют фурин с различной эффективностью $IC_{50} = 731$ нМ (Фурин) $IC_{50} = 569$ нМ (Фурин)	[62, 63]
<i>Пептиды и их производные</i>		
Пептидил-хлорметилкетоны Dec-Arg-Val-Lys-Arg-CO-CH ₂ -Cl	$K_i = 3,4$ нМ (<i>h</i> Фурин); 0,11–3,60 нМ (PC2, PC3, PACE4, PC6A и PC7)	[46]
Аргинин-содержащие пептидил-оксиды	$K_i \sim 46-55$ мкМ (<i>h</i> Фурин) $K_i = 40-74$ мкМ (<i>h</i> PC1)	[64]
Псевдопептиды; самый активный – Dec-Arg-Val-Lys-Arg-CH ₂ -Ala-Val-Gly-NH ₂	$K_i = 3,4$ нМ (Фурин)	[66]
Пептидил-субстраты, содержащие неприродные аминокислоты в подцентрах P' ₁	$K_i \sim 0,8-10$ мкМ (<i>h</i> Фурин) $K_i \sim 1-170$ мкМ (<i>h</i> PC1)	[68]
Пептиды, содержащие на С-конце декарбокислированные миметики аргинина; наиболее активный пептид – Phac-Arg-Val-Arg-4-aminomethylbenzamidine	$K_i = 0,81$ нМ (<i>h</i> Фурин), Ингибирует PACE4, PC5/6, PC1/3	[69, 70]
Гексапептиды – продукты сканирования комбинаторной библиотеки; самый активный – Ac-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-NH ₂	$K_i = 3,2$ нМ (<i>m</i> PC1); 360 нМ (<i>m</i> PC2); 1,4 мкМ (Фурин)	[71]
Полиаргинины; самый активный D9R-амид	$K_i = 1,3$ нМ (<i>h</i> Фурин)	[72, 73]
Eда-производные пептидов	$K_i = 39,6$ нМ (<i>h</i> Фурин); Блокирует процессинг фурином про-PDGF A, B (Platelet-Derived Growth Factor A,B) и про-VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor C)	[77]

* Эффективность ингибирования определяли с использованием флуорогенных субстратов и частично очищенных рекомбинантных ПК, отвечающих последовательности аминокислот ПК человека (*h*), мыши (*m*) или крысы (*r*)

терапевтический эффект против сибирской язвы [44].

В 1998 г. было обнаружено, что эндогенный протеин, называемый протеиназным ингибитором 8 (PI8), который является серпином овальбуминового типа, содержит в своей реакционноспособной петле последовательность аминокислот: Arg³³⁶-Asn-Ser-Arg³³⁹-Cys-Ser-Arg³⁴², включающую два минимальных сайта узнавания фурина, а именно аминокислоты 336–339 и 339–342 [45]. В связи с этим PI8 эффективно ингибирует фурин с $K_i = 53,8$ пкМ, образуя с ним прочный комплекс, который устойчив в SDS [45]. Фурин инактивируется согласно кинетике прочного связывания. Авторы считают маловероятным, что *in vivo* он или другие ПК являются мишенями PI8.

Биоинженерные протеиновые ингибиторы ПК были созданы при помощи методов направленного мутагенеза, исходя из ряда природных серпинов. Так, в физиологическом ингибиторе эластазы – α_1 -антитрипсине (α_1 -AT) человека – замена в реакционной петле Ala³⁵⁵-Ile-Pro-Met³⁵⁸ остатков Ala³⁵⁵ (P₄) и Met³⁵⁸ (P₁) на аргинин дает мутант, получивший название α_1 -PDX. Созданная последовательность аминокислот Arg³⁵⁵-Ile-Pro-Arg³⁵⁸ характерна для сайта узнавания фурина [46, 47], поэтому биоинженерный α_1 -PDX оказался мощным и селективным ингибитором фурина, который снижал активность энзима по механизму медленного и прочного связывания, образуя с ним комплекс, стабильный в SDS, и функционирующий как суицидный субстрат фурина. Были также изучены другие мутантные α_1 -PDX, содержащие в последовательности P⁶Leu-Glu-Ala-Ile-Pro-Met^{P1} α_1 -антитрипсина дикого типа в подцентрах P₁, P₂, P₄ и P₆ различные комбинации основных аминокислотных остатков [48]. При этом было показано, что значения k_{ass} исследованных вариантов оказались близкими величинами. Следует отметить, что α_1 -PDX ингибирует также PC6B, но не инактивирует ни PACE4, ни PC7, а торможение активности PC3 происходит в 400 раз менее эффективно, чем фурина [46, 47]. В клетках hEK293 биоинженерные мутанты замедляют процессинг фурином профактора фон Виллебранда, а α_1 -PDX предотвращает лизис клеток, индуцируемый бактериальными токсинами, развитие вирусной инфекции и процесс метастазирования, хотя в работе M. Nejjarı с сотр. [49] обнаружено, что α_1 -PDX усиливает у крыс метастазирование клеток карциномы толстой кишки человека.

Известно, что третий домен овомукоида индюка, содержащий в реакционной петле по-

следовательность аминокислот: Ala¹⁵-Cys-Thr-Leu¹⁸, является эффективным ингибитором сериновых протеиназ, и в том числе таких, как субтилизин, химотрипсин, эластаза. В 1993 г. W. Lu с соавт. показал, что вариант с тройной мутацией в реакционной петле: A15R, T17K и L18R является умеренным ингибитором фурина с константой равновесия K_a $1,1 \times 10^7$ M⁻¹ [50].

В крови человека циркулирует α_2 -макроглобулин (α_2 M) – гомотетрамерный гликопротеин, являющийся ингибитором с уникальным механизмом инактивации довольно широкого круга протеиназ. Процесс торможения активности энзимов начинается с расщепления в α_2 M конформационно подвижной части его пептидной цепи, находящейся на поверхности протеина, которая является своеобразной «приманкой» для протеиназ. Протеолиз этого участка обуславливает расщепление внутренней тиоэфирной связи α_2 M и последующие конформационные изменения ингибитора, приводящие к «захвату» протеиназы и ее экранированию от субстратов. Если на указанном участке осуществить замену некоторых аминокислот так, чтобы получилась последовательность аминокислот, отвечающая сайту узнавания фурина, то можно создать ингибитор, который активен в клетках COS-1 и ингибирует процессинг таких субстратов фурина, как профактор фон Виллебранда, трансформирующий фактор роста β 1 и растворимая форма гликопротеина gp 160 ВИЧ-1 [51].

Биоинженерным манипуляциям подвергался также эглин С – 70-членный полипептид, выделенный из медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*, который эффективно ингибирует эластазу, катепсин G, α -химотрипсин и, главное, субтилизин, являющийся представителем семейства сериновых протеиназ, к которому принадлежит фурин и другие ПК. Благодаря этому эглин С использовался для создания ингибиторов фурина [52]. В частности, замены аминокислот в районе реакционной петли Pro-Val-Thr-Leu⁴⁵-Leu-Asp на последовательность Arg-Val-Lys-Arg⁴⁵-Leu-Asp, отвечающей мотиву узнавания фурина, привели к весьма эффективному ингибитору фурина ($K_i \sim 10^{-9}$ M), хотя данное производное эглина С неустойчиво: оно медленно расщепляется энзимами. Для создания более селективных и стабильных производных, мутациям подвергались аминокислоты в позициях P₂–P₄ и было показано, что биоинженерный продукт с последовательностью аминокислот Arg-Val-Thr-Arg⁴⁵-Asp-Leu-Asp⁴⁸-Туг обнаруживает стабильность и высокую селективность по

отношению к фурину [53]. В работе [54] осуществили оптимизацию 10 дополнительных контактов вне реакционной петли и показали, что значительный эффект на сродство и селективность к фурину, кексину и PC7 оказывают замены в положении 49 эглина С (подцентр P₄'), причем фурин и кексин предпочитают в этой позиции кислый остаток (Asp или Glu соответственно), а PC7 – остаток триптофана. Мутант Arg⁴², Arg⁴⁵, Asp⁴⁹-эглин эффективно ингибирует фурин ($K_i = 330$ пкМ) и блокирует процессинг энзимом фактора фон Виллебранда в клетках COS-1.

Таким образом, работы по созданию биоинженерных ингибиторов ПК показали, что этот подход является весьма рациональным. Он позволяет получать довольно эффективные ингибиторы различных пропротеинконвертаз.

Производные продоменов пропротеинконвертаз

Стратегия использования структуры продоменов ПК для дизайна ингибиторов ПК постоянно привлекала внимание исследователей, благодаря своей эффективности и возможности создания специфических ингибиторов [55]. Как известно, продомены ПК являются не только внутримолекулярными шаперонами, но и регуляторами активности энзимов, и поэтому их исследовали в качестве ингибиторов ПК и обнаружили, что величины K_i находятся в пределах от наномолярного до пикомолярного уровня [19].

А. Boudreault и др. [56] продемонстрировал, что N-концевой фрагмент¹⁻⁹⁸ PC1/3 мыши, содержащий пропептид 1-84 этого энзима эффективно ингибирует не только PC1/3 ($K_i = 6$ нМ), но и фурин ($K_i = 10$ нМ) в соответствии с кинетикой медленного, но прочного связывания. Наблюдается также конкурентное ингибирование этим фрагментом протеиназы PC2, но по сравнению с фурином, сродство к ней при этом падает примерно в 1000 раз. Исследование *in vitro* ингибиторной активности продоменов фурина и других ПК, показало, что эти пептиды подавляют активность фурина, PC6A и PC7 на наномольном уровне [57]. Недостатком продоменов ПК является то, что они не проявляют ожидаемой специфичности, поэтому их использование для инактивации ПК в настоящее время весьма ограничено. Авторы считают, что для повышения специфичности ингибирования производными продоменов необходимо осуществить их дальнейшие структурные модификации [57, 58].

Фрагменты различных протеинов

Исследование гистатина-3 (пептида человеческой слюны), состоящего из 32 аминокислотных остатков и обладающего антимикробной активностью, показало, что он способен ингибировать фурин, поскольку в последовательности аминокислот пептида содержатся мотивы, узнаваемые фурином. Осуществлен синтез гистатина-3, его укороченного фрагмента⁹⁻²⁴ и ряда мутантов, а также изучено их действие на фурин, PC1 человека и на PC7 крысы [59]. Оказалось, что гистатин-3 является субстратом PC1, расщепляемым по связи, отмеченной стрелкой His-Arg-Gly-Tyr-Arg↓-Ser-Asn. Производные, включающие D-аминокислоты вместо их L-изомеров, а также мутанты, содержащие замены всех остатков гистидина на Phe или Tyr, не расщепляются протеиназой PC1. Гистатин-3 и его укороченный фрагмент конкурентно ингибируют фурин ($K_i \sim 2-3$ мкМ) в реакции амидолиза флуорогенного субстрата pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA. Гистатин-3 инактивирует PC7 примерно с такой же эффективностью, как и фурин [59].

