

## ОБЗОРЫ

УДК 577.151.042

©Коллектив авторов

### ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ НА ОСНОВЕ КНОТТИНОВ И ПЕПТИДНОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА (SFTI 1)

С.С. Кузнецова<sup>1\*</sup>, Е.Ф. Колесанова<sup>1</sup>, А.В. Таланова<sup>1,2</sup>, А.В. Веселовский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8; тел.: 8(499)246-33-75, 8(926)384-04-99; эл. почта: sofa\_kuznetsova@mail.ru

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 5.

Кноттины из семян растений, в основном семейства тыквенных, и ингибитор трипсина из семян подсолнечника (SFTI 1) являются самыми низкомолекулярными каноническими пептидными ингибиторами сериновых протеаз. Высокая эффективность ингибирования ряда сериновых протеаз, жесткость структуры при возможности ограниченных вариаций аминокислотной последовательности, высокая химическая стабильность, отсутствие токсических свойств, возможность получения химическим синтезом и продукции в системах гетерологической экспрессии делают указанные природные ингибиторы привлекательным шаблоном для дизайна новых соединений – регуляторов активностей терапевтически значимых сериновых протеаз, а разработку таких соединений – перспективным направлением исследований. В данном обзоре рассмотрены особенности структуры этих ингибиторов, их свойства, способы получения и дизайна новых аналогов. Приведены примеры успешного использования природных ингибиторов сериновых протеаз семейства кноттинов и SFTI 1 в качестве шаблонов для дизайна высокоспецифичных ингибиторов ряда протеаз.

**Ключевые слова:** сериновые протеазы, ингибиторы, кноттины, дизайн пептидных ингибиторов протеаз

DOI 10.18097/PBMC20166204353

## ВВЕДЕНИЕ

Сериновые протеазы участвуют в организме человека во многих биохимических процессах, включая переваривание белков пищи, процессинг и катаболизм биологически активных пептидов, реакции врожденного и адаптивного иммунитета, свёртывание крови и его регуляцию, разрушение белков с неправильно сформированной пространственной структурой, дифференцировку клеток и их инвазии, регуляцию активности рецепторов и многих других [1-4]. В нормальных условиях активность протеаз регулируется присутствующими в тканях и биологических жидкостях ингибиторами белковой природы, таких как  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_2$ -макроглобулин, овомукоид, серпины, ингибиторы компонентов и факторов системы комплемента и др. [5-9]. Однако при развитии патологических процессов часто нарушается протеазно-ингибиторный баланс в сторону повышения протеазной активности и может происходить выброс внутриклеточных протеаз в межклеточную жидкость [10]. Наиболее яркие примеры таких нарушений и их последствий – тромбоз кровеносных сосудов в результате усиленной активации тромбина (КФ 3.4.21.5) [11], повышенная активация системы комплемента (значительная часть которой представлена сериновыми протеазами), приводящая к развитию аутоиммунных заболеваний [12], активация матрипразой (КФ 3.4.21.109) инвазии опухолевых клеток в здоровые ткани и запуск этим

ферментом процессов онкогенеза [13,14], развитие анафилаксии в результате выброса из гранул тучных клеток триптазы (КФ 3.4.21.59) и т.д. [15, 16]. Протеазы бактерий и вирусов участвуют в развитии инфекционных процессов и могут определять вирулентность возбудителя. Так, сериновые олигопептидазы и пролилпептидазы трипаносом и лейшманий расщепляют коллаген матрикса, что способствует инвазии паразитов в ткани и их проникновению внутрь клеток, а также катализируют аберрантный гидролиз некоторых биологически активных пептидов организма-хозяина, что приводит к нарушениям гомеостаза [17]. Сериновые протеазы вирусов семейства *Flaviviridae*, к которому относятся возбудители таких инфекций, как клещевой энцефалит, желтая лихорадка, лихорадки денге и Западного Нила, гепатиты С и G, участвуют в процессинге вирусных белков и тем самым способствуют развитию инфекционного процесса [18-20].

Для блокирования патологических процессов, обусловленных увеличением активности сериновых протеаз, необходимы высоко селективные ингибиторы, которые бы не затрагивали активность других протеаз организма. Поскольку строение каталитического центра серин-гистидиновых протеаз (к которым относятся все вышеперечисленные ферменты) одинаково, селективность достигается за счёт подбора структур ингибиторов, обладающих

\* - адресат для переписки

комплементарностью к субстрат-связывающим участкам активных центров ферментов за счёт пространственного соответствия и нековалентных взаимодействий между группами атомов ингибитора и фермента. Для ряда терапевтически значимых сериновых протеаз разработаны селективные или относительно селективные (действующие на группу ферментов со сходной специфичностью) ингибиторы, большинство которых представляет собой низкомолекулярные соединения, получаемые химическим синтезом [16, 21-23]. Однако, такие ингибиторы обладают выраженной токсичностью, могут приводить к возникновению печёночной и почечной недостаточности, проявляют и другие побочные эффекты. В частности, боцепревир и телапревир, ингибиторы протеазы вируса гепатита С (КФ 3.4.21.98), недавно зарегистрированные в качестве лекарственных препаратов, на стадии клинических испытаний вызвали серьёзные побочные эффекты, вплоть до смерти пациентов [23].

В процессе поиска менее токсичных ингибиторов протеаз исследователи обращают внимание на природные пептидные ингибиторы, например, на циклические и квазикацические пептидные ингибиторы из семян растений. Эти ингибиторы состоят из остатков природных аминокислот, которые претерпевают превращения в естественных метаболических путях организма, не вызывают индукции ферментов метаболизма ксенобиотиков и не воздействуют на выделительные системы, что объясняет их меньшую токсичность, а также меньший риск возникновения побочных эффектов по сравнению с низкомолекулярными синтетическими соединениями. Среди других существующих в природе ингибиторов протеаз эти ингибиторы выделяются небольшими размерами (14 аминокислотных остатков (а.о.) у ингибитора трипсина из семян подсолнечника – (sunflower trypsin inhibitor, SFTI 1), и около 30 а.о. – у кноттинов) и жесткой устойчивой структурой, поддерживаемой дисульфидными связями, которая сохраняется при замене аминокислотных остатков, не участвующих во внутримолекулярных взаимодействиях в молекуле ингибитора [24-28]. На основе структур ингибиторов кноттинового типа и SFTI 1 в качестве шаблонов уже разработаны ингибиторы ряда терапевтически значимых протеаз (протеазы 3С вируса ящура [29], триптазы тучных клеток [30, 31], лейкоцитарной эластазы [30], калликреиноподобных протеаз фибробластов [32, 33], матриптазы [34]), обладающие приемлемой селективностью.

Таким образом, шаблоны структур кноттинов и SFTI 1 – весьма перспективная основа для создания новых, более эффективных и безопасных лекарственных средств. Данный обзор посвящен оценке возможностей и путей создания лидерных соединений для таких средств на основе уже имеющихся в этой области результатов. В нём также освещаются фундаментальные исследования, касающиеся этой группы ингибиторов.

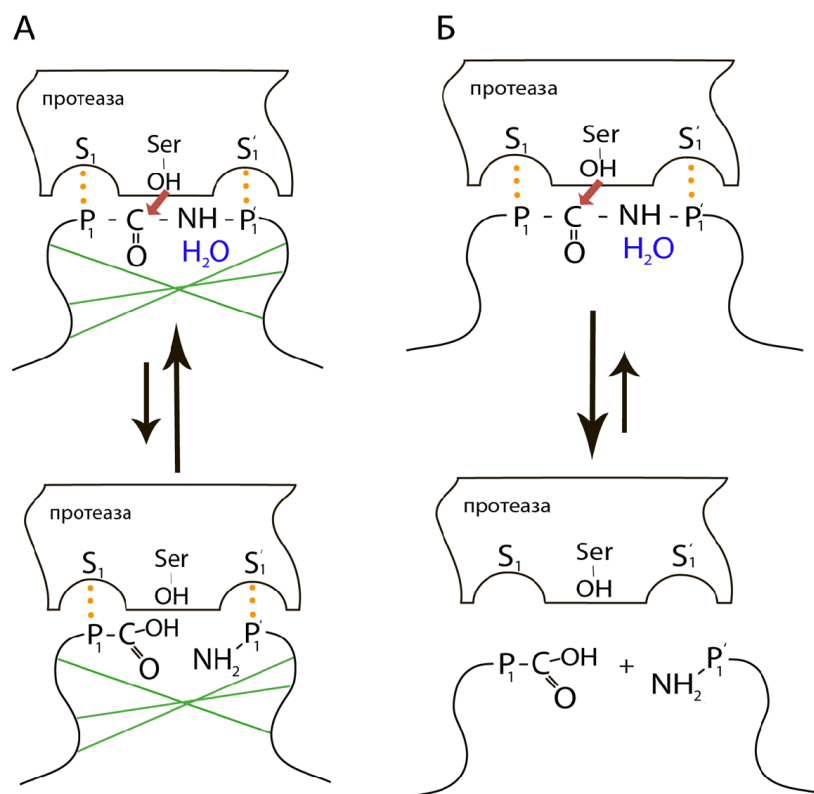
## 1. МЕСТО КНОТТИНОВ И SFTI 1 В СИСТЕМЕ КЛАССИФИКАЦИИ ИНГИБИТОРОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ

Природные ингибиторы сериновых протеаз (ИСП), являющиеся, как правило, олиго- и полипептидами, найдены в живых организмах всех царств – микроорганизмов, растений и животных. По механизму своего действия ингибиторы разделяют на канонические, неканонические, серпины и ингибиторы-”ловушки”; к последним относятся высокомолекулярные ингибиторы – сывороточные макроглобулины [9].

Кноттины и SFTI 1 относятся к группе канонических ингибиторов, куда входят и другие природные ингибиторы растительного происхождения (в частности, широко известный ингибитор трипсина из бобов сои), а также ряд ингибиторов животного происхождения (например, бычий панкреатический ингибитор трипсина, эглин, овомукоид, апротинин и другие) [35]. Канонические ингибиторы имеют выдающуюся во внешнее пространство петлю, сходную по структуре с субстратом соответствующей сериновой протеиназы и комплементарную субстрат-связывающему участку фермента (подробнее – см. разд. 2). Эта петля, называемая ингибиторной, прочно связывается с активным центром фермента. Гидролиз образовавшегося комплекса в условиях естественной активности фермента протекает значительно медленнее гидролиза субстрата, при этом ингибитор в силу жесткости своей пространственной структуры не претерпевает изменений конформации, свойственных продукту, и гидролизованная форма ингибитора очень медленно высвобождается из комплекса фермент-продукт [35]. Этот механизм ингибирования сериновых протеаз был предложен и исследован М. Ласковским-мл. и часто называется механизмом Ласковского [36] (рис. 1).

Канонические ИСП подразделяются на семейства, отличающиеся друг от друга аминокислотными последовательностями, числом и локализацией дисульфидных связей, пространственной структурой и расположением в аминокислотной последовательности ингибиторной петли [35, 36]. Исторически сложившаяся система классификации канонических ингибиторов пептидаз была основана на отнесении каждого нового ингибитора к одному из семейств, названия которым были даны по фамилии учёного, описавшего первого выделенного представителя этого семейства, либо по названию семейства или рода растений, из вида которого был впервые выделен представитель семейства. В настоящее время, согласно базе данных MEROPS (<https://merops.sanger.ac.uk/>), существуют около 90 семейств ИСП, из них к каноническим ингибиторам относятся не менее 17 семейств. Среди них – семейства Боумана-Бирк, Куница, Казал-типа, Картофельные I (Potato I), Картофельные II (Potato II), Тыквенные (Squash), Зерновые (Cereal), Горчичные (Mustard) и другие.

Интерес к ИСП в наибольшей степени связан с возможностью использования их как терапевтических



**Рисунок 1.** Схема взаимодействия канонического ингибитора типа кноттина (А) и субстрата (Б) с сериновой протеазой. Зелёными линиями обозначены S-S-связи. P1 и P1' - аминокислотные остатки субстрата или ингибитора, образующие расщепляемую связь.

средств, способных лечить и предупреждать патологии, вызванные повышенной активностью этих ферментов [37]. Так, 58-членный пептид апротинин, поливалентный ингибитор протеаз из лёгких и поджелудочной железы крупного рогатого скота, известен как фармацевтический препарат под торговыми названиями “Контрикал”, “Трасилол”, “Гордокс”; он использовался в клинике при профилактике и лечении острого панкреатита, панкреонекроза, кровотечений, сопряжённых с гиперфибринолизом, шока и жировой эмболии [38]. В настоящее время из-за возможности развития аллергических осложнений вплоть до анафилактического шока и вероятности внесения в организм инфекционного начала, характерной для всех белковых препаратов, выделяемых из тканей животных, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (US FDA Food and Drug Administration) рекомендует его к применению с большой осторожностью, а в США этот препарат не выпускается [39].

Основными критериями при выборе ингибитора для создания лекарственного средства являются достаточная специфичность в отношении конкретных протеаз, эффективность ингибирования, выражаемая величиной константы ингибирования  $K_i$  или равновесной константы ассоциации  $K_a$ , химическая и протеолитическая стабильность, низкая токсичность, быстрое выведение из организма, возможность массового производства. С этой точки

зрения весьма перспективными в отношении разработки лекарственных препаратов для лечения многих заболеваний являются канонические ингибиторы трипсина и подобных протеаз, относящиеся к структурному типу кноттинов (knottins, inhibitor cystine knots), и небольшой циклический пептид SFTI 1, также являющийся мощным ингибитором трипсина. От других природных ингибиторов протеаз их отличают небольшой размер, высокая эффективность ингибирования, устойчивость и особенности структуры, позволяющие им служить уникальным шаблоном для создания селективных ингибиторов сериновых (и не только) протеаз [27, 37, 40-43].

## 2. СТРУКТУРЫ КНОТТИНОВ И ИНГИБИТОРА ИЗ СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА

Кноттины – небольшие белки (обычно около 30 аминокислотных остатков), имеющие не менее трёх дисульфидных связей, расположенных в форме характерного “узла” (от английского knot – узел). Такой узел образуется в результате того, что один из S-S-мостиков (Cys III - Cys VI) пересекает кольцо, образованное двумя другими (Cys I - Cys IV и Cys II - Cys V). Благодаря такой структуре небольшие кноттины обладают высокой протеолитической, термической и химической стабильностью [44-46].

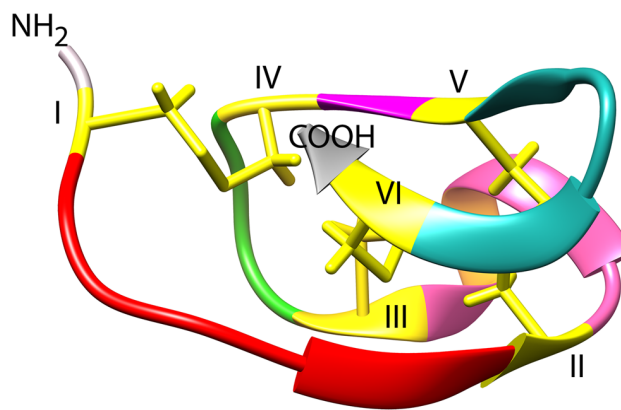
Характерным структурным мотивом кноттинов являются также три антипараллельных бета-тяжа, удерживаемые водородными связями и соединённые

короткими петлями. В настоящее время известно более 30 семейств природных кноттинов, выделенных из различных источников, причём далеко не все из них являются ингибиторами протеаз. Среди этих соединений имеются такие, которые обладают инсектицидной, цитотоксической, противомикробной, обезболивающей, противовирусной, гормоноподобной, мембранопроникающей активностями, не связанными с ингибированием протеаз [37]. Современные данные о первичной и пространственной структуре, свойствах, исследовании, функциях и применении кноттинов собраны в базе данных KNOTTIN (<http://knottin.cbs.cnrs.fr>) [37].

Ингибиторы сериновых протеаз составляют три семейства кноттинов. Впервые такие ингибиторы были выделены из семян растений семейства тыквенных более 30 лет назад; показано их ингибирующее действие на каталитическую активность трипсина и подобных ему по специфичности сериновых протеаз с  $K_i$   $10^{-6}$  М -  $10^{-11}$  М (обычно  $K_i$  в отношении трипсина составляет  $10^{-8}$  М -  $10^{-10}$  М [48-54]). Предполагается, что растения используют ингибиторы протеаз для защиты от протеолитических ферментов насекомых и фитопатогенных микроорганизмов, а также для регуляции распада запасных белков семян при прорастании [55]. Почти все природные кноттины представлены пептидами с незамкнутой в цикл цепью аминокислотных остатков. Исключениями являются ингибиторы трипсина из семян момордики кохинхинской (*Momordica cochinchinensis*) MCoTI-I и MCoTI-II, циклические пептиды [56], относимые к группе циклотидов [41, 57] (<http://www.cyclotide.com>).

Представители всех трёх семейств кноттинов-ИСП являются каноническими ингибиторами. К первому семейству относятся пептиды, выделенные из растений семейства тыквенных и их синтетические аналоги. Такие природные кноттины-ИСП были выделены практически из всех широко доступных видов растений семейства тыквенных – арбуза, дыни, огурца, разновидностей кабачка, различных видов тыкв, чайота, момордики, люффы, лагенарии (библиографические ссылки приведены в базе данных <http://knottin.cbs.cnrs.fr/>). Большинство работ посвящено представителям именно этого семейства, для многих из них определена пространственная структура.

Наиболее известными и активно используемыми в качестве шаблонов для дизайна аналогов являются такие кноттины-ИСП первого семейства, как ингибиторы трипсина из семян бешеного огурца (*Ecballium elaterium*), EeTI II [58] и тыквы гигантской (*Cucurbita maxima*), CMTI I [49], а также циклический кноттин MCoTI-II (*Momordica cochinchinensis*) [56]. Структурной особенностью первого семейства кноттинов-ИСП из тыквенных растений является расположение ингибиторной петли между остатками CysI и CysII (рис. 2). Петля имеет структуру – P[R,K][W,Y,L][M,K,Q][E,Q,R,P,K]-. Второй и третий а.о. этой петли, то есть аргинин (лизин) и изолейцин, образуют расщепляемую ферментом связь ( $-P_1-P_1'$ ). Получено значительное количество аналогов



**Рисунок 2.** Схематичное изображение пространственной структуры кноттина на примере EeTI II. Антипараллельные β-тяжи обозначены широкими стрелками. Остатки цистеинов и S-S-связи выделены жёлтым цветом, ингибиторная петля – красным цветом (адаптировано из [47]).

этих соединений, отличающихся от природных представителей структурой ингибиторной петли и, соответственно, специфичностью по отношению к различным сериновым протеазам (см. раздел 4).

Представители кноттинов-ИСП второго семейства выделены из шпината *Spinacia oleracea* (SOTI I-III) и цветочного растения “ночная красавица” *Mirabilis jalapa* (MJTI I-II) [59]. Для них характерно расположение ингибиторной петли между остатками CysV и CysVI; сама же петля имеет структуру – VPHN[I,R][L,RIFV]-. Эти соединения также связываются с трипсином и ингибируют катализируемый им гидролиз субстратов ( $K_a$  для MJTI I и для SOTI I составляют  $5,37 \times 10^{-7}$  М и  $1,85 \times 10^{-7}$  М соответственно) [59]. Представители третьего семейства кноттинов-ИСП стали известны относительно недавно. Единственный выделенный в виде пептидного препарата ингибитор из опунции (*Opuntia streptacantha* Lemaire) был получен в 2009 году [60]. Четыре потенциальных ингибитора из плауна (*Selaginella moellendorffii*), предсказанные при анализе геномов этого рода растений, представляют собой довольно длинные белки (более 100 а.о.) по сравнению с другими кноттинами [61]; не исключено, что эти предсказанные белки являются предшественниками кноттинов-ИСП.

Большинство природных кноттинов являются ингибиторами трипсина и подобных ему по специфичности ферментов. Только из семян момордики (*Momordica charantia*) были получены кноттины-ингибиторы эластазы, содержащие в ингибиторной петле остаток лейцина вместо аргинина и не действующие на трипсин [62].

В молекулах кноттинов структурно консервативное ядро, сформированное дисульфидными связями и придающее молекулам высокую стабильность и жёсткость, сочетается с весьма вариабельными петлями на его поверхности, отвечающими за специфическую активность соединений. Структура “цистеинового узла”, характерная для всех кноттинов, оказалась важнее для стабильности и жёсткости молекулы, чем замыкание ее в цикл “голова к хвосту”,

наблюдаемое у циклотидов [63]. Такая структура удерживает переменные петли, в числе которых и ингибиторная петля, на поверхности молекулы кноттина, независимо от гидрофобности составляющих их аминокислотных остатков [42, 46]. Варьируя аминокислотный состав поверхностных петель кноттинов, можно направленно получать стабильные соединения с различной активностью и специфичностью для терапевтических и диагностических целей (см. раздел 4).

Свойствами, похожими на свойства кноттинов, обладает и небольшая молекула недавно открытого низкомолекулярного ингибитора трипсина из семян подсолнечника, SFTI 1, также чрезвычайно перспективная с точки зрения моделирования молекул с новой биологической активностью. Данный пептид был впервые выделен из семян подсолнечника в 1999 году как высокоэффективный ингибитор трипсина с  $K_i$ , равной  $10^{-10}$  М [64]. Молекула этого ингибитора, самого маленького из известных природных ингибиторов протеаз, состоит из 14 а.о. и имеет жёсткую стабильную циклическую структуру. В молекуле два цикла: основная пептидная цепь замкнута в цикл, в котором два остатка цистеина (Cys3 и Cys11) образуют S-S-связь (рис. 3). Жёсткая пространственная структура молекулы SFTI 1 поддерживается внутримолекулярными водородными связями: два антипараллельных бета-тяжа, соединённых друг с другом поворотом, образующимся вследствие *cis*-конформации пептидной связи между Ile7 и Pro8, формируют бета-шипильку.