Синтез и исследование циклических пептидов, отвечающих последовательности 18-членной реакционной петле протеиназного ингибитора-2 из ячменя BSPI-2 (Barley Serine Proteinase Inhibitor-2), показало, что как линейный, так и циклический пептид, включающие P₄ Arg, P₂ Lys, P₁ Arg и P'₂ Lys являются наиболее эффективными ингибиторами с $K_i \sim 4$ мкМ для фурина и $\sim 0,5$ мкМ для PC1/3. Любопытно, что линейный пептид ингибирует фурин неконкурентно, а циклический – является конкурентным ингибитором, хотя оба производных инактивируют PC1/3 конкурентно. Некоторые из полученных пептидов проявляют смешанный характер ингибирования. Поскольку синтезированные аналоги медленно гидролизовались исследованными протеиназами, для снижения этого нежелательного явления авторы вставили в положение P₁-P'₁ вместо пептидной связи –CO-NH- нерасщепляемую изостерическую аминотиленовую группировку (ψ [CH₂-NH]), что дало так называемые псевдопептиды, которые не гидролизуются под действием фурина и более эффективно его ингибируют, но не инактивируют PC1/3 [60].

Для создания высокоактивных ингибиторов фурина S. Wang с сотр. [61] использовал C-концевую последовательность гистона H1.2, состоящую из 36 остатков аминокислот, которая ингибировала фурин с K_i 510 нМ. Умень-

шение длины пептида и замена аминокислот в реакционном центре полученного фрагмента на мотив, узнаваемый фурином, увеличило ингибиторный эффект синтезированного пептида. Наиболее активным ингибитором оказался 14-членный пептид с K_i 17 нМ. Синтезированные соединения являются временными ингибиторами, т.к. постепенно расщепляются под действием фурина, тогда как укороченный 9-членный пептид, строения Gly-Lys-Arg^{P6}-Pro-Arg^{P4}-Ala-Lys-Arg^{P1}-Ala весьма стабилен: он не гидролизуется при инкубации с фурином в течении 3 часов при 37 °С и характеризуется значением $K_i = 27$ нМ. С целью увеличения стабильности изученных соединений, пептиды, содержащие 10, 12 и 14 аминокислот, были превращены в циклические производные благодаря образованию тиоэфирной связи. На удивление, они оказались нестабильными и менее активными соединениями, чем нонапептид. Авторы считают, что некоторые из синтезированных производных могут служить соединениями-лидерами для дизайна антивирусных и антибактериальных препаратов [61].

В 2005 г. А. Basak и др. синтезировали 30-членные пептиды, отвечающие последовательности аминокислот 367–394 реакционной петли α_1 -PDX. С использованием флуорогенных субстратов было обнаружено, что как линейный, так и циклический пептид ингибировали фурин по механизму медленного связывания со значениями IC_{50} в пределах 569–731 нМ [62]. Последующий синтез 15 других аналогичных пептидов, содержащих остаток гистидина или аминокислоты с алкильной боковой группой в положениях P₂, P₃, P₆ и P₈, показал, что они способны ингибировать фурин с различной эффективностью [63].

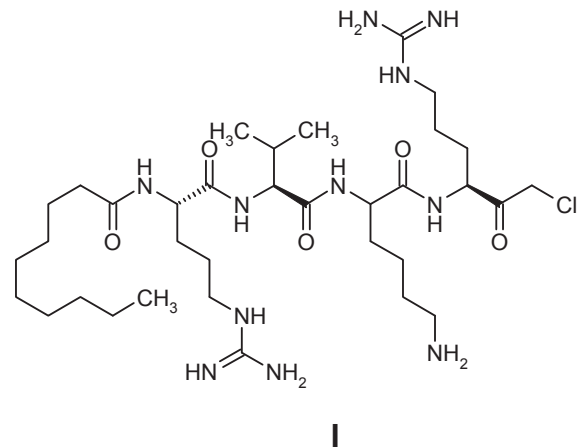
Низкомолекулярные пептидные ингибиторы

Поскольку создание ингибиторов энзимов является задачей, чрезвычайно актуальной в практическом плане, дизайну и синтезу соединений, способных тормозить активность ПК, было уделено большое внимание [18, 19]. В частности, обсуждались свойства обратимых и необратимых низкомолекулярных ингибиторов фурина как пептидной, псевдопептидной, так и непептидной природы [19].

В структуре *необратимых ингибиторов* протеиназ содержатся два участка: во-первых, «адресная» часть, представляющая собой последовательность аминокислот, которая обуславливает специфическое взаимодействие ингибитора с энзимом-мишенью. Во-вторых, это

реакционноспособная группа, реагирующая с остатками аминокислот активного центра. В частности, у ПК модификации подвергаются остатки серина и гистидина активного центра энзимов.

Для создания ингибиторов ПК часто исходят из аминокислотной последовательности соответствующего продомена [56–58] или участков субстратов различной длины, на которых происходит расщепление пептидной цепи [65]. Эти последовательности составляют «адресную часть» необратимого ингибитора. К ней присоединяют реакционноспособную группу, например, альдегидную группировку, остаток борной кислоты или хлорметилкетонную группу. Так, деканоил-Arg-Val-Lys-Arg-хлорометилкетон (I) был синтезирован с учетом последовательности аминокислот, находящихся на участке расщепления субстратов фурина.



I
Деканоил-Arg-Val-Lys-Arg-хлорометилкетон

Он ингибирует энзим с K_i 3,4 нМ, а также подавляет активность других ПК на наномольном уровне ($K_i = 0,11$ –3,60 нМ) [47]. Это производное является эффективным, но весьма неспецифическим ингибитором фурина. Пептидил-хлорометилкетоны ингибируют процессинг вирусных протеинов и поэтому являются антивирусными препаратами. Однако из-за своей токсичности и нестабильности использование их для терапевтических целей весьма ограничено. Они находят применение, главным образом, для аффинного мечения и титрования ПК [65] с целью определения концентрации энзимов.

Поскольку указанные необратимые ингибиторы малоспецифичны, многие исследователи пытались синтезировать *специфические* обратимые ингибиторы ПК [19, 66]. Так, были получены ингибиторы, созданные на основе субстратов, в структуру которых вмес-

то последовательности аминокислот подцентров P_1 - P_1' расщепляемой фурином пептидной связи $-\text{CO}-\text{NH}-$ вводили изостерические группировки, не расщепляемые энзимом. В частности, использовали следующие подходы [66]: 1) замену $-\text{NH}-$ группы пептидной связи $-\text{CO}-\text{NH}-$ на группировку $-\text{CH}_2-$, что дает кетометиленовые $\Psi(-\text{CO}-\text{CH}_2-)$ аналоги пептидов; 2) вставку метиленовой группы между $-\text{CO}-$ и $-\text{NH}-$ группами пептидной связи, приводящую к получению аминотилкетонных $\Psi(-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-)$ производных; 3) замену карбонила пептидной связи на $-\text{CH}_2-$ группу с образованием псевдопептидов $\Psi(-\text{CH}_2-\text{NH}-)$.

В качестве обратимых ингибиторов фурина исследовали серию пептидов, содержащих на С-конце модифицированный остаток аргинина [64]. Например, были синтезированы пептиды последовательности Arg-Lys-Lys-Arg с оксимной группировкой ($-\text{CH}=\text{N}-\text{OH}$), гидроксамовой группой ($-\text{CO}-\text{NHOH}$) или производным диметилгидроксамата ($-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{OCH}_3$) на С-конце и исследованы в качестве ингибиторов фурина и PC1 человека. Эти соединения оказались конкурентными ингибиторами исследованных ПК со значениями K_i , находящимися в пределах 40–74 мкМ [64]. Оказалось также, что декапептиды, содержащие в подцентре P_1 остаток неприродной аминокислоты: β -Ala, γ -Abu, β -Cha или γ -Hyp, ингибировали на микромолярном уровне PC1 ($K_i = 1-8,6$ мкМ) и фурин ($K_i = 0,8-2,2$ мкМ). Короткие пептидил-семикарбазоны, имеющие на С-конце пептида группировку $-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ [67], тоже ингибировали как фурин, так и PC1 ($K_i = 2,3-3,6$ мкМ). Полагают, что эти соединения дают с фурином комплекс, напоминающий переходное состояние реакции [19].

Ингибиторами фурина ($K_i \sim 1-10$ мкМ) и PC1 ($K_i = 1-170$ мкМ) являются также декапептиды, соответствующие участку 83–93 ргоPC1, в котором в подцентре P_1 Seg заменен на остаток непротеиногенной или конформационно затрудненной аминокислоты, например, на 1,2,3,4-тетрагидроизохинолинкарбонную или α -аминоизомасляную кислоты, на *tret*-лейцин и другие аминокислоты [68].

Исследования, проведенные под руководством Т. Steinmetzer [69], показали, что ряд тетрапептидов общей формулы (II, рис. 2), которые на С-конце содержали декарбоксилированный миметик аргинина, способны ингибировать фурин и другие ПК. В частности, было изучено два ряда указанных соединений. В первых, это производные агматина и его более

короткие или более длинные аналоги, содержащие в качестве положительно заряженной группировки амино-, или гуанидиновую группу (IIa). Во-вторых, аналоги с аминотилбензамидином, N-(амидино)-пиперидином или иными основными группами (IIb). Наиболее эффективным конкурентным ингибитором фурина оказался тетрапептид (IIc), ацилированный на N-конце фенилацетильной группировкой (Phac-группой), и который содержал на С-конце остаток 4-аминотилбензамидина. Соединение (IIc) со значением $K_i = 0,81$ нМ является, по-видимому, самым мощным синтетическим пептидом – ингибитором фурина.

G. L. Becker и др. изучил серию новых пептидомиметиков [70], в которых L-валин соединения IIc (рис. 2) заменялся остатками других аминокислот, и обнаружил, что введение в P_3 остатков гуанидиноаланина, изолейцина, фенилаланина или тирозина обуславливает создание эффективных ингибиторов фурина ($K_i = 0,83-1,9$ нМ). Допустима также замена аргинина в P_2 на остаток лизина, но включение в различные положения соединения (IIc) остатков D-аминокислот приводит к снижению ингибиторной активности.