Внутри пептидной цепи молекулы SFTI 1 выделяют два основных функциональных элемента: ингибиторную петлю и вторичную петлю. Ингибиторная петля, Thr4-Ile10, содержит сайт возможного расщепления трипсином Lys5-Ser6. Однако большая часть молекул ингибитора остаётся негидролизованной: отношение количества нативного ингибитора к количеству гидролизованного ингибитора составляет 9:1 [65]. Вторичная петля, пентапептидный фрагмент, не участвует прямо во взаимодействии с протеазой, но стабилизирует структуру всего пептида за счёт формирования водородных связей с остатками ингибиторной петли.

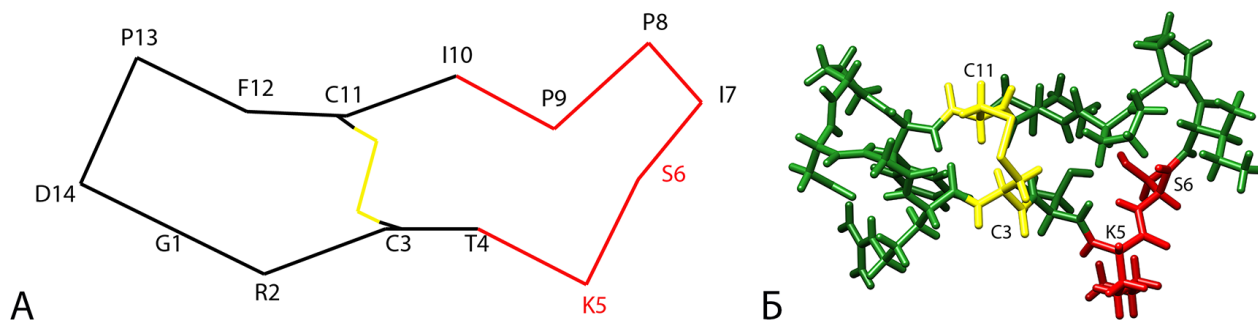
Сходство структуры SFTI 1 со структурным мотивом ингибиторной петли ИСП семейства Боумана-Бирк [66] позволило отнести SFTI 1

к данному семейству несмотря на его малый размер [24]. SFTI 1 является самым маленьким ингибитором семейства Боумана-Бирк, представленного в основном более крупными пептидами (в среднем 60-90 аминокислот) с большим количеством дисульфидных связей (обычно семь) [67, 68].

Проведено исследование влияния обеих циклизаций SFTI 1 на ингибиторную активность и стабильность молекулы [69]. Константа ассоциации варианта SFTI 1, не циклизованного по С- и N-концам (B1), практически не отличалась от таковой природного ингибитора, для варианта без дисульфидного мостика (B2, с заменой цистеинов на  $\alpha$ -аминомасляную кислоту) она была в 2,4 раза ниже. Также было отмечено большое сходство структур B1 и природного SFTI 1, определяемых методом ЯМР [70]. Протеолитическая стабильность B2 оказалась значительно ниже, чем у B1 и природного SFTI 1. Таким образом, для молекулы SFTI 1, как и для молекул циклических кноттинов (см. выше), стабильность и структурная жесткость молекулы определяются в большей степени наличием дисульфидной связи, чем амидной связи между N- и С-концами.

Природный SFTI 1, помимо бычьего панкреатического бета-трипсина, ингибирует также катепсин G ( $K_i=1,5 \times 10^{-10}$  М [64]) и матриптазу человека ( $K_i=9,25 \times 10^{-10}$  М [71]). Также отмечено слабое ингибирование бычьего панкреатического химотрипсина ( $K_i=7,4 \times 10^{-6}$  М [64]), бычьего тромбина ( $K_i=1,4 \times 10^{-4}$  М [64], а по данным работы [71] –  $5 \times 10^{-6}$  М), панкреатической эластазы свиньи ( $K_i=1 \times 10^{-4}$  М [64]) и активатора плазминогена урокиназного типа человека ( $K_i=5 \times 10^{-4}$  М [71]).

Открытие мощного природного ингибитора трипсина SFTI 1 длиной всего 14 а.о. [64] стало началом нового этапа исследований и работ по структурному дизайну. Эффективность, стабильность и относительная простота синтеза делают SFTI 1 (и его моноциклический аналог, циклизованный только дисульфидной связью) идеальными моделями для исследования взаимодействия протеаз с ингибитором в целом и для создания новых моно- и бифункциональных ингибиторов протеаз и других терапевтически значимых веществ на данной структурной основе (см. разд. 4).



**Рисунок 3.** Последовательность (А) и модель пространственной структуры (Б) ингибитора трипсина из семян подсолнечника (SFTI 1). Красным цветом обозначена ингибиторная петля, жёлтым – S-S-мостик (адаптировано из [84]).



### 3. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КНОТТИНОВ И SFTI 1

Способы получения кноттинов-ИСП и SFTI 1 и их аналогов включают: 1) выделение из семян растений и очистку методами экстракции и хроматографии; 2) гетерологическую экспрессию в бактериальных клетках в виде химер с другими белками с последующим отщеплением и очисткой; 3) химический синтез.

#### 3.1. Выделение из природных источников и последующая очистка

Высокоочищенные препараты природных кноттинов-ИСП из семян растений получают путём экстракции и, как правило, нескольких последовательных хроматографических стадий. Наиболее богатым источником этих соединений служат семена растений семейства тыквенных, откуда и был выделен первый ИСП со структурой кноттина (из семян тыквы гигантской, *Cucurbita maxima*, в 1980 году [48]). Извлечение ингибиторов из семян включало обработку семян ацетоном и экстракцию водными буферными растворами или органическими растворителями, поскольку кноттины очень стабильны и хорошо переносят весьма жёсткие методы очистки. Далее удаляли часть балластных белков осаждением сульфатом аммония и проводили очистку с использованием различных видов хроматографии: аффинной хроматографии на иммобилизованном трипсине или ангидротрипсине, классической ионообменной хроматографии низкого давления, гель-фильтрации, ВЭЖХ на обращённой фазе [48, 50-54, 58, 72-79]. В итоге из 1 кг семян получали от нескольких до 100 мг кноттинов-ИСП. Выход по активности приводится лишь в нескольких статьях. Так, для тыквы гигантской (*Cucurbita maxima*) и цуккини (*Cucurbita pepo* var. *Giromontia*) он составил, соответственно, 23,5% и 34,6% [50].

Наиболее богатым источником кноттина являются семена тыквы фиголистной (*Cucurbita ficifolia*): из 1 кг семян этого растения были получены очищенные препараты двух ингибиторов общим количеством 110 мг [74]. Аминокислотный состав обоих ингибиторов идентичен таковому пептида СМТИ I из тыквы гигантской (*Cucurbita maxima*), одного из наиболее хорошо изученных представителей кноттинов-ИСП [74].

Из природных источников часто выделяют несколько форм кноттинов-ИСП. Эти формы либо представляют собой по-разному процессированные продукты одного и того же предшественника (например, ингибиторы трипсина SETI II и SETI V из чайота и их удлинённые с N-конца на 1-3 а.о. не до конца процессированные формы [79]), либо аналоги с различающимися в середине цепи аминокислотными последовательностями, например, ингибиторы из циклантеры съедобной (*Cyclanthera pedata*) [75] и люффы цилиндрической (*Luffa cylindrica*) [80-82].

Процедура выделения и очистки SFTI 1 из природного источника включала обезжиривание

семян, экстракцию полученной муки водой, аффинную хроматографию на трипсин-сефарозе 4В и ВЭЖХ на обращённой фазе [64]. В результате был получен препарат ингибитора, содержащий в качестве примеси около 10% формы, расщеплённой по связи Arg5-Ser6 иммобилизованной на сефарозе трипсином. В дальнейшем SFTI 1 и его аналоги получали путём химического синтеза либо – реже – гетерологической экспрессией.

#### 3.2. Метод гетерологической экспрессии

Поскольку кноттины и SFTI 1 синтезируются в растениях в виде белков-предшественников, из которых они образуются в результате ограниченного протеолиза [83-85], разработка и применение способов получения кноттинов-ИСП с помощью метода гетерологической экспрессии представляются вполне логичными. Первые эксперименты по получению кноттина-ИСП СМТИ-I из семян тыквы гигантской и его мутантных форм, а также ингибитор трипсина из семян трихозанта методом гетерологической экспрессии в *E. coli* проводились с использованием экспрессионных систем, позволяющих получать химерные белки, содержащие кноттины, в тельцах включения [86, 87]. Кноттины отщепляли от этих белков обработкой бромцианом с последующим фолдингом и формированием сети S-S-связей [86]. Продукция кноттинов-ИСП в виде слитых с более крупными белками-носителями химерных молекул повышает устойчивость кноттинов к гидролизу внутриклеточными протеазами микроорганизма-продуцента [88]. Наиболее предпочтительна продукция кноттинов в виде химер с такими белками, которые транспортируются в периплазму *E. coli* или секретируются в культуральную среду. Это обеспечивает получение белков в растворимой форме и правильное формирование S-S-мостиков в кноттинах, которого невозможно достичь при продукции химерных белков в виде телец включения [86, 87]. Таким белком является барназа (РНКаза из *Bacillus amyloliquefaciens*), с помощью которой методом гетерологической экспрессии были получены растворимые формы кноттинов-ИСП и с правильно сформированными S-S-мостиками без рефолдинга [44, 88, 89]. Описано также получение библиотек, представляющих собой модифицированные аналоги EeTI, слитые с гемагглютинином вируса гриппа и далее с капсидным белком рIII фага Fd, и аналоги EeTI и MCoTI-II, слитые с поверхностным агглютинином Aga2p дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [34, 90, 91].

Дополнительной сложностью продукции циклических кноттинов-ИСП, MCoTI и его аналогов, методом гетерологической экспрессии является циклизация главной цепи пептида. При получении этих циклических кноттинов используются общие принципы гетерологической экспрессии циклических белков, разработанные для различных циклотидов [92]. Для циклизации пептидной цепи разработаны и используются три подхода: 1) лигирование

продуцируемых белков с формированием цикла через образование тиоэфиров и последующий N→C ацильный перенос с использованием модифицированных интенинов; 2) транс-сплайсинг белков (лигирование N- и C-концов пептида путём транс-этерификации, катализируемой интенином, с последующим автовыщеплением интенина) [43]; 3) транспептидация с участием сортаз и протеаз. Эти подходы подробно рассмотрены в ряде обзоров [43, 85, 93]. Первый подход был использован для получения гетерологической экспрессией в *E. coli* SFTI 1 и библиотеки его аналогов для аланинового скрининга [94]. В работе [95] аналоги SFTI 1 получали в виде пептида, слитого с тиоредоксином. Продуцируемые в составе слитого белка аналоги SFTI 1 содержали три остатка Cys, один, из числа присутствующих в составе природного ингибитора, находился на N-конце целевого пептида, а дополнительный, третий, остаток Cys на C-конце пептида после отщепления превращали в тиоэфир с последующей циклизацией (нативное химическое лигирование) путём реакции с 2-меркаптоэтансульфокислотой. В получаемых таким способом аналогах SFTI 1 для улучшения циклизации заменяли предшествующий дополнительному C-концевому остатку Cys остаток Ile, характерный для природного SFTI 1, на Gly [95]. В работе [89] для циклизации рекомбинантного аналога MCoTI-II был использован химический подход с помощью окисления остатка гомосерина (образовавшегося после расщепления бромцианом по образованной остатком метионина пептидной связи), образования гидрогена и замыкания имино-содержащего цикла.

Гетерологическая экспрессия позволяет получать библиотеки аналогов кноттинов и SFTI 1, содержащие большой набор вариаций остатков протеиногенных аминокислот. Однако применение метода гетерологической экспрессии для масштабного получения индивидуальных кноттинов и SFTI 1 ограничено относительно малой доступностью ферментов, расщепляющих химерные полипептиды и катализирующих циклизацию циклических кноттинов и SFTI 1, а также непроизводительными затратами на биосинтез белков-носителей, значительно превышающих размеры продуцируемых ингибиторов [89].

### 3.3. Химический синтез

Кноттины-ИСП и SFTI 1, а также их аналоги, имея длину не более 35 а.о., могут быть получены путём химического синтеза. Преимуществами этого способа являются: 1) возможность включения в состав молекул ингибиторов остатков небелковых и неприродных аминокислот (например, норлейцина [96], α-гидроксиметил-аминокислот [97], β- и γ-аминокислот и N-замещённых производных β-аланина [98], α-N-замещённых производных глицина [99-102] и других [100, 103]); 2) возможность модификации S-S-мостиков вплоть до замены их иными связующими группами [102, 104-107]; 3) получение ациклических форм SFTI 1 и MCoTI-II

[69, 106, 108, 109]; 4) менее сложная, чем в случае выделения из биологического материала, процедура очистки (включающая, как правило, только две стадии ВЭЖХ – одну после синтеза пептидной цепи ингибитора, вторую – после формирования дисульфидных связей и/или циклизации), 5) возможность наработки больших количеств индивидуальных соединений.

Первые эксперименты по синтезу указанных пептидных ингибиторов (как природных, так и их аналогов) были проведены практически сразу после их выделения из растений и исследования их свойств [24, 59, 96].

Обычно для получения указанных ингибиторов синтетическим путём применяется твёрдофазный пептидный синтез. Этот метод в большинстве случаев является рутинным и часто выполняемым в автоматическом режиме [110]. Однако ряд особенностей структуры кноттинов и SFTI 1 требует нетривиальных подходов к их синтезу.

SFTI 1 хоть и является довольно коротким пептидом (14 а.о.), но имеет циклическую структуру, причем цикл замыкается амидной связью. Циклизация молекулы SFTI 1 представляет основную сложность в синтезе самого ингибитора и его аналогов. Описаны следующие способы формирования циклической структуры SFTI 1: 1) замыкание цикла путём образования амидной связи между N- и C-концевыми аминокислотными остатками синтезированного линейного пептида после отщепления последнего от твердофазного носителя и 2) циклизация путём нативного химического лигирования. В первом случае синтез пептидов проводят обычно с использованием 9-флуоренил(метоксикарбонил)(Fmoc)-защищённых производных аминокислот на носителе, образующем лабильную связь с C-концевым аминокислотным остатком, и отщепляют от носителя линейный пептид с полностью защищёнными боковыми функциональными группами. Циклизацию путём формирования пептидной связи между α-амино- и α-карбокси-группами соответственно N- и C-концевых остатков линейного пептида обычно проводят с использованием гексафторфосфатов 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло-[4,5-*b*]пиридин-3-оксида (HATU) либо бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония (PyBOP), одних из самых эффективных активаторов карбокси-групп, применяемых в пептидном синтезе [24, 32, 33, 69]. Но наиболее перспективным подходом является образование цикла за счёт нативного химического лигирования, так как эта реакция протекает в мягких условиях [30, 108, 111-113] (рис. 4).

Описаны синтезы SFTI 1 и его аналогов исходя из *трет*-бутил(оксикарбонил)(Boc)-замещённых аминокислот на специальном носителе для синтеза тиоэфиров пептидов с последующей циклизацией путём нативного химического лигирования [108, 111, 113]. Оба указанных способа циклизации применимы для синтеза и SFTI 1, и кноттинов с циклизованной пептидной цепью, а также аналогов этих соединений. Выбор конкретного способа определяется удобством синтеза

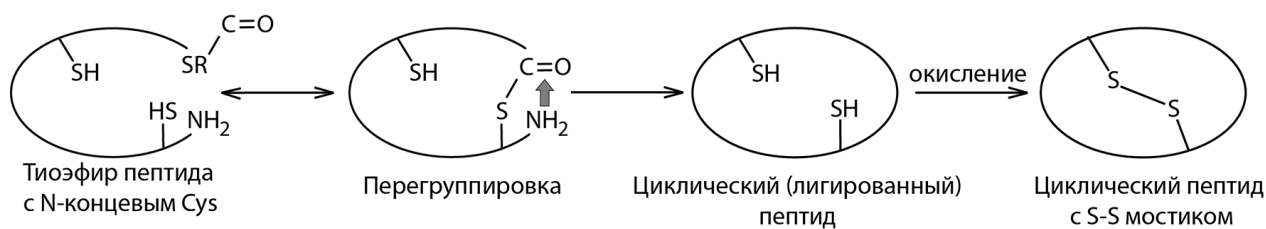


Рисунок 4. Схема химической циклизации SFTI 1 методом нативного химического лигирования (адаптировано из [113]).

конкретного соединения с учётом выхода продукта, его чистоты и отсутствия рацемизации сшиваемых аминокислотных остатков [108]. В настоящее время разработаны методы получения тиоэфиров пептидов, синтезируемых исходя из Fmoc-защищённых аминокислот [114]. Один из таких способов (с применением твердофазного носителя с сульфаниламидометильной привитой группой) описан применительно к синтезу аналогов MCoTI-II [30]. Другой способ, приведённый в недавних публикациях в применении к синтезу SFTI 1 и его аналогов, заключался в получении С-концевого тиоэфира пептида путём взаимодействия С-концевого остатка цистеина с меркаптоэтансульфонокислотой с последующим N→S переносом и практически одновременной циклизацией по типу нативного химического лигирования [95, 113].

В ходе наращивания пептидной цепи путём твердофазного синтеза кноттинов, SFTI 1 и их аналогов отмечено затруднённое присоединение Fmoc-производных аминокислот из-за межмолекулярной агрегации синтезируемых пептидных цепей [109]. Эту проблему решали использованием смеси растворителей, улучшающих сольюбилизацию растущих пептидных цепей ("magic mix") и специальных сильно набухающих твердофазных носителей [59, 98-100, 102-105, 109, 115], применением более эффективных активаторов карбокси-компонентов, например, HATU вместо стандартно используемого HBTU (гексафторфосфата 1-[бис(диметиламино)метилена]-1H-бензотриазол-3-оксида) [59, 98-100, 102-105, 115], использованием Fmoc-псевдопролин-дипептидов в качестве карбокси-компонентов [109], проведением синтеза в СВЧ-реакторах [34]. Решению данной проблемы может помочь и применение более эффективного, чем пиперидин, катализатора удаления Fmoc-групп диазабицикло-[5,4,0]ундец-7-ена (DBU) [116].

Если в случае SFTI 1 циклизация пептидной цепи служит предпосылкой достаточно быстрого и точного формирования единственного S-S-мостика [24], то в случае ациклических кноттинов правильное формирование всех трёх S-S-мостиков в ходе химического синтеза часто представляет собой серьёзную проблему. Эта проблема может решаться подбором защитных групп для каждой пары остатков цистеина, которые в молекуле образуют между собой дисульфидные связи. Последовательно удаляя защитные группы с каждой пары остатков цистеина и тут же формируя S-S-мостики, можно добиться правильного их местоположения в синтетических

пептидах [110]. Однако при синтезе MCoTI-II с использованием нативного химического лигирования такой способ неприемлем из-за несовместимости применяемых реагентов и некоторых SH-защитающих групп, и снижения выхода циклизированного пептида из-за тиол-дисульфидного обмена между N-концевым остатком цистеина и свободными SH-группами в середине пептидной цепи [109]. Другой способ правильного формирования S-S-мостиков заключается в подборе условий (растворитель, pH, температура, присутствие реагентов, разрушающих водородные связи – мочевины и гуанидин-хлорида, присутствие определенных концентраций окислителей, например, окисленного глутатиона) для осуществления правильного фолдинга кноттинов и – в результате – самопроизвольного формирования правильно расположенных S-S-мостиков [34, 108, 117, 118]. Показано, что правильное формирование S-S-мостиков в таких синтетических пептидах, как EeTI и некоторые его аналоги, а также циклический MCoTI-II, проходит достаточно гладко [29, 30, 96, 111].

С помощью химического синтеза были получены высокоочищенные препараты природных кноттинов-ИСП и SFTI 1 и их аналогов в количествах от нескольких миллиграммов и более [24, 29, 111, 118]. Такие количества позволяют не только провести исследования пространственной структуры данных соединений и их ингибиторной активности *in vitro*, но и начать изучение их терапевтического потенциала, а также разрабатывать иные способы практического применения этих ингибиторов. Например, на основе SFTI 1 и его аналогов были получены селективные аффинные сорбенты для выделения протеолитических ферментов из различных биопрепаратов (панкреатина, яда змей и других) [118]. В то же время множественный параллельный синтез пептидов в микромасштабе позволил получить библиотеку аналогов ациклического SFTI 1, связанных с бумажной подложкой и использованных для исследования позиционной специфичности трипсина, эластазы и протеиназы K [119].

#### 4. ДИЗАЙН НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ НА ОСНОВЕ СТРУКТУР КНОТТИНОВ И SFTI 1

Наличие природных вариантов ИСП кноттинового типа с различающимися первичными структурами и с сопоставимыми по специфичности и эффективности ингибиторными активностями



свидетельствует о возможности искусственного варьирования первичных структур этих ингибиторов в пределах, обеспечивающих сохранность стабильной пространственной структуры их молекул и требуемую ингибиторную активность. Такой же вывод можно сделать и о возможности варьирования структуры SFTI 1, поскольку он является аналогом ингибиторной петли ингибиторов семейства Боумана-Бирк, также присутствующей в природных пептидах в виде ряда вариаций с сопоставимым средством к активным центрам сериновых протеаз.

В настоящий момент работа по созданию молекул с заданными биологическими свойствами на основе структур кноттинов и SFTI 1 ведется достаточно активно, и создано уже немало таких структур, о чём свидетельствуют многочисленные статьи и обзоры ([27, 31, 32, 34, 85, 120], см. далее).