Изучение действия указанных соединений на другие ПК показало, что синтезированные тетрапептиды действуют на PACE4, PC5/6 и PC1/3 человека сходным образом (значения K_i для соединения (IIc) находятся в пределах 0,6–1,6 нМ), в то время как активность PC7 и PC2 под воздействием (IIc) снижается менее эффективно (значения констант ингибирования находятся в пределах 6154–60 мкМ). Примечательно, что этот аналог ингибирует, хотя и слабо, сериновые протеиназы системы свертывания крови: тромбин, фактор Ха и плазмин (K_i в пределах 23–60 мкМ).

Эффективным подходом для создания ингибиторов ПК оказались методы комбинаторной химии. Так, для идентификации ингибиторов PC1 и PC2 использовался метод позиционного сканирования библиотеки синтетических пептидов, включающей около 52 миллионов гексапептидов. На основе данных о предпочтениях аминокислот в положениях P_6-P_1 было синтезировано почти три десятка гексапептидов и показано, что наиболее эффективным ингибитором PC1 является пептид Ac-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-NH₂ ($K_i = 3,2$ нМ), сродство которого к PC2 оказалось на два порядка ниже, чем для PC1. Ингибиторная активность синтезированных соединений против фурина была примерно в 400 раз менее эффективна, чем по отношению к PC1 [71].

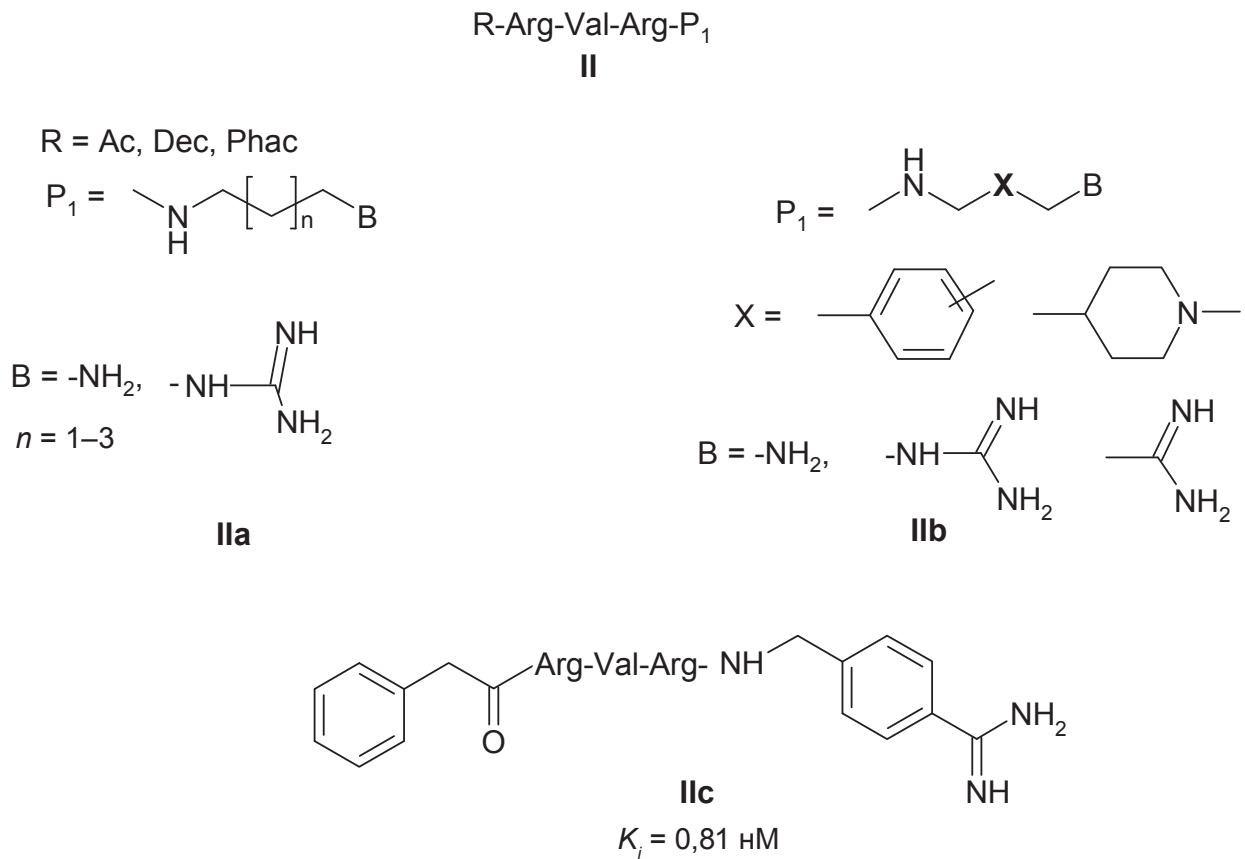


Рис. 2. Структура тетрапептидов, содержащих на С-конце декарбоксилированные миметики аргинина

Методами позиционного сканирования исследованы в качестве ингибиторов ПК также полиаргининсодержащие пептиды, включающие от четырех до девяти остатков аргинина [72]. Как видно из данных табл. 3, при переходе от тетра-L-аргинина к нона-L-аргинину эффективность конкурентного ингибирования ПК резко возрастает. Судя по приведенным данным, активные центры фурина и РАСЕ4 более сходны между собой, чем активный центр РС1. Любопытно, что активность РС2 в присутствии полиаргининов не снижается, а наоборот возрастает по сравнению с контролем и составляет 140% [72]. Было найдено, что нона-L-аргинин уже через 40 мин инкубации с фурином расщепляется с образованием гекса- или гептапептидов, а спустя 4 часа при 37 °С он в реакционной среде вообще не обнаруживается. М. М. Касргзак и другие показали, что самым эффективным ингибитором фурина среди аргининовых пептидов является нона-D-аргининамид (D9R-амид) с K_i 1,3 нМ [73]. Ингибируя фурин, этот пептид, а также гекса-D-аргининамид, защищают клетки RAW264.7 от сибирской язвы. Полиар-

гинины (с M_r 8 500–13 000) в значительной степени подавляет репликацию вируса ВИЧ-1 [74], а D6R-амид блокирует *in vitro* активацию экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* и защищает мышей от этого экзотоксина [76]. Авторы работы [73] приходят к выводу, что из-за присутствия D-аминокислот, обеспечивающих стабильность к действию гидролаз, а также благодаря низкой токсичности, относительно невысокой молекулярной массе, удивительной специфичности и низкому значению K_i по отношению к фурину нонапептид D9R-амид является многообещающим соединением для терапевтического применения.

В работе А. Васак и др. [77] развивается новая инновационная стратегия дизайна эффективных ингибиторов как фурина, так и других ПК (табл. 4). Подход основан на том, что в пептидную цепь, представляющую собой фрагмент продомена фурина человека, вводят специально сконструированную неприродную аминокислоту, названную енединил-аминокислотой (Eda), которая способна генерировать свободные радикалы, проявляя тем самым чрезвычайно высокую реакцион-

Таблица 3. Ингибирование ПК аргининовыми пептидами [72, 73]

Строение пептида	Значение K_i , мкМ		
	Фурин	РАСЕ4	РС2
Тетра-L-аргинин	6,4 ± 0,9	> 200	> 200
Пента-L-аргинин	0,99 ± 0,08	0,98 ± 0,12	14,0 ± 6,1
Гекса-L-аргинин	0,114 ± 0,006	0,520 ± 0,045	3,90 ± 0,62
Гепта-L-аргинин	0,068 ± 0,001	0,240 ± 0,045	5,2 ± 1,2
Окта-L-аргинин	0,061 ± 0,001	0,15 ± 0,06	5,1 ± 2,0
Нона-L-аргинин	0,042 ± 0,003	0,110 ± 0,013	12,0 ± 2,5
Гекса-D-аргинин	0,106 ± 0,010	0,58 ± 0,40	13,00 ± 0,25
Нона-D-аргининамид	0,0013	—	—

Таблица 4. Ингибиторы пропротеинконвертаз непептидной природы*

Природа соединения	Эффективность действия ингибитора	Литература
Непептидные Eda-производные	$IC_{50} = 10,5-14,2$ мкМ (<i>h</i> Фурин); $8,5$ мкМ (<i>h</i> РС7); $17,2-34,5$ (<i>m</i> РС5)	[77]
Андрографолид и его сукциноилированные производные	$K_i = 2,6-200$ мкМ (<i>h</i> Фурин); $10-50$ мкМ (<i>h</i> РС1 и <i>h</i> РС7)	[80]
Комплексы производных пиридина с ионами цинка, меди	$IC_{50} = 5-10$ мкМ (Фурин)	[81]
Низкомолекулярные производные 2,5-дидезоксистрептамина	$K_i = 6-812$ нМ (<i>h</i> Фурин); Ингибируют РС6В, РС7 и РАСЕ4	[82]
Нафтофлуорескамин и ряд ароматических и гетероциклических соединений	$K_i = 12$ мкМ; $IC_{50} = 11-159$ мкМ (<i>h</i> Фурин)	[83]
Производные дикумарола	$K_i = 1,04-185,1$ мкМ (<i>h</i> Фурин); Ингибируют <i>r</i> РАСЕ4, <i>h</i> РС5/6, <i>h</i> РС7	[83]
Флавоноиды	$K_i = 5-230$ мкМ (<i>h</i> Фурин); Ингибируют РС4, РС5 и РС7	[78, 85]
N-Ацилированные бициклические гуанидины	$K_i = 3,3-10$ мкМ (РС2)	[86]
Производные пирролидин-биспиперазинов	$K_i = 0,54-0,66$ мкМ (РС2)	[86]
Амидиногидразоны и ацилированные аминокгуанидины	$K_i = 0,46-500$ мкМ (<i>h</i> Фурин);	[83, 87]
Производные пиразола; 5-Амино-4-ациламино-3-(4-метилфениламино)-1 <i>H</i> -пиразол	$IC_{50} = 137$ мкМ $K_i = 288$ мкМ	[83, 88]

* Эффективность ингибирования определяли с использованием флуорогенных субстратов и частично очищенных рекомбинантных ПК, отвечающих последовательности аминокислот пропротеинконвертаз человека (*h*), мыши (*m*) или крысы (*r*)

ную способность. Она также способствует образованию β -поворотов полипептидной цепи. Оказалось, что пентадекапептид (III, рис. 3), отвечающий последовательности аминокислот 98–112 продомена фурина, в структуру которо-

го ввели Eda на участке $P_1-P'_1$, ингибирует фурин конкурентно с $IC_{50} = 40$ нМ. Было также обнаружено, что в клетках СНО Eda-пептид (III) эффективно блокирует процессинг фурином предшественников таких факторов роста,

как тромбоцитарный фактор роста PDGF A, B (Platelet-Derived Growth Factor A, B) и фактор роста эндотелия сосудов VEGF-C (Vascular Endothelial Growth Factor C), которые связаны с опухолевым ростом [77].