Рассмотрим главные принципы структурного дизайна на основе кноттинов и SFTI 1. Остаток P1, примыкающий к расщепляемой протеазой связи со стороны N-конца (см. рис. 1), определяет первичную специфичность ингибирования; на его долю приходится до 50% контактов с ферментом-мишенью [121, 122]. Остатки аргинина и лизина в этой позиции определяют специфичность в отношении трипсина; фенилаланина, тирозина и лейцина – химотрипсина; аланина – эластазы. Остаток P1' в принципе может быть любым, но в кноттинах в этом положении никогда не присутствует Pro [35]. Поскольку конформационные изменения фермента и ингибитора в ходе их взаимодействия минимальны (классический механизм “ключ-замок”) [35, 36], ингибиторная петля оптимального ингибитора конкретного фермента должна быть структурно комплементарна субстрат-связывающему участку фермента, то есть соответствовать структуре оптимального субстрата. Это особенно важно учитывать при разработке на основе кноттинов и SFTI 1 ингибиторов ферментов с выраженной вторичной и третичной специфичностью (например, тромбина и других протеаз свертывающей системы крови, калликреиноподобных протеаз, протеаз системы комплемента и других, специфично распознающих удаленные от расщепляемой связи аминокислотные остатки и/или селективно расщепляющие строго определенные пептидные связи в своих нативных белках-субстратах). Замены удаленных от ингибиторной петли а.о. могут влиять и на специфичность ингибиторов, и на стабильность их структур [101].

Таким образом, при дизайне новых ингибиторов на основе кноттинов и SFTI 1 необходимо учитывать два основных фактора: 1) соответствие ингибиторной петли молекулы ингибитора субстрат-связывающему участку молекулы фермента; 2) сохранение характерной для природных кноттинов и SFTI 1 пространственной структуры, обеспечивающей стабильность молекулы конструируемого ингибитора. Дополнительно учитываются гидрофобность конструируемого пептида (высокогидрофобный пептид будет плохо растворяться и обладать низкой биодоступностью) и сложность синтеза. Так, при создании ингибиторов калликреина 5

человека на основе SFTI 1 в качестве шаблона остаток Ile заменили на остаток Gly только потому, что Ile препятствует гладкому протеканию циклизации по типу нативного химического лигирования [95].

Для дизайна ингибиторов используют два подхода – направленный и комбинаторный. Первым примером реализации направленного подхода были замены остатков Arg и Lys в позициях P1 кноттинов-ИСП и SFTI 1, соответственно, на остатки Leu или Phe, что превратило специфичные ингибиторы трипсина в специфичные ингибиторы эластазы [62], химотрипсина и катепсина G [102, 103], причём в случае кноттина такой направленный подход осуществила сама природа [62]. Однако намного чаще имеет место полное или частичное сходство первичной субстратной специфичности протеаз (как, например, у трипсина, протеаз свертывающей системы крови и калликреинов) при наличии выраженной вторичной и даже третичной специфичности у протеазы, для которой создается ингибитор. В этом случае направленный подход подразумевает обычно компьютерное моделирование структуры ингибитора с целью обеспечения его наилучшего соответствия субстрат-связывающему “карману” протеазы. Такое моделирование методом молекулярного докинга молекулы потенциального ингибитора в активный центр протеазы и анализа молекулярной динамики образования данного комплекса возможно, если известна пространственная структура целевой протеазы. При дизайне аналогов SFTI 1 в качестве шаблона используется обычно сам SFTI 1, а для дизайна кноттинов-ИСП из базы данных KNOTTIN выбирают представителя с наиболее хорошо исследованной либо наиболее соответствующей субстрат-связывающему участку фермента (по результатам предварительного моделирования) структурой. Например, для разработки специфичных ингибиторов матрипазы 1 (трансмембранной сериновой протеазы, продуцируемой опухолевыми клетками и участвующей в процессе их инвазии) человека в качестве наиболее подходящего шаблона использовался циклический кноттин MCoTI II [34], а при разработке ингибитора  $\beta$ -трипазы тучных клеток человека в качестве шаблона для моделирования был выбран гибрид MCoTI II и ациклического кноттина EeTI II [31]. Пространственные структуры многих кноттинов-ИСП семейства 1 определены методом ЯМР или рентгеноструктурного анализа (см. базу данных KNOTTIN и Protein DataBank (PDB) [123]); известны также пространственные структуры комплексов четырёх природных кноттинов этого семейства (CMTI I, CPTI II, MCoTI I, EeTI II) с трипсинами различной видовой принадлежности [124-127] и одного синтетического кноттина – с панкреатической эластазой [128]. Определена также пространственная структура комплекса каталитического домена матрипазы с SFTI 1 [129]. В базе данных KNOTTIN приводятся также расчётные модели трёхмерных структур кноттинов, пространственные структуры которых не известны [37].

Если пространственная структура целевого фермента неизвестна, информацию о вероятной аминокислотной последовательности ингибиторной петли селективного для данного фермента ингибитора-аналога кноттина либо SFTI 1 можно получить при анализе структур природных субстратов фермента и его канонических пептидных ингибиторов, принадлежащих к иным семействам, путём выравнивания. Например, аминокислотная последовательность ингибиторной петли для селективного ингибитора калликреиноподобной протеазы 7 человека была выбрана исходя из оптимальной первичной структуры расщепляемого этой протеазой участка субстрата [32].

Комбинаторный подход к созданию эффективных ингибиторов типа кноттинов и SFTI 1 может использоваться в случаях, когда пространственная структура целевой протеазы неизвестна. Этот подход заключается в составлении пептидных библиотек на основе определенного шаблона (известного кноттина или SFTI 1), получении их химическим синтезом или с помощью гетерологической экспрессии и тестировании на наличие ингибиторной активности в отношении целевого фермента с выбором наиболее эффективного ингибитора. Использование шаблона ограничивает разнообразие аминокислотных замен определенными рамками с целью сохранения жесткости структуры ингибиторов и их стабильности (см. раздел 2). Так, известно, что замена Met8 на остаток Leu в кноттине CMTI II и замена Pro8 в SFTI 1 на любой другой остаток заметно дестабилизируют структуры аналогов по сравнению с природными соединениями [130, 131]. Комбинаторный подход чаще используется для создания новых ингибиторов на основе шаблона SFTI 1, поскольку число синтезируемых соединений в составе библиотеки с учетом структурных ограничений невелико, а сведения о пространственной структуре комплексов ферментов с SFTI 1 ограничены [32, 101, 103, 132]. При дизайне специфичных ингибиторов на основе кноттинового шаблона комбинаторный подход часто дополняет и уточняет компьютерное моделирование, как, например, получилось при разработке специфичных ингибиторов матрипсазы 1 человека на основе кноттина MCoTI II и его гибрида с SOTI III [31, 34]. В таблице 1 приведены примеры дизайна эффективных ингибиторов терапевтически значимых протеаз на основе структур кноттинов и SFTI 1.

Следует отметить успешный дизайн ингибиторов сериновых протеаз с использованием в качестве шаблона SFTI 1 путём включения в структуру аналогов SFTI 1 неприродных аминокислот, в частности, N-алкилированных аналогов глицина. Такими аналогами природных аминокислот замещали один или несколько а.о. в природном пептиде и получили более эффективные и стабильные ингибиторы  $\alpha$ -химотрипсина и катепсина G [97, 100-103] (табл. 1). Введение небелковой аминокислоты гомосерина в C-концевую позицию с её последующим гидразинолизом, а остатка глиоксиловой кислоты – в N-концевую позицию ингибитора  $\beta$ -трипсазы

на основе кноттина MCoTI I с последующим формированием цикла путём образования гидролаза позволило получить активный ингибитор-пептидомиметик [31, 133]. В некоторых случаях укорачивание пептидной цепи исходных соединений-шаблонов приводило к получению более эффективных ингибиторов. Например, наиболее активный из исследованных ингибитор фурина, сконструированный на основе SFTI 1, состоял из 12, а не 14 а.о. [132]. Укороченный по сравнению с исходным кноттиновым шаблоном специфичный ингибитор  $\beta$ -трипсазы ингибировал все четыре мономера  $\beta$ -трипсазы одновременно, в отличие от более длинного ингибитора [133].

Следует упомянуть о создании бифункциональных ингибиторов на основе структуры SFTI 1. В 2004 году впервые были синтезированы два 16-членных циклических пептида, включающих по две ингибиторные петли SFTI 1, соединённые дисульфидным мостиком [134]. В одном пептиде (BiKK) в обоих положениях P1 находился остаток лизина, в другом (BiKF) одна из двух петель содержала в положении P1 фенилаланин. BiKK специфически ингибировал трипсин, BiKF – и трипсин, и химотрипсин (таблица 2).







BiKK и BiKF оказались в 12-14 раз менее устойчивы к протеолизу, чем природный SFTI 1. Пептид BiKF не мог ингибировать гидролиз трипсином и химотрипсином одновременно [134], что отличало его от бифункциональных ингибиторов семейства Боумана-Бирк. Авторы объяснили это малым размером молекулы пептида и близким расположением друг к другу ингибиторных петель. Позднее были получены и исследованы четыре 28-членных пептида, составленных каждый из двух ациклических молекул, SFTI 1 либо [Phe5]SFTI 1, связанных друг с другом одной пептидной связью и содержащих одну дисульфидную связь Cys3-Cys25 [135]. Четыре варианта различались лишь различным сочетанием остатков лизина и фенилаланина в двух P1 положениях пептида ([KK]BiSFTI 1, [FF]BiSFTI 1, [KF]BiSFTI 1 и [FK]BiSFTI 1) (табл. 2). Пептиды [KF]BiSFTI 1 и [FK]BiSFTI 1 ингибировали трипсин и химотрипсин одновременно и независимо, что, по-видимому, объясняется большим расстоянием между ингибиторными петлями. Пептид [FK]BiSFTI 1 при первоначальном взаимодействии с трипсином вёл себя только как субстрат, расщепляемый ферментом, тогда как предварительное связывание с химотрипсином тормозило гидролиз этого пептида трипсином. В целом все четыре бифункциональных пептида обладали меньшей, чем исходный SFTI 1, стабильностью, подвергались протеолитическому расщеплению по связям Lys5(или Phe5)-Ser6 и Lys19(или Phe19)-Ser20 с последующим замыканием связи между Lys5(или Phe5) и Ser20 и образованием моноциклического SFTI 1 или его аналога [Phe5]SFTI 1. Подобное явление назвали “пептидным сплайсингом” по аналогии со сплайсингом белков и ДНК [135].

Таблица 1. Некоторые наиболее эффективные ингибиторы различных протеаз, созданные на основе структур кноттинов и SFTI 1

| Ингибитор  | $K_i$ (M)                               | $K_a$ (M <sup>-1</sup> )   | IC <sub>50</sub> (M)                   | Источник |
|--|---|----------------------------|--|----------|
| <b>Эластаза</b>  |   |                            |  |          |
| MCoTI II (K10→V)   | (21±7)×10 <sup>-9</sup>                 |                            |  | [30]     |
| <i>MCoTI II wt</i>   | Нет ингибирования                       |                            |  | [30]     |
| <b>Плазмин</b>   |   |                            |  |          |
| CMTI II wt, все исследованные производные CMTI I с различными заменами в аминокислотной последовательности характеризовались меньшей величиной $K_a$ |   | ~2,5×10 <sup>7</sup>       |  | [86]     |
| <b>Матриптаза-1 человека</b>   |   |                            |  |          |
| WGVCVKVLRNCRDSDCPGACICLGNGYCG<br>(на основе MCoTI II)  | (8,3±1,0)×10 <sup>-10</sup>             |                            |  | [34]     |
| <i>MCoTI II wt</i>   | (8,07±1,0)×10 <sup>-9</sup>             |                            |  | [34]     |
| <b>Фактор XIIa</b>   |   |                            |  |          |
| CMTI I (Q9→K)  |   | ~ 7,1×10 <sup>8</sup>      |  | [86]     |
| <i>CMTI I wt</i>   |   | ~ 4,0×10 <sup>7</sup>      |  | [86]     |
| <b>β-триптаза тучных клеток человека</b>   |   |                            |  |          |
| ZVCPKILKKCRRDSDCLAGCVCGPNGFCGAKKVHse<br>(гибрид MCoTI II + EeTI II;<br>Z - глиоксилил; Hse - гомосерин)  | 1×10 <sup>-9</sup>                      |                            |  | [31]     |
| KKVGVCVKILKKCRRDSDCPGACICRGNGYCG<br>(на основе MCoTI II + EeTI II)   | 2×10 <sup>-9</sup>                      |                            |  | [31]     |
| <i>MCoTI II</i>  | Нет ингибирования<br>до 100 нМ MCoTI II |                            |  | [31]     |
| <b>Калликреиноподобная пептидаза 4 (KLK 4)</b>   |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (R2→F,T4→Q,K5→R,D→N)  | (3,86±0,60)×10 <sup>-11</sup>           |                            | (6,35±0,24)×10 <sup>-11</sup>          | [33]     |
| <i>SFTI 1 wt</i>   |   |                            | (221,4±10,1)×10 <sup>-9</sup>          | [33]     |
| <b>Калликреиноподобная пептидаза 5 (KLK 5)</b>   |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (I10→H)   |   |                            | ~140                                   | [95]     |
| <i>SFTI 1 wt</i>   |   |                            | Нет данных                             | [95]     |
| <b>Калликреиноподобная пептидаза 7 (KLK 7)</b>   |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (Trp2→Arg, Lys5→Phe)  |   |                            | (173,9±7,6)×10 <sup>-9</sup>           | [32]     |
| <i>SFTI 1 wt</i>   |   |                            | Нет ингибирования<br>(до 5 мкМ SFTI 1) | [32]     |
| <b>Матриптаза 2 человека</b>   |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (TLys5→Arg)   | 1,9×10 <sup>-8</sup>                    |                            |  | [139]    |
| <b>Фуриин</b>  |   |                            |  |          |
| H-KRCKKSIPPICF-NH <sub>2</sub>   | 4,9×10 <sup>-10</sup>                   |                            |  | [132]    |
| <b>Бычий α-химотрипсин</b>   |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (Lys5, Phe12→NPhe) NPhe – N-бензилглицин  |   | (9,3±0,8)×10 <sup>7</sup>  |  | [101]    |
| SFTI 1 (Lys5, Phe12→NPhe; Pro8→Naem)<br>Naem – N-(2-морфолиноэтил)глицин   |   | (1,3±0,3)×10 <sup>8</sup>  |  | [101]    |
| <i>SFTI 1 wt</i>   |   | (5,2±1,56)×10 <sup>6</sup> |  | [101]    |
| <b>Катепсин G</b>  |   |                            |  |          |
| SFTI 1 (Lys5, Phe12→NPhe; Pro8, Pro9→Npip; Ile→Nnle)<br>Npip – N-(3,4-метилендиоксибензил)глицин;<br>Nnle – (N-бутиламин)глицин                      |   | (2,1±0,1)×10 <sup>7</sup>  |  | [101]    |

Примечание. После данных о  $K_i$  (IC<sub>50</sub>) фермента сконструированными ингибиторами для сравнения приведены параметры ингибирования этого же фермента соответствующей исходной молекулой-шаблоном (выделено курсивом).

Таблица 2. Моно- и бифункциональные ингибиторы на основе структуры SFTI 1

| Структура ингибитора*   | $K_i$ трипсина, М либо $K_a$ с трипсином, $M^{-1}$ | $K_i$ химотрипсина, М                    | Протеолиз                            |
|---|--|--|--------------------------------------|
|  PICTKSIPPICTKSIP (BiKK)                         | $K_i (9,4 \pm 0,8) \times 10^{-9}$ М               | нет ингибирования                        | $\tau_{1/2}$ 38 мин                  |
|  PICTKSIPPICTFSIP (BiKF)                         | $K_i (18,0 \pm 1,1) \times 10^{-9}$ М              | $K_i (20,3 \pm 3,4) \times 10^{-9}$ М    | $\tau_{1/2}$ 30 мин                  |
| SFTI 1  | $K_i (3,0 \pm 0,8) \times 10^{-10}$ М              | нет ингибирования                        | $\tau_{1/2}$ 435 мин                 |
| SFTI 1  | $K_a 1,1 \times 10^{10}$ $M^{-1}$                  | $K_a 5,2 \times 10^{10}$ $M^{-1}$        | Не определяли                        |
|  GRCTKSIPPIAbuFPDGRAbuTKSIPPICFPD ([KK]BiSFTI 1) | $K_a (4,4 \pm 0,4) \times 10^8$ $M^{-1}$           | Не определяли                            | Гидролиз с образованием SFTI 1       |
|  GRCTFSIPPIAbuFPDGRAbuTFSIPPICFPD ([FF]BiSFTI 1) | Не определяли                                      | $K_a (1,6 \pm 0,2) \times 10^8$ $M^{-1}$ | Гидролиз с образованием [Phe5]SFTI 1 |
|  GRCTKSIPPIAbuFPDGRAbuTFSIPPICFPD ([KF]BiSFTI 1) | $K_a (2,6 \pm 0,2) \times 10^8$ $M^{-1}$           | $K_a (8,7 \pm 0,2) \times 10^8$ $M^{-1}$ | Гидролиз с образованием SFTI 1       |
|  GRCTFSIPPIAbuFPDGRAbuTKSIPPICFPD ([FK]BiSFTI 1) | Не определяли                                      | $K_a (3,0 \pm 0,4) \times 10^8$ $M^{-1}$ | Гидролиз с образованием [Phe5]SFTI 1 |

Примечание. \* Abu – 2-аминобутановая кислота

## 5. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ 99 КНОТТИНОВ И SFTI 1

К настоящему моменту среди созданных на основе кноттинов и SFTI 1 ингибиторов терапевтически значимых сериновых протеаз нет соединений, исследованных на моделях *in vivo*. Однако интерес к созданию таких ингибиторов стабильно высок благодаря перечисленным ниже свойствам, делающих эти соединения идеальными основами для разработки лекарственных средств:

1) Высокая эффективность ингибирования катализируемых сериновыми протеазами реакций гидролиза:  $K_i$  порядка  $10^{-8}$  М -  $10^{-10}$  М.

2) Чрезвычайная стабильность структур кноттинов-ИСП и SFTI 1 и его аналогов, обуславливающая возможность длительной циркуляции этих соединений в организме и сохранность при изготовлении и хранения лекарственных средств на их основе.

3) Относительно небольшие размеры молекул, позволяющие получать такие ингибиторы (индивидуальные соединения и комбинаторные библиотеки соединений) как химическим синтезом, так и продукцией в бактериальных клетках в виде секретируемых химерных белков с правильно сформированными дисульфидными связями.

4) Возможность варьирования в определенных пределах аминокислотных последовательностей кноттинов-ИСП и SFTI 1, в том числе и с включением остатков небелковых и неприродных аминокислот,

модифицированных амидных связей, замены S-S-мостиков на C-C, C-N и другие. Это позволяет разрабатывать высокоспецифичные ингибиторы, способные селективно регулировать отдельные протеолитические процессы в организме.

5) Наличие информации о пространственных структурах многих представителей семейств кноттинов-ИСП, SFTI 1 и его аналогов и комплексов этих ингибиторов с ферментами, что позволяет использовать эти структуры в качестве шаблонов для дизайна новых ингибиторов методами компьютерного моделирования и комбинаторных библиотек.

6) Способность кноттинов и SFTI 1 проникать сквозь клеточные мембраны, что может означать высокую биодоступность данных соединений [136].

7) Отсутствие у кноттинов-ИСП и SFTI 1 токсических свойств: природные кноттины-ИСП и SFTI 1 входят в состав пищевых продуктов, а при метаболизме этих соединений образуются нетоксичные метаболиты.

Мишенями для воздействия ингибиторов на основе структур кноттинов-ИСП и SFTI 1, являются сериновые протеазы, активность которых приводит к развитию патологических процессов. В настоящее время активно разрабатываются ингибиторы на основе кноттинов и SFTI 1 для таких терапевтически значимых сериновых протеаз, как: 1) матриптаза 1, повышенная активность которой, характерная для опухолевых клеток, способствует их инвазии путём повышенного расщепления белков внеклеточного матрикса [31, 34]. Ингибиторы этого фермента могут быть использованы

при терапии злокачественных опухолей в качестве дополнительных лекарственных средств, снижающих и предотвращающих появление метастазов; 2) матриптаза 2, участвующая в регуляции гомеостаза железа и ответственная за повышенный распад гепцидина, регулирующего абсорбцию железа, при гемохроматозе и  $\beta$ -талассемии [137]. Ожидается, что ингибиторы этого фермента будут использоваться для лечения указанных заболеваний; 3)  $\beta$ -триптаза тучных клеток, участвующая в процессах выброса этими клетками гистамина. Ингибиторы  $\beta$ -триптазы могут стать антигистаминными препаратами нового поколения; 4) фурин, внутриклеточная протеаза комплекса Гольджи, которая участвует в процессинге оболочечных белков вирусов и в образовании некоторых бактериальных токсинов из их предшественников, в частности, фактора летальности *Bacillus anthracis*. Предполагается, что ингибиторы этого фермента можно будет использовать при лечении ряда инфекционных заболеваний, в том числе сибирской язвы [132]; 5) калликреиноподобная протеаза 4, активация которой обнаружена при раке простаты, а ингибирование может способствовать подавлению опухолевого роста [33]; 6) калликреиноподобные протеазы 5 и 7 кожи, повышенная активация которых имеет место при atopических дерматитах, а ингибирование их активности может быть основным компонентом симптоматической терапии [32, 95]; 7) факторы свёртывающей системы крови плазмин и фактор XII [86]. Если ингибирование плазмينا будет способствовать формированию сгустка и остановке кровотечения, то ингибирование фактора XII, напротив, будет предотвращать нежелательное тромбообразование в сосудах.

Следует отметить также сериновую протеазу вируса денге, для подавления активности которой были разработаны пептидные ингибиторы на основе родственных SFTI 1 циклических пептидов конотоксинов [138]. Подобные ингибиторы могут быть использованы для разработки средств лечения лихорадки денге, вакцина против которой ещё не создана.