Более того, эти авторы впервые показали, что непептидные енедиинил-производные сами по себе способны ингибировать фурина и другие ПК. Наиболее активным ингибитором фурина ($IC_{50} = 10,5$ мкМ) и PC7 ($IC_{50} = 8,5$ мкМ) является соединение (V, рис. 3). Несколько хуже ($IC_{50} = 14,2$ мкМ) активность фурина снижалась под влиянием соединения (VI, R = Tos). Другие енедиинильные производные проявляли относительно фурина еще более низкую ингибиторную активность ($IC_{50} = 160-192$ мкМ). Тормозящий эффект указанных соединений объясняется, по мнению авторов, тем, что в результате циклизации

Eda-части они легко дают высокорекреакционные свободные дирадикалы типа (IV, рис. 3), которые способны реагировать с аминокислотами активного центра протеиназ, снижая их каталитическую активность.

Низкомолекулярные ингибиторы непептидной природы

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают низкомолекулярные ингибиторы ПК непептидной природы. Это обусловлено тем, что указанные соединения характеризуются высокой метаболической стабильностью, растворимостью в водных средах, биодоступностью и способностью проникать в клетку. Важно, что синтетически эти соединения более доступны, чем пептиды или рекомбинантные протеины.

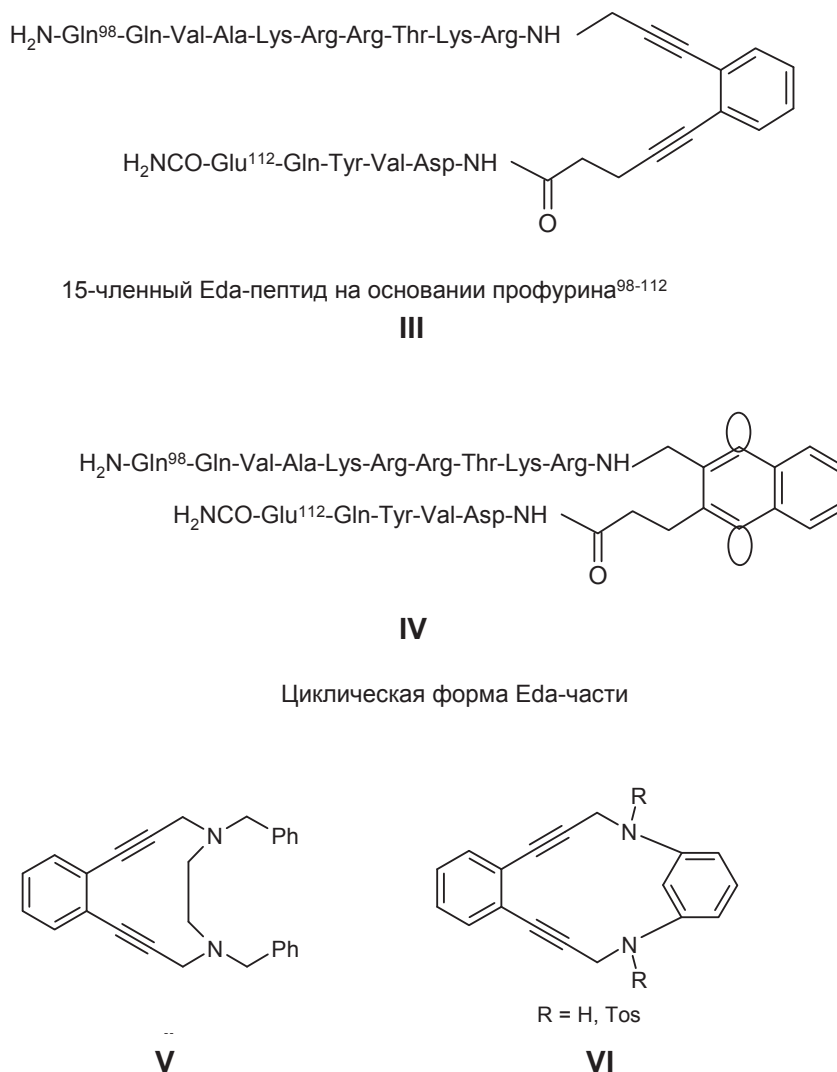


Рис. 3. Структура пептидов, содержащих вставку Eda-аминокислот

Кроме того, в некоторых случаях они оказались препаратами, используемыми для лечения различных заболеваний [78].

Говоря об ингибиторах фурина, следует упомянуть соединения, не относящиеся к протеинам или пептидам. Так, активность энзима снижается в присутствии EDTA или EGTA, поскольку эти соединения связывают ионы кальция [79]. Двухвалентные катионы Zn^{2+} и Hg^{2+} полностью тормозят активность фурина, тогда как типичные ингибиторы сериновых протеиназ: фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и лейпептин не оказывают ингибиторного эффекта на фурин [79].

Из лекарственного растения *Andrographis paniculata* ранее был выделен лактон андрографолид (VII, рис. 4), который, как выяснилось, слабо ингибировал фурин со значением $K_i = 200$ мкМ [80]. Из других природных компонентов указанного растения неоандрографолид (VIIIa) оказался примерно в 20 раз более мощным ингибитором, чем сам андрографолид. Сукциноилирование лактона (VII) дает смесь нескольких продуктов, среди которых самым эффективным конкурентным ингибитором фурина является монопиридиновая соль трисуцциноилированного производного (VIIIb) ($K_i = 2,6$ мкМ) [80]. Помимо фурина ингибиторная активность сукциноилированных производных исследовалась также относительно таких клинически важных пропротеинконвертаз, как PC1 и PC7 и оказалось, что величины K_i для PC1 находятся в пределах 10–50 мкМ, а для PC7 – около 30 мкМ. Таким образом, хотя сам андрографолид практически не ингибирует фурин, химическая

модификация его HO-групп благодаря сукциноилированию или гликозилированию обуславливает значительный рост эффективности торможения активности фурина.

В 2004 году было показано, что ингибиторами фурина и кексина (Kex2) являются устойчивые комплексы цинка и меди с некоторыми гетероциклами. Например, простые соединения, содержащие в своей молекуле несколько колец пиридина, образуют с ионами цинка или меди комплексные соединения типа (IXb, рис. 5), которые ингибируют фурин необратимо со значениями IC_{50} 5–10 мкМ [81]. Эффективность ингибирования Kex2 снижена по сравнению с фурином иногда на два порядка. Сами по себе гетероциклы (IXa, X–XII, рис. 5) не влияют на активность изученных энзимов. По отношению к субстрату ингибирование комплексами (IXb) является конкурентным. Авторы высказали предположение о том, что снижение активности энзимов обусловлено взаимодействием гистидина их активного центра с исследуемыми соединениями и образованием с ними координационных соединений.

Ингибиторами фурина непептидной природы являются также производные 2,5-дидезоксистрептамина, содержащие в молекуле от 2 до 6 гуанидиновых групп [82]. Наилучшие из них ингибируют фурин на наномолярном уровне. Они защищают также клетки RAW 264.7 от токсического действия протективного антигена сибирской язвы. Среди изученных соединений наиболее мощным конкурентным ингибитором фурина является производное (XIII, $K_i = 6$ нМ), которое содержит в молекуле 4 гуанидиновые группы. Было выяснено, что