Ряд терапевтически значимых сериновых протеаз, в том числе и с известными пространственными структурами, ещё остается “за бортом” процесса поиска ингибиторов на основе кноттинов и SFTI 1, и проведение исследований в этой области является делом будущего. Особый интерес представляют, в частности, протеазы вирусов семейства *Flaviviridae*, способствующие развитию таких заболеваний, как клещевой и японский энцефалиты, жёлтая лихорадка, лихорадка Западного Нила, гепатиты С и G, сериновые олигопептидазы, являющиеся факторами вирулентности ряда болезнетворных бактерий. Помимо неполного охвата возможных мишеней для новых пептидных ингибиторов следует также отметить ещё одну проблему в исследовании этих соединений – недостаточную разработанность процесса проверки селективности создаваемых новых ингибиторов. В организме существует много сериновых протеаз, и важно обеспечить селективное

воздействие на тот фермент, который отвечает за развитие патологии. Известно также, что некоторые аналоги SFTI 1 могут воздействовать и на цистеиновые протеазы протеасом [139]. Пока нет ответов на вопросы, достаточно ли компьютерного моделирования для оценки селективности взаимодействия ингибитора с целевым ферментом; каковы критерии селективности, например, достаточно ли разницы в величинах  $K_i$  одним и тем же ингибитором матриптазы 2 и матриптазы 1 в 15 раз [140] для селективного торможения одного из двух ферментов; сколько и каких ферментов надо тестировать на взаимодействие с новым ингибитором, чтобы доказать его селективность. К сожалению, отсутствуют данные об активности природных и сконструированных кноттинов-ИСП в экспериментах *in vivo*, на моделях соответствующих патологических процессов. Однако определённый оптимизм вселяет то, что созданные на основе природного кноттина-ИСП методом направленного моделирования соединения – лиганды различных интегринов подавляют связывание опухолевых клеток в культуре с витронектином [120] и способны в экспериментах на животных визуализировать опухоли, позитивные по определённому интегину [141-143], и атеросклеротические бляшки в сонной артерии [144]. Для недавно открытых структурных аналогов SFTI 1, коротких пептидов ануранов из кожи амфибий, в экспериментах *in vivo* показано, что их антимикробная активность в отношении *Staphylococcus aureus* прямо коррелирует с их ингибиторной активностью в отношении триптического гидролиза [145].

В целом кноттины-ИСП и SFTI 1 имеют огромный потенциал применения в качестве шаблонов для создания медицинских препаратов ингибиторного действия, направленных на лечение различных серьёзных патологий организма, и при этом обладающих низкой токсичностью и, предположительно, высокой биодоступностью.

Работа выполнена в рамках темы №0518-2014-0003 Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы при частичной поддержке гранта РФФИ № 13-03-00897.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ehrmann M., Clausen T. (2004) Annu. Rev. Genet., **38**, 709-724.
2. Puente X.S., Lopez-Otin C.A. (2004) Genome Res., **14**(4), 609-622.
3. Meyer-Hoffert U. (2009) Front Biosci. (Landmark Ed.), **14**, 3409-3418.
4. Meyer-Hoffert U., Wiedow O. (2011) Curr. Opin. Hematol., **18**(1), 19-24.
5. Debowski D. (2013) Curr. Pharm. Des., **19**(6), 1068-1084.
6. Gatto M., Iaccarino L., Ghirardello A., Bassi N., Pontisso P., Punzi L., Shoenfeld Y., Doria A. (2013) Clin. Rev. Allergy Immunol., **45**(2), 267-280.
7. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barret A.J. (2004) Biochem. J., **378**(Pt 3), 705-716.

8. Gal P., Dobo J., Beinrohr L., Zavodszky P. (2013) Adv. Exp. Med. Biol., **735**, 23-40.
9. Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J. (2003) Cell Mol. Life Sci., **60**(11), 2427-2444.
10. Lindstedt K.A., Leskinen M.J., Kovanen P.T. (2004) Arterioscler. Thromb Vasc. Biol., **24**(8), 1350-1358.
11. Tanaka K.A., Levy J.H. (2007) Hematol. Oncol. Clinics of North America, **21**(1), 33-50.
12. Ballanti E., Perricone C., Greco E., Ballanti M., Di Muzio G., Chimenti M.S., Perricone R. (2013) Immunol. Res., **56**(2-3), 477-491.
13. Ha S.Y., Kim K.Y., Lee N.K., Kim M.G., Kim S.H. (2014) Virchows Arch., **464**(1), 19-27.
14. Chou F.P., Chen Y.W., Zhao X.F., Xu-Monette Z.Y., Young K.H., Gartenhaus R.B., Wang J.K., Kataoka H., Zuo A.H., Barndt R.J., Johnson M., Lin C.Y. (2013) Am. J. Pathol., **183**(4), 1306-1317.
15. Brown S.G., Stone S.F., Fatovich D.M., Burrows S.A., Holdgate A., Celenza A., Coulson A., Hartnett L., Nagree Y., Cotterell C., Isbister G.K. (2013) J. Allergy Clin. Immunol., **132**(5), 1141-1149.
16. Zhong J., Groutas W.C. (2004) Curr. Top. Med. Chem., **4**(12), 1203-1216.
17. Bastos I.M.D., Motta F.N., Grellier P., Santana J.M. (2013) Curr. Med. Chem., **20**(25), 3103-3115.
18. Li K., Phoo W.W., Luo D. (2014) Virol Sin., **29**(2), 74-85.
19. Kim C.W., Chang K.-M. (2013) Clin. Mol. Hepatol., **19**(1), 17-25.
20. Bartenschlager R. (1999) J. Viral Hepat., **6**(3), 165-181.
21. Walker B., Lynas J.K. (2001) Cell Mol. Life Sci., **58**(4), 596-624.
22. Salam K.A., Akimitsu N. (2013) Biomed. Res. Int., **2013**, Article ID 467869, 9 pages. doi:10.1155/2013/467869.
23. Hezode C., Fontaine H., Dorival C., Zoulim F., Larrey D., Canva V., de Ledinghen V. et al. (2014) Gastroenterology, **147**(1), 132-142.
24. Korsinczy M.L., Schirra H.J., Rosengren K.J., West J., Condie B.A., Otvos L., Anderson M.A., Craik D.J. (2001) J. Mol. Biol., **311**(3), 579-591.
25. Qi R.F., Song Z.W., Chi C.W. (2005) Acta Biochim. Biophys. Sin., **37**(5), 283-292.
26. Joshi R.S., Mishra M., Suresh C.G., Gupta V.S., Giri A.P. (2013) Biochim. Biophys. Acta, **1830**(11), 5087-5094.
27. Lesner A., Legowska A., Wysocka M., Rolka K. (2011) Curr. Pharm. Des., **17**(38), 4308-4317.
28. Werle M., Schmitz T., Huang H.L., Wentzel A., Kolmar H., Bernkop-Schnurch A. (2006) J. Drug Target., **14**(3), 137-146.
29. Thongyoo P., Roque-Rosell N., Leatherbarrow R.J., Tate E.W. (2008) Org. Biomol. Chem., **6**(8), 1462-1470.
30. Thongyoo P., Bonomelli C., Leatherbarrow R.J., Tate E.W. (2009) J. Med. Chem., **52**(20), 6197-6200.
31. Sommerhoff C.P., Avrutina O., Schmoldt H.U., Gabrijelcic-Geiger D., Diederichsen U., Kolmar H. (2010) J. Mol. Biol., **395**(1), 167-175.
32. De Veer S.J., Ukolova S.S., Mungo C.A., Swedberg J.E., Buckle A.M., Harris M. (2013) Biopolymers, **100**(5), 510-518.
33. Swedberg J.E., De Veer S.J., Sit K.C., Reboul C.F., Buckle A.M., Harris J.M. (2011) PloS One, **6**(4), e19302.
34. Glotzbach B., Reinwarth M., Weber N., Fabritz S., Tomaszowski M., Flitter H., Chtistmann A., Avrutina O., Kolmar H. (2013) PLoS One, **8**(10), e76956.
35. Laskowski M. Jr., Kato I. (1980) Annu. Rev. Biochem., **49**, 593-626.
36. Laskowski M. Jr. (1986) Adv. Exp. Med. Biol., **199**, 1-14.
37. Gracy J., Chiche L. (2011) Curr. Pharm. Des., **17**(38), 4337-4350.
38. Коротких А.А., Памирский И.Э., Штарберг М.А., Бородин Е.А. (2010) Материалы Всероссийской научной школы для молодежи "Перспективы развития инноваций в биологии" / Под ред. Воеводиной Н.В., Бузолевой Л.С., Ханчук Н.Н. Владивосток: Дальневосточный Федеральный Университет, с. 98-102.
39. www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm142740.htm.
40. Kolmar H. (2009) Curr. Opin. Pharmacol., **9**, 608-614.
41. Craik D.J., Cemazar M., Daly N.L. (2007) Curr. Opin. Drug Discov. Dev., **10**(2), 176-184.
42. Daly N.L., Craik D.J. (2011) Curr. Opin. Chem. Biol., **15**(3), 362-368.
43. Sancheti H., Camarero J. (2009) Adv. Drug Deliv. Rev., **61**(11), 908-917.
44. Werle M., Kafedjiiski K., Kolmar H., Bernkop-Schnurch A. (2007) Int. J. Pharm., **332**(1-2), 72-79.
45. Heitz A., Avrutina O., Le-Nguyen D., Diederichsen U., Hernandez J.F., Gracy J., Kolmar H., Chiche L. (2008) BMC Struct. Biol., **8**, 54.
46. Wang C.K., Hu S.H., Martin J.L., Sjogren T., Haidu J., Bohlin L., Claeson P., Goransson U., Rosengren K.J., Tang J., Tan N.H. et al. (2009) J. Biol. Chem., **284**(16), 10672-10683.
47. Gracy J., Chiche L. (2010) BMC Bioinformatics, **11**, 535.
48. Polanowski A., Wilusz T., Nienartowicz B., Cieslar E., Slonimska A., Nowak K. (1980) Acta Biochim. Polon., **27**(3-4), 371-382.
49. Wilusz T., Wieczorek M., Polanowski A., Denton A., Cook J., Laskowski M. Jr. (1983) Hoppe Seylers Z Physiol Chem., **364**(1), 93-95.
50. Leluk J., Otlewski J., Wieczorek M., Polanowski A., Wilusz T. (1983) Acta Biochim. Polon., **30**(2), 127-138.
51. Otlewski J., Wilusz T. (1984) Acta Biochim. Polon., **32**(4), 285-293.
52. Hojima Y., Pierce J.V., Pisano J.J. (1982) Biochemistry, **21**(16), 3741-3746.
53. Otlewski J., Polanowski A., Lelik J., Wilusz T. (1984) Acta Biochim. Polon., **31**(3), 267-278.
54. Hojima Y., Pierce J.V., Pisano J.J. (1980) Thromb. Res., **20**(2), 163-171.
55. Habib H., Fazili K.M. (2007) Biotechnol. Mol. Biol. Rev., **2**(3), 68-85.
56. Chiche L., Heitz A., Gelly J.C., Gracy J., Chau P.T., Ha P.T., Hernandez J.F., Le-Nguyen D. (2004) Curr. Protein Pept. Sci., **5**(5), 341-349.
57. Gruber C.W., Elliott A.G., Ireland D.C., Delprete P.G., Dessein S., Goransson U., Trabi M., Wang C.K., Kinghorn A.B., Robbrecht E., Craik D.J. (2008) Plant Cell, **20**(9), 2471-2483.
58. Favel A., Mattras H., Coletti-Previero M.A., Zwilling R., Robinson E.A., Castro B. (1989) Int. J. Peptide Protein Res., **33**(3), 202-208.
59. Kowalska J., Pszczoia K., Wilimowska-Pelc A., Lorenc-Kubis I., Zuziak E., Lugowski M., Legowska A., Kwiatkowska A., Sleszynska M., Lesner A., Walewska A., Zabotna E., Rolka K., Wilusz T. (2007) Phytochemistry, **68**(11), 1487-1496.
60. Torres-Castillo J.A., Mondragon J.C., Blanco-Labra A. (2009) Phytochemistry, **70**(11-12), 1374-1381.
61. Banks J.A., Nishiyama T., Hasebe M., Bowman J.L., Gribskov M., de Pamphilis C., Albert V.A. et al. (2011) Science, **332**(6032), 960-963.
62. Hamato N., Koshiba T., Pham T.-N., Tatsumi Y., Nakamura D., Takano R., Hayashi K., Hong Y.-M., Hara S. (1995) J. Biochem., **117**(2), 432-437.