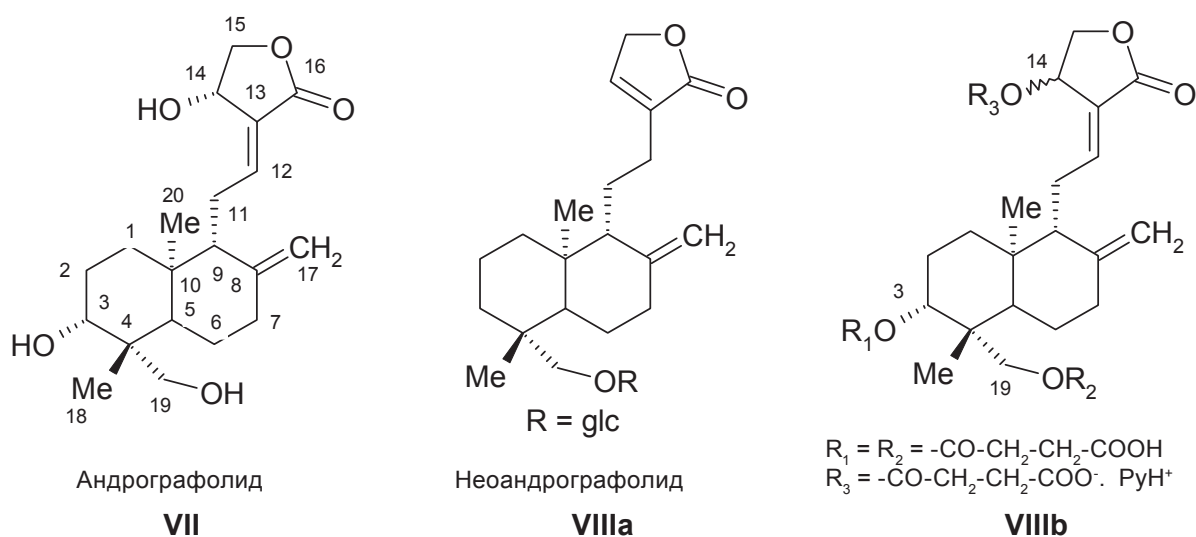


Рис. 4. Производное дитерпенов группы лабдана

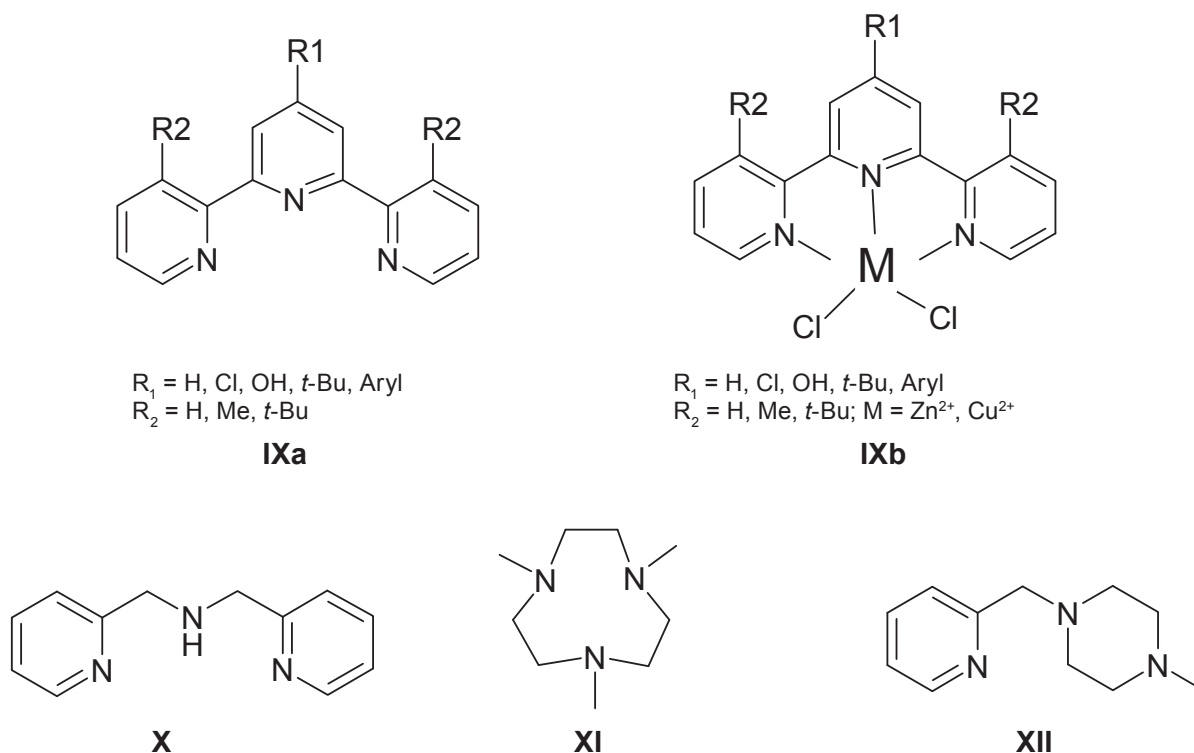
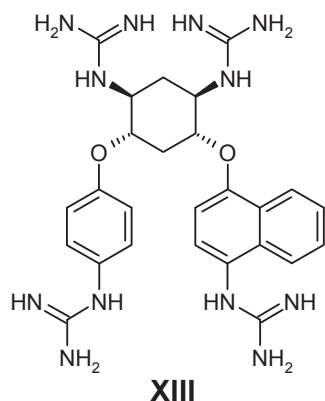


Рис. 5. Гетероциклические соединения, способные образовывать комплексы с ионами цинка или меди

производные 2,5-дидезоксистрептамина являются весьма селективными ингибиторами фурина. Изучение PC64, PC6B и PC7 показало, что синтезированные соединения взаимодействуют с фурином и PC6B сходным образом, но хуже ингибируют PC64 и PC7 [82].



Для разработки новых низкомолекулярных ингибиторов фурина в работе Т. Комиуата и др. [83] осуществили скрининг около 30 000 химических соединений двумя независимыми методами. В одном из них ингибиторную активность соединений тестировали с использованием растворимых ПК. В другом — определение фуриноподобной активности вели в

клетках СНО специально сконструированным химерным протеином, который состоял из трех частей: из щелочной фосфатазы, из участка цитозольного и трансмембранного доменов β -секретазы, которые обеспечивали локализацию химерного протеина в транс-Гольджи сети и, наконец, из последовательности 10 аминокислот стромелизина 3, отвечающей субстратной специфичности фурина, которая соединяла эти две части химерного протеина в единую структуру. После расщепления сконструированного протеина фурином (или какой-либо другой ПК) в районе последовательности стромелизина 3, происходила секреция щелочной фосфатазы в экстрацеллюлярную среду, что позволяло легко тестировать ее хромогенным субстратом, например, пара-нитрофенилфосфатом [84] и оценить активность ПК.

Было обнаружено [83], что обратимыми ингибиторами фурина являются некоторые дикумаролы, например, производные (XIV, рис. 6). Самым эффективным ингибитором ($K_i = 1,04$ мкМ) был дикумарол, содержащий индан в качестве заместителя R. Другие производные снижали активность фурина при значениях константы ингибирования в пределах 3,3–85,1 мкМ [83]. Следует подчеркнуть, что дикумаролы оказались неконкурентными ингибиторами фурина, которые ранее для него не

были известны. Недостатком дикумаролов является то, что они способны давать комплексы с флуорогенным субстратом. Это затрудняет определение констант ингибирования дикумаролов при повышенных концентрациях Вос-RVRR-MCA. Сам 4-гидроксикумарин снижал активность фурина лишь на миллимольном уровне.

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что и другие органические соединения также влияют на активность фурина. Например, неконкурентным ингибитором является нафтофлуоресцеин (XV, рис. 6), а соединения (XVI) с положительным зарядом – конкурентным. Следует отметить, что в противоположность амидиногидразону (XVI) соединение (XV) содержит в молекуле карбоксильную группу, заряженную при pH 7,0 отрицательно. Несмотря на это, оно с такой же эффективностью ингибирует фурин, как и амидиногидразон (XVI). В структуре пиразола (XVII) имеется более кислая (чем карбоксил) сульфогруппа. Тем не менее, соединение (XVII), хотя и слабо, но отчетливо ингибирует фурин.

Исследование эффективности ингибирования нафтофлуоресцеином и некоторы-

ми дикумаролами других ПК: PACE4, PC5/6, PC7 показало, что значения K_i дикумарола, содержащего в своей структуре индан, являются сопоставимыми как для фурина, так и для PACE4 или PC5/6. Однако его сродство к PC7 оказалось в 79 раз слабее, чем для фурина. Нафтофлуоресцеин (XV) проявлял наибольший ингибиторный эффект по отношению к PC7 и оказывал одинаковое действие как на фурин, так и на PACE4. Он был менее эффективен против PC5/6. До некоторой степени исследованные соединения ингибировали также тромбин.

Дикумаролы способны ингибировать фурин как на поверхности клетки, проявляя защитное действие против токсина сибирской язвы, так и в секреторном пути, блокируя, например, процессинг матриксной металлопротеиназы. Все это, наряду с относительно низкой токсичностью и биодоступностью дикумаролов, свидетельствует о том, что они представляют собой прекрасный исходный материал для химических модификаций структур с целью повышения сродства и селективности ингибиторов к фурину и другим ПК.

Для выявления нового класса низкомолекулярных непептидных ингибиторов фури-

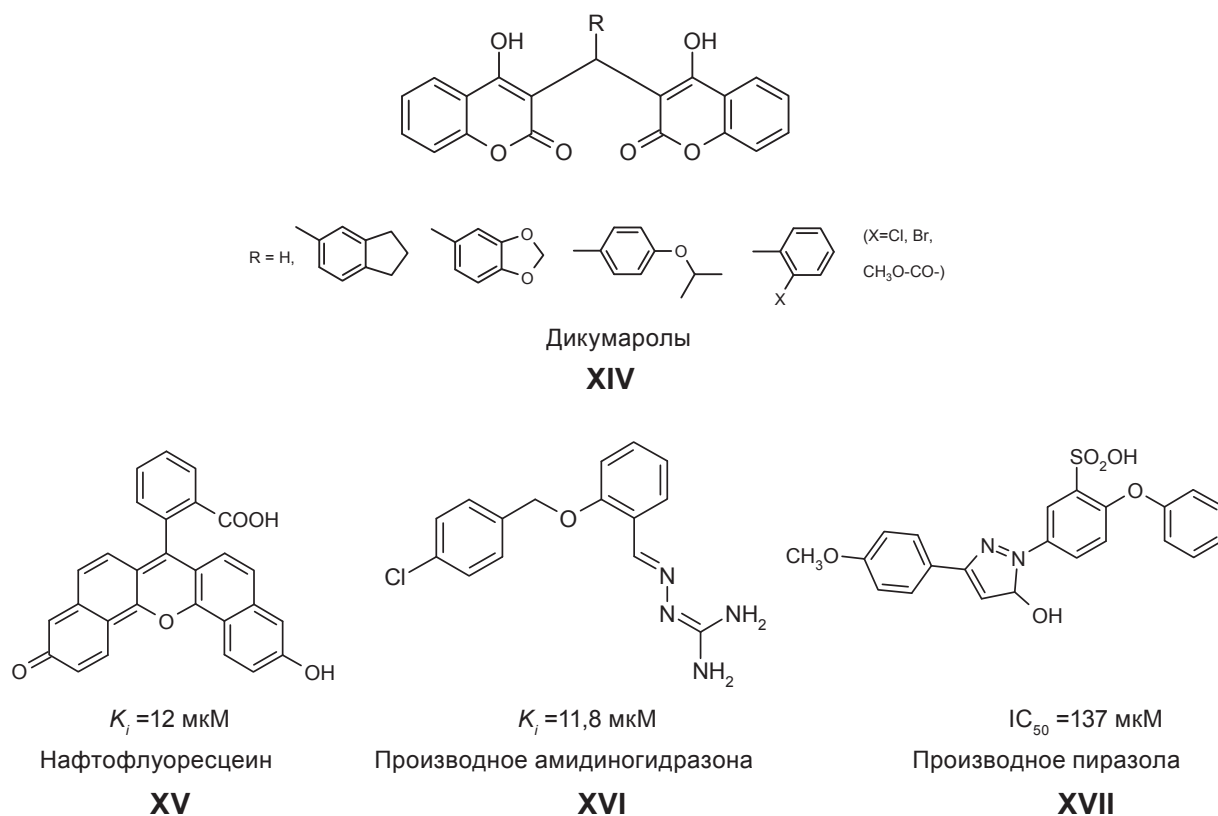


Рис. 6. Некоторые ингибиторы фурина

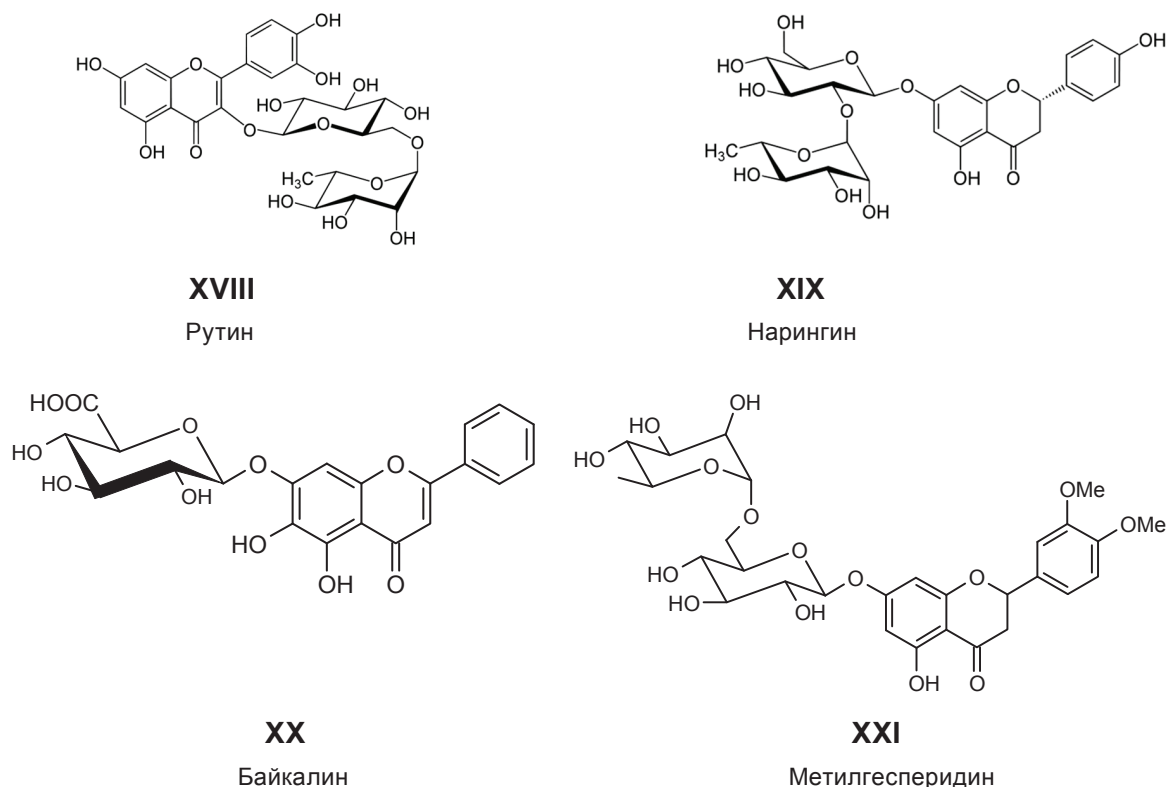
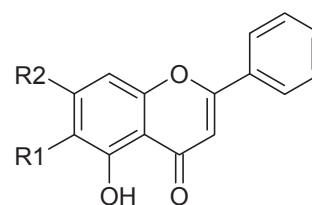


Рис. 7. Формулы гликозильированных флавоноидов

на В. К. Кибирев и др. [85] провели скрининг ряда флавоноидов и некоторых природных соединений (рис. 7). Найдено, что гликозильированные флавоноиды: рутин, нарингин, байкалин и метилгесперидин, не имеющие положительного заряда в своей молекуле, оказались при pH 7,2 конкурентными ингибиторами фурина с $K_i \sim 80\text{--}230$ мкМ. Хотя природа такого взаимодействия пока не совсем ясна, можно предположить, что торможение активности фермента обусловлено как гидрофобными взаимодействиями остова молекулы флавоноидов, так и образованием водородных связей между гидроксильными группами гликозильированного фрагмента и остатками аминокислот активного центра фурина. Исследованные флавоноиды проявляют относительно слабую ингибиторную активность, но можно предположить, что они будут полезными при разработке более мощных ингибиторов фурина в будущем.

Исследованию флавоноидов как ингибиторов пропротеинконвертаз посвящена также работа [78]. Из лекарственного растения *Oroxylum indicum* A. Vasak и др. выделили четыре флавоноида (XXII): байкалеин, хризин, ороксиллин А и его гликозильированное производное и с использованием двух синтети-

ческих флуорогенных субстратов показали, что эти соединения являются конкурентными ингибиторами фурина, причем наиболее эффективным из них оказался ороксиллин А ($K_i = 5$ мкМ). Данное соединение является в 5 раз более мощным ингибитором фурина, чем байкалеин и в 7 раз, чем хризин. При исследовании специфичности флавоноидов было обнаружено, что наиболее эффективно указанные соединения подавляет активность PC4 и несколько хуже – активность PC5. Интересно, что при низкой концентрации этих соединений (1 мкМ) активность PC7 не снижается, а возрастает примерно в 1,5–2,0 раза, а при увеличении концентрации флавоноида – уменьшается.



XXII

Байкалеин	$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}; K_i = 26,75$ мкМ
Ороксиллин А	$R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{OH}; K_i = 5,0$ мкМ
Хризин	$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}; K_i = 34,91$ мкМ

В ходе поиска низкомолекулярных синтетических ингибиторов для таких пропротеин-конвертаз, как PC1/3 и PC2, было испытано 38 библиотек, содержащих в общей сложности 30 миллионов гетероциклов, и было обнаружено два класса соединений: производные бициклических гуанидинов (XXIII, рис. 8) и пирролидин-биспиперазина (XXIV), которые оказались неконкурентными ингибиторами PC2 [86]. Константа ингибирования самого эффективного ингибитора среди N-ацилированных бициклических гуанидинов составляла 3,3 мкМ. Пирролидин-биспиперазины оказались почти в 10 раз более сильными ингибиторами: значения K_i самого эффективного соединения в этом ряду составляет 0,54 мкМ. Эти гетероциклы обнаруживают медленное необратимое связывание с неконкурентной кинетикой ингибирования. Они являются относительно селективными ингибиторами PC2. Например, значения K_i для PC1/3 превосходят в 74 раза, а для фурина – в 45 раз величины константы ингибирования для PC2.

Авторы считают, что им впервые удалось найти соединение-лидер для дизайна специфических ингибиторов ПК PC2.

Недавно было обнаружено, что некоторые соединения, содержащие в своей структуре заместители со сниженной (по сравнению с амидиновой или гуанидиновой группой) основностью, обуславливают ингибирование фурина. Например, при скрининге различных соединений Т. Комiyата и др. нашли [83], что

весьма простой амидиногидразон (XVI, рис. 6) заметно ингибирует фурин ($K_i = 11,8$ мкМ).

В 2011 году F. Sialaff и др. [87] синтезировал серию амидиногидразонов (XXV–XXVII, рис. 9), содержащих в молекуле несколько групп, несущих положительный заряд, и исследовал их в качестве ингибиторов не только фурина, но и других сериновых протеиназ: тромбина, трипсина, плазмина, фактора Ха и субтилизина. Оказалось, что при наличии в бензольном кольце одной амидиногидразоновой группировки исследуемые соединения практически не влияют на активность фурина ($K_i = 270–500$ мкМ), тогда как присутствие двух и более таких групп обуславливает ингибирование энзима. Наиболее эффективным ингибитором фурина оказалось соединение (XXVI, $K_i = 0,46$ мкМ). Производное (XXVII), содержащее четыре амидиногидразоновые группы, снижало активность фурина несколько менее эффективно ($K_i = 0,58$ мкМ). Величины констант ингибирования для других сериновых протеиназ превышали значение 10 мкМ, хотя амидиногидразон (XXVII) снижал активность тромбина на порядок эффективнее ($K_i = 0,86$ мкМ) других трипсиноподобных сериновых протеиназ. Предполагается, что эти соединения могут служить хорошей стартовой платформой для создания селективных ингибиторов фурина непептидной природы.

Для поиска новых ингибиторов фурина непептидной природы синтезирован и испытан ряд производных азолов [88]. По пред-

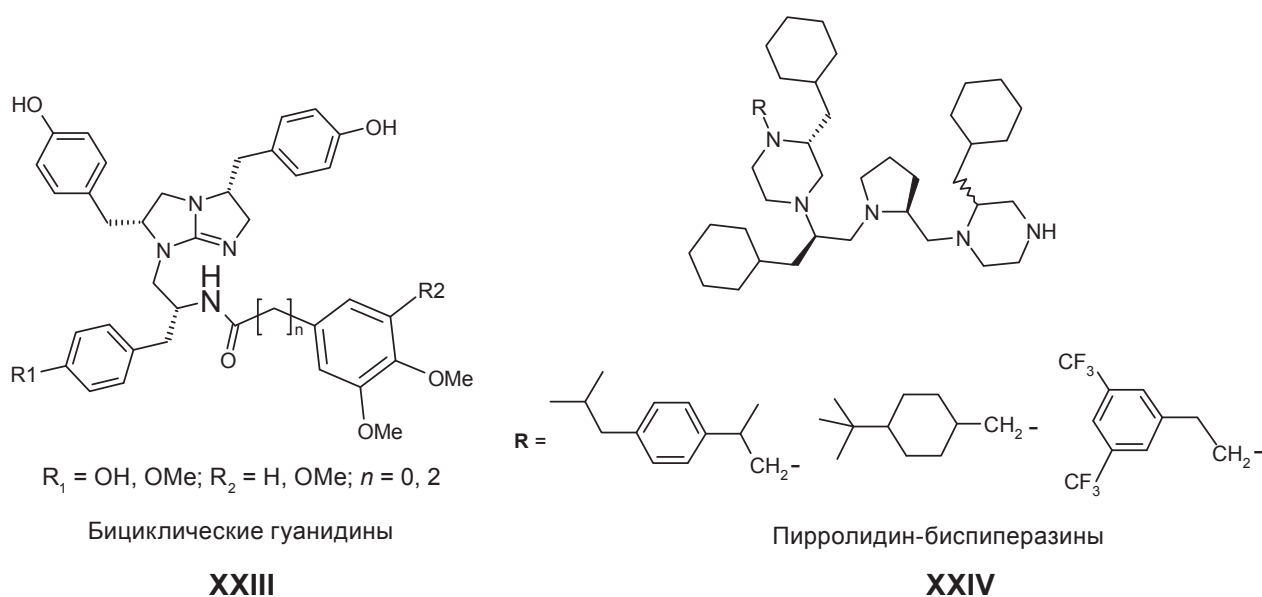


Рис. 8. Структура N-ацилированных бициклических гуанидинов и пирролидин-биспиперазинов

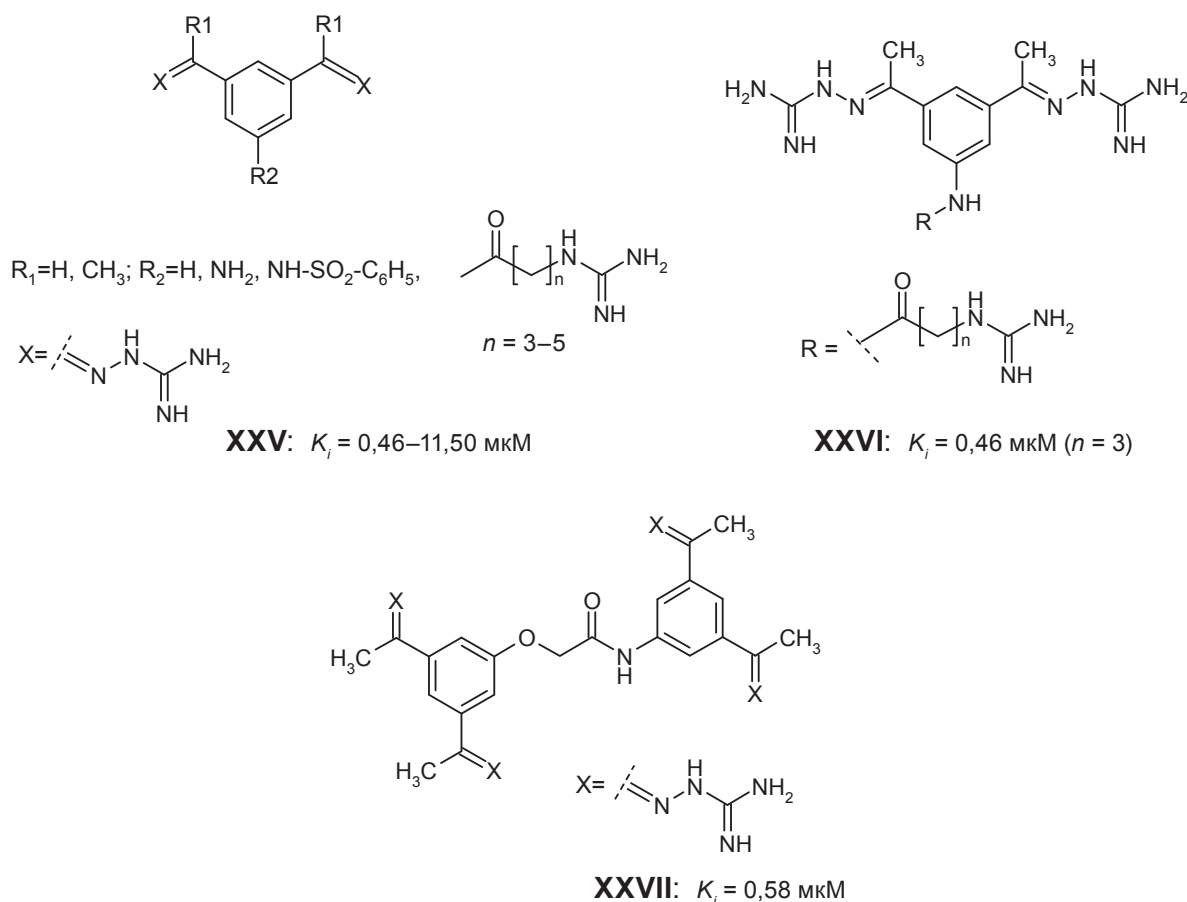


Рис. 9. Формулы амидиногидразонов – ингибиторов пропротеинконвертаз

варительным данным, некоторые из этих гетероциклов способны ингибировать энзим на 50–70%, но при весьма высокой концентрации исследуемого соединения. Наиболее эффективным соединением среди данных азолов оказался 5-амино-4-ациламино-3-(4-метилфениламино)-1*H*-пиразол. Он снижал активность фурина по механизму смешанного ингибирования ($IC_{50} = 288 \text{ мкМ}$) [88]. Результаты проведенной работы позволяют наметить пути химической модификации структуры производных пиразола для создания более мощных ингибиторов неперпептидной природы.

Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению макромолекулярных ингибиторов ПК, низкомолекулярные соединения рассматриваются как наиболее привлекательные и полезные структуры для дизайна и создания новых потенциальных терапевтических агентов [19]. Действительно, в последние годы исследователи уделяли большое

внимание синтезу низкомолекулярных ингибиторов на основе пептидов, их миметиков или соединений неперпептидной природы. Следует подчеркнуть, что создание уникальных и специфических ингибиторов для конкретных ПК-мишеней является одним из перспективных направлений при разработке современных биологически активных соединений. Однако поскольку связывающие центры пропротеинконвертаз близки по своей структуре созданию конкурентных ингибиторов представляет сложную проблему. Можно думать, что поиск их *неконкурентных* ингибиторов [83], снижающих каталитическую активность ПК за счет связывания *вне зоны* активного центра, где структурные различия могут быть более значительными, чем в активном центре ПК, является, по-видимому, многообещающим подходом для дизайна и целенаправленного синтеза специфических ингибиторов ПК новой генерации.

СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ ІНГІБІТОРІВ ПРОПРОТЕЇНКОНВЕРТАЗ

В. К. Кібирев, Т. В. Осадчук

Інститут біоорганічної хімії та
нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Огляд присвячено обговоренню властивостей пропротеїнконтвертаз (ПК) – внутрішньоклітинних кальційзалежних серинових ендопроптаз тварин, що відіграють першочергову роль у процесінгу неактивних попередників протеїнів і перетворенні їх на біологічно активні продукти. ПК беруть також участь у розвитку широкого кола захворювань, що включають бактеріальні та вірусні інфекції, рак, хворобу Альцгеймера, ожиріння та ін. Тому ці ензими розглядаються як перспективні мішені для створення сучасних терапевтичних препаратів.

Для ПК ідентифіковано всього декілька ендогенних макромолекулярних інгібіторів: pro7B2 (Proprotein 7B2) – специфічний шаперон для PC2, граніноподібний попередник нейроендокринного протеїну proSAAS – селективний ліганд для PC1 та серпін Spn4A (Serine Proteinase Inhibitor) із *Drosophila melanogaster*, котрий інгібує PC2 і фурін. Методом спрямованого мутагенезу було створено біоінженерні інгібітори ПК.

Як інгібітори ПК розглянуто певні фрагменти протеїнів та пептидів, зокрема поліаргініни та невеликі інгібітори, що містять псевдопептидний зв'язок на ділянці розщеплення пептидного субстрату.

Обговорюються інгібіторні властивості різноманітних сполук непептидної природи: похідних андрографоліда, виділених із рослини *Andrographis paniculata* (для фурину $K_i = 2,6\text{--}200$ мкМ); деяких аналогів піридину, здатних утворювати комплекси з іонами міді або цинку, що інгібують фурін з $IC_{50} = 5\text{--}10$ мкМ; похідних 2,5-дидезоксистрептаміну, які містять в своїй структурі гуанідинові групи (для фурину $K_i = 6\text{--}812$ нМ), а також низки дикумаролів ($K_i = 1\text{--}185$ мкМ для фурину) та флавоноїдів, що інгібують фурін з $K_i = 5\text{--}230$ мкМ. Розглянуто інгібіторний ефект так званих енедіїніл-амінокислот та пептидів на їх основі (K_i біля 40 нМ для фурину), а також інгібування PC2 N-ацильованими біциклічними гуанідинами ($K_i = 3,3\text{--}10$ мкМ) та похідними піролідин-дипіразолу ($K_i = 0,54\text{--}10$ мкМ).

Показано, що деякі з синтезованих похідних можуть бути використані як сполуки-лідери для дизайну специфічних інгібіторів ПК.

Ключові слова: пропротеїнконтвертази, інгібітори протеїназ, протеїнові та біоінженерні інгібітори, інгібітори пептидної та псевдопептидної природи, непептидні інгібітори.

STRUCTURE AND PROPERTIES OF PROPROTEIN CONVERTASE INHIBITORS

V. K. Kibirev, T. V. Osadchuk

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Summary

This review is devoted to structure and properties of proprotein convertases (PCs), the intracellular Ca^{2+} -dependent serine endoproteases of mammalia, that play the essential role in the processing of inactive protein precursors and their transforming into bioactive mature products. PCs are also implicated in development of a great variety of diseases including bacterial or viral infections and such pathologies as cancer, Alzheimer's disease, obesity and so on. Owing to these findings, PCs are considered as promising targets for design of their inhibitors and development of new potential therapeutic agents.

Only several endogenous protein inhibitors are identified now for PCs: pro7B2 (Proprotein 7B2), the specific chaperon of PC2, granine-like precursor of neuroendocrine protein proSAAS, the selective ligand of PC1, and serpin Spn4A (Serine Proteinase Inhibitor) of *Drosophila melanogaster* that inhibits PC2 and furin. By the methods of site-directed mutagenesis, the bioengineered inhibitors of PCs were also designed.

Structures and properties of protein or peptide fragments as inhibitors of PCs were also discussed. Particularly, the properties of polyarginines and small peptides containing pseudopeptide bond at the scissile site a suitable peptide substrate were described.

The inhibitory activity of non-peptide compounds such as derivatives of andrographolid from *Andrographis paniculata* ($K_i = 2.6\text{--}200$ μM against furin), certain complexes of pyridine analogs with ions of Cu^{2+} or Zn^{2+} inhibiting furin with $IC_{50} = 5\text{--}10$ μM , derivatives of 2,5-dideoxy-

streptamine containing several guanidine groups ($K_i = 6\text{--}812$ nM for furin) and also a number of dicoumarols ($K_i = 1\text{--}185$ μM against furin) and some flavonoids (with $K_i = 5\text{--}230$ μM for furin) were reflected in the article. The effects of enediynyl-amino acids derivatives or their peptides ($K_i \approx 40$ nM against furin) were considered. Inhibition of PC2 by N-acylated bicyclic guanidines ($K_i = 3.3\text{--}10$ μM) or derivatives of pyrrolidin bispyperazines ($K_i = 0.54\text{--}10$ μM) are considered too.

Some of synthesized derivatives may serve as lead compounds for design of the specific inhibitors for individual PCs.

Key words: proprotein convertases, proteinase inhibitors, protein and bioengineered inhibitors, peptide or pseudopeptide inhibitors, non-peptide inhibitors.

- Bergeron F., Leduc R., Day R. // J. Mol. Endocrin. – 2000. – **24**, N 1. – P. 1–22.
- Nakayama K. // Biochem. J. – 1997. – **327**, N 3. – P. 625–635.
- Henrich S., Cameron A., Bourenkov G. P. et al. // Nature Struct. Biol. – 2003. – **10**, N 3. – P. 520–526.
- Steiner D. F., Cunningham D., Spigelman L., Aten B. // Science. – 1967. – **157**, N 3789. – P. 697–700.
- Henrich S., Lindberg I., Bode W., Than M. E. // J. Mol. Biol. – 2005. – **345**, N 2. – P. 211–227.
- Seidah N. G., Khatib A. M., Prat A. // Biol. Chem. – 2006. – **387**, N 7. – P. 871–877.
- Thomas G. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – **3**, N 10. – P. 753–766.
- Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Радавский Ю. Л. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 6. – С. 5–18.
- Scamuffa N., Calvo F., Chrétien M. et al. // FASEB J. – 2006. – **20**, N 12. – P. 1954–1963.
- Hosaka M., Nagahama M., Kim W.-S. et al. // J. Biol. Chem. – 1991. – **266**, N 19. – P. 12127–12130.
- Stawowy P., Meyborg H., Stibenz D. et al. // Circulation. – 2005. – **111**, N 21. – P. 2820–2827.
- Khatib A-M., Siegfried G., Chrétien M. et al. // Amer. J. Phatol. – 2002. – **160**, N 6. – P. 1921–1935.
- Lahlil R., Calvo F., Khatib A-M. // Recent Pat. Anticancer Drug Discov. – 2009. – **4**, N 1. – P. 83–91.
- Benjannet S., Elagoz A., Wickham L. et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 14. – P. 10879–10887.
- Croissandeau G., Basak A., Seidah N.G. et al. // J. Cell. Sci. – 2002. – **115**, N 6. – P. 1203–1211.
- Furuta M., Yano H., Zhou A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**, N 13. – P. 6646–6651.
- Horton J. D., Cohen J. C., Hobbs H. H. // J. Lipid Res. – 2009. – **50**, April Suppl. – S. 172–S177.
- Fugère M., Day R. // TRENDS Pharm. Sci. – 2005. – **26**, N 6. – P. 294–301.
- Basak A. // J. Mol. Med. – 2005. – **83**, N 11. – P. 844–855.
- Zhong M., Munzer J. S., Basak A. et al. // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, N 48. – P. 33913–33920.
- Fugère M., Day R. // Curr. Pharm. Des. – 2002. – **8**, N 7. – P. 549–562.
- Sun T., Jianhua W. // Int. J. Biol. Sci. – 2010. – **6**, N 1. – P. 89–95.
- Seidah N. G., Mayer G., Zaid A. et al. // Internat. J. Biochem. Cell Biol. – 2008. – **40**, N 6–7. – P. 1111–1125.
- Day R., Lazure C., Basak A. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, N 2. – P. 829–836.
- Azaryan A. V., Krieger T. J., Hook V. Y. H. // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, N 14. – P. 8201–8208.
- Gordon V. M., Rehemtulla A., Leppla S. H. // Infect. Immun. – 1997. – **65**, N 8. – P. 3370–3375.
- Sucic J. F., Moehring J. M., Inocencio N. M. et al. // Biochem J. – 1999. – **339**, N 3. – P. 639–647.
- Basak A., Shervani N. J., Mbikay M., Kolajova M. // Prot. Exp. Pur. – 2008. – **60**, N 2. – P. 117–126.
- Nour N., Mayer G., Mort J. S. et al. // Mol. Biol. Cell. – 2005. – **16**, N 11. – P. 5215–5226.
- Sun X., Essalmani R., Seidah N. G., Prat A. // Mol. Cancer. – 2009. – **8**, N 1. – P. 73–81.
- Essalmani R., Zaid A., Marcinkiewicz J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – **105**, N 15. – P. 5750–5755.
- Rousselet E., Benjannet S., Hamelin J. et al. // J. Biol. Chem. – 2011. – **286**, N 4. – P. 2728–2738.
- Seidah N. G., Mowla S. J., Hamelin J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**, N 4. – P. 1321–1326.
- Horton J. D., Cohen J. C., Hobbs H. H. // TRENDS Biochem. Sci. – 2007. – **32**, N 2. – P. 71–77.
- Taylor N. A., Van de Ven W. J. M., Creemers J. W. M. // FASEB J. – 2003. – **17**, N 10. – P. 1215–1227.

36. Mbikay M., Seidah N. G., Chrétien M. // *Biochem. J.* – 2001. – 357, N 2. – P. 329–342.
37. Fricker L. D., McKinzie A. A., Sun J. et al. // *J. Neurosci.* – 2000. – 20, N 2. – P. 639–648.
38. Cameron A., Fortenberry Y., Lindberg I. // *FEBS Lett.* – 2000. – 473, N 2. – P. 135–138.
39. Cornwall G. A., Cameron A., Lindberg I. et al. // *Endocrinology.* – 2003. – 144, N 3. – P. 901–908.
40. Osterwalder T., Kuhnen A., Leiserson W. M. et al. // *J. Neurosci.* – 2004. – 24, N 24. – P. 5482–5491.
41. Richer M. J., Keays C. A., Waterhouse J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – 101, N 29. – P. 10560–10565.
42. Bernot D., Stalin J., Stocker P. et al. // *J. Cell. Sci.* – 2011. – 124, N 8. – P. 1224–1230.
43. Martens G. J. M., Braks J. A. M., Eib D. W. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – 91, N 13. – P. 5784–5787.
44. Opal S. M., Artenstein A. W., Cristofaro P. A. et al. // *Infect. Immun.* – 2005. – 73, N 8. – P. 5101–5105.
45. Dahlen J. R., Jean F., Thomas G. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273, N 4. – P. 1851–1854.
46. Anderson E. D., Thomas L., Hayflick J. S., Thomas G. // *J. Biol. Chem.* – 1993. – 268, N 33. – P. 24887–24891.
47. Jean F., Stella K., Thomas L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – 95, N 13. – P. 7293–7298.
48. Dufour E. K., Denault J.-B., Bissonnette L., Hopkins P. C. R. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 276, N 42. – P. 38971–38979.
49. Nejjarri M., Berthet V., Rigot V. et al. // *Amer. J. Pathol.* – 2004. – 164, N 6. – P. 1925–1933.
50. Lu W., Zhang W., Molloy S. S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1993. – 268, N 20. – P. 14583–14585.
51. Van Rompaey L., Ayoubi T., Van de Ven W., Marynen P. // *Biochem. J.* – 1997. – 326, N 2. – P. 507–514.
52. Komiyama T., Fuller R. S. // *Biochemistry.* – 2000. – 39, N 49. – P. 15156–15165.
53. Liu Z.-x., Fei H., Chi C.-w. // *FEBS Lett.* – 2004. – 556, N 1–3. – P. 116–120.
54. Komiyama T., VanderLugt B., Fugère M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100, N 14. – P. 8205–8210.
55. Arkin M. R., Wells J. A. // *Nat. Rev. Drug Disc.* – 2004. – 3, N 4. – P. 301–317.
56. Boudreault A., Gauthier D., Lazure C. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273, N 47. – P. 31574–31580.
57. Fugère M., Limperis P. C., Beaulieu-Audy V. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277, N 10. – P. 7648–7656.
58. Zhong M., Munzer J. S., Basak A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274, N 48. – P. 33913–33920.
59. Basak A., Ernst B., Brewer D. et al. // *J. Peptide Res.* – 1997. – 49, N 6. – P. 596–603.
60. Villemure M., Fournier A., Gauthier D. et al. // *Biochemistry.* – 2003. – 42, N 32. – P. 9659–9668.
61. Wang S., Han J., Wang Y. et al. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* – 2008. – 40, N 10. – P. 848–854.
62. Basak A., Lotfipour F. // *FEBS Lett.* – 2005. – 579, N 21. – P. 4813–4821.
63. Lotfipour F., Zarrintan M. H., Sherbafi J., Basak A. // *Iranian J. Pharm. Sci.* – 2006. – 2, N 1. – P. 11–22.
64. Basak A., Lazure C. // *Prot. Peptide Lett.* – 1997. – 4, N 3. – P. 187–194.
65. Jean F., Boudreault A., Basak A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – 270, N 33. – P. 19225–19231.
66. Angliker H. // *J. Med. Chem.* – 1995. – 38, N 20. – P. 4014–4018.
67. Basak A., Jean F., Seidah N. G., Lazure C. // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1994. – 44, N 3. – P. 253–261.
68. Basak A., Schmidt C., Ismail A. A. et al. // *Ibid.* – 1995. – 46, N 3–4. – P. 228–237.
69. Becker G. L., Sielaff F., Than M. E. et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – 53, N 3. – P. 1067–1075.
70. Becker G. L., Hards K., Steinmetzer T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – 21, N 16. – P. 4695–4697.
71. Apletalina E., Appel J., Lamango N. S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – 273, N 41. – P. 26589–26595.
72. Cameron A., Appel J., Houghten R. A., Lindberg I. // *Ibid.* – 2000. – 275, N 47. – P. 36741–36749.
73. Kacprzak M. M., Peinado J. R., Than M. E. et al. // *Ibid.* – 2004. – 279, N 35. – P. 36788–36794.
74. Kibler K. V., Miyazato A., Yedavalli V. S. R. K. et al. // *Ibid.* – N 47. – P. 49055–49063.
75. Sarac M. S., Peinado J. R., Leppla S. H., Lindberg I. // *Infect. Immun.* – 2004. – 72, N 1. – P. 602–605.
76. Sarac M. S., Cameron A., Lindberg I. // *Ibid.* – 2002. – 70, N 12. – P. 7136–7139.
77. Basak A., Khatib A.-M., Mohottalage D. et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – 4, N 11. – P. 1–14.
78. Majumdar S., Mohanta B. C., Chowdhury D. R. et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – 17, N 19. – P. 2049–2058.
79. Molloy S. S., Bresnahan P. A., Leppla S. H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – 267, N 23. – P. 16396–16402.

80. *Basak A., Cooper S., Roberge A. G. et al.* // *Biochem. J.* – 1999. – **338**, N 1. – P. 107–113.
81. *Podsiadlo P., Komiyama T., Fuller R. S., Blum O.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 35. – P. 36219–36227.
82. *Jiao G-S., Cregar L., Wang J. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, N 52. – P. 19707–19712.
83. *Komiyama T., Coppola J. M., Larsen M. J. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 23. – P. 15729–15738.
84. *Coppola J. M., Hamilton C. A., Bhojani M. S. et al.* // *Analyt. Biochem.* – 2007. – **364**, N 1. – P. 19–29.
85. *Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Вадзюк О. Б., Гаразд М. М.* // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 2. – С. 15–21.
86. *Kowalska D., Liu J., Appel J. R. et al.* // *Mol. Pharm.* – 2009. – **75**, N 3. – P. 617–625.
87. *Sielaff F., Than M. E., Bevec D. et al.* // *Biorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. doi:10.1016/j.bmcl.2010.11.092.
88. *Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Вадзюк О. Б. и др.* // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 1. – С. 30–37.

Отримано 01.02.2012