63. Colgrave M.L., Craik D.J. (2004) *Biochemistry*, **43**(20), 5965-5975.
64. Luckett S., Garcia R.S., Barker J.J., Konarev A.V., Shewry P.R., Clarke A.R., Brady R.L. (1999) *J. Mol. Biol.*, **290**(2), 525-533.
65. Marx U.C., Korsinsky M.L., Schirra H.J., Jones A., Condie B., Otvos L.Jr., Craik D.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**(24), 21782-21789.
66. Chen P., Rose J., Love R., Wei C.H., Wang B.C. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**(3), 1990-1994.
67. Birk Y., Gertler A., Khalef S. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **147**(2), 402-404.
68. Schechter I., Berger A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**(2), 157-162.
69. Zablotna E., Kazmierczak K., Jaskiewicz A., Stawikowski M., Kupryszewski G., Rolka K. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**(4), 855-859.
70. Korsinczyk M.L., Schirra H.J., Rosengren K.J., West J., Condie B.A., Otvos L., Anderson M.A., Craik D.J. (2001) *J. Mol. Biol.*, **311**(3), 579-591.
71. Long Y.Q., Lee S.L., Lin C.Y., Enyedy I.J., Wang S., Li P., Dickson R.B., Roller P.P. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**(18), 2515-2519.
72. Otlewski J., Krowarsch D. (1996) *Acta Biochim. Polon.*, **43**(3), 431-444.
73. Lelik J., Otlewski J., Wieczorek M., Polanowski A., Wilusz T. (1983) *Acta Biochim. Polon.*, **30**(2), 127-138.
74. Polanowski A., Cieslar E., Otlewski J., Nienartowicz B., Wilimowska-Pelc A., Wilusz T. (1987) *Acta Biochim. Polon.*, **34**(4), 395-406.
75. Kowalska J., Zablocka A., Wilusz T. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**(7), 1054-1063.
76. Hara S., Makino J., Ikenaka T.J. (1989) *J. Biochem.*, **105**(1), 88-92.
77. Matsuo M., Hamato N., Takano R., Kamei-Hayashi K., Yasuda-Kamatani Y., Nomoto K., Hara S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**(2), 187-192.
78. Hamato N., Takano R., Kamei-Hayashi K., Hara S. (1992) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**(2), 275-279.
79. Laure H.J., Faza V.M., Izumi C., Padovan J.C., Greene L.J. (2006) *Phytochemistry*, **67**(4), 362-370.
80. Hatakeyama T., Hiraoka M., Funatsu G. (1991) *Agric. Biol. Chem.*, **55**(10), 2641-2642.
81. Hayashi K., Takeshita T., Hamato N., Takano R., Hara S., Miyata T., Kato H. (1994) *J. Biochem.*, **116**(5), 1013-1018.
82. Ling M.H., Qi H.Y., Chi C.W. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**(2), 810-814.
83. Trabi M., Craik D. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**(3), 132-138.
84. Mylne J.S., Colgrave M.L., Daly N.L., Chanson A.H., Elliott A.G., McCallum E.J., Jones A., Craik D.J. (2011) *Nat. Chem. Biol.*, **7**(5), 257-259.
85. Garcia A.E., Camarero J.A. (2010) *Curr. Mol. Pharmacol.*, **3**(3), 153-163.
86. Grzesiak A., Buczek O., Petry I., Szewczuk Z., Otlewski J. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**(2), 318-324.
87. Camarero J.A., Kimura R.H., Woo Y.H., Shekhtman A., Cantor J. (2007) *ChemBioChem*, **8**(12), 1363-1366.
88. Schmoldt H.U., Wentzel A., Becker S., Kolmar H. (2005) *Protein Expr. Purif.*, **39**(1), 82-89.
89. Avrutina O., Schmoldt H.U., Gabrijelcic-Geiger D., Wentzel A., Frauendorf H., Sommerhoff C.P., Diederichsen U., Kolmar H. (2008) *ChemBioChem*, **9**(1), 33-37.
90. Souriau C., Chiche L., Irving R., Hudson P. (2005) *Biochemistry*, **44**(19), 7143-7155.
91. Lahti J.L., Silverman A.P., Cochran J.R. (2009) *PLoS Comput. Biol.*, **5**(9), e1000499.
92. Craik D.J., Conibear A.C. (2011) *J. Org. Chem.*, **76**(12), 4805-4817.
93. Jagadish K., Camarero J.A. (2010) *Biopolymers*, **94**(5), 611-616.
94. Austin J., Kimura R.H., Woo Y.H., Camarero J.A. (2010) *Amino Acids*, **38**(5), 1313-1322.
95. Shariff L., Zhu Y., Cowper B., Di W.-L., Macmillan D. (2014) *Tetrahedron*, **70**(42), 7675-7680.
96. Favel A., Le-Nguyen D., Coletti-Previero M.A., Castro B. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**(1), 79-82.
97. Zablotna E., Kret A., Jaskiewicz A., Olmna A., Leplawy M.L., Rolka K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**(3), 823-828.
98. Debowski D., Lukajtis R., Filipowicz M., Strzelecka P., Wysocka M., Legowska A., Lesner A., Rolka K. (2013) *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **100**(2), 154-159.
99. Legowska A., Bulak E., Wysocka M., Jaskiewicz A., Lesner A., Debowski D., Rolka K. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, **16**(10), 5644-5652.
100. Lukajtis R., Legowska A., Wysocka M., Debowski D., Lesner A., Rolka K. (2011) *J. Pept. Sci.*, **17**(4), 281-287.
101. Legowska A., Debowski D., Lesner A., Wysocka M., Rolka K. (2010) *Mol. Divers.*, **14**(1), 51-58.
102. Legowska A., Debowski D., Lukajtis R., Wysocka M., Czaplewski C., Lesner A., Rolka K. (2010) *Bioorg. Med. Chem.*, **18**(23), 8188-8193.
103. Legowska A., Debowski D., Lesner A., Wysocka M., Rolka K. (2009) *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(9), 3302-3307.
104. Li P., Jiang S., Lee S.L., Lin C.Y., Johnson M.D., Dickson R.B., Michejda C.J., Roller P.P. (2007) *J. Med. Chem.*, **50**(24), 5976-5983.
105. Legowska A., Bulak E., Jaskiewicz A., Maluch I., Sieracki M., Wysocka M., Lesner A., Rolka K. (2010) *Prot. Pept. Lett.*, **17**(10), 1223-1227.
106. Guo X., Shi J., Tang Z., Cui D., Zhang Y. (2006) *Chem. Biol. Drug Des.*, **68**(6), 341-344.
107. Empting M., Avrutina O., Meusinger R., Fabritz S., Reinwarth M., Biesalski M., Voigt S., Buntkowsky G., Kolmar H. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**(22), 5207-5211.
108. Clark R.J., Craik D.J. (2010) *Biopolymers*, **94**(4), 414-422.
109. Avrutina O., Schmoldt H.U., Kolmar H., Diederichsen U. (2004) *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**(23), 4931-4935.
110. Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E. (1997) *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. CRC Press LLC: New York.
111. Thongyoo P., Tate E.W., Leatherbarrow R.G. (2006) *Chem. Commun. (Camb)*, **27**, 2848-2850.
112. Thapa P., Zhang R.-Y., Menon V., Bingham J.-P. (2014) *Molecules*, **19**(9), 14461-14483.
113. Gunasekera S., Aboye T.L., Madian W.A., El-Seedi H.R., Göransson U. (2013) *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **19**(1), 43-54.
114. Mende F., Seitz O. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**(6), 1232-1240.
115. Legowska A., Debowski D., Lukajtis R., Sztabkowska E., Mizeria A., Brzozowski K., Wysocka M., Lesner A., Rolka K. (2011) *Prot. Pept. Lett.*, **18**(11), 1158-1167.
116. Kolesanova E.F., Sanzhakov M.A., Kharybin O.N. (2013) *Int. J. Pept.*, **2013**, Article ID 197317, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/197317>.
117. Reinwarth M., Nasu D., Kolmar H., Avrutina O. (2012) *Molecules*, **17**(11), 12533-12552.

118. Pereira H.J., Salgado M.C., Oliveira E.B. (2009) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **877**(22), 2039-2044.
119. Hilpert K., Hansen G., Wessner H., Volkmer-Engert R., Höhne W. (2005) J. Biochem., **138**(4), 383-390.
120. Kimura R., Jones D., Jianq L., Miao Z., Cochran J. (2011) PLoS One, **6**(2), e16112.
121. Lu W., Apostol I., Quasim M.A., Warne N., Wynn R., Zhang W.L., Anderson S., Chianq Y.W., Oqin E., Rothberg I., Ryan K., Laskowski M.Jr. (1997) J. Mol. Biol., **266**(2), 441-461.
122. Krowarch D., Dadlez M., Buczek O., Krokoszynska I., Smalas A.O., Otlewski J. (1999) J. Mol. Biol., **289**(1), 175-186.
123. Berman H.M., Henrick K., Nakamura H. (2003) Nat. Struct. Biol., **10**(12), 980.
124. Bode W., Grelling H.J., Huber R., Otlewski J., Wilusz T. (1989) FEBS Lett., **242**(2), 285-292.
125. Huang Q., Liu S., Tang Y. (1993) J. Mol. Biol., **229**(4), 1022-1036.
126. Helland R., Berglund G.I., Otlewski J., Apostoluk W., Andersen O.A., Willassen N.P., Smalås A.O. (1999) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **55**(Pt 1), 139-148.
127. Krätzner R., Debreczeni J.E., Pape T., Schneider T.R., Wentzel A., Kolmar H., Sheldrick G.M., Uson I. (2005) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **61**(Pt 9), 1255-1262.
128. Aÿ J., Hilpert K., Krauss N., Schneider-Mergener J., Höhne W. (2003) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., **59**(Pt 2), 247-254.
129. Yuan C., Chen L., Meehan E.J., Daly N., Craik D.J., Huang M., Ngo J.C. (2011) BMC Struct. Biol., **11**, 30.
130. Zhukov I., Jaroszewski L., Bierzycki A. (2000) Protein Sci., **9**(2), 273-279.
131. Daly N.L., Chen Y.K., Foley F.M., Bansal P.S., Bharathi R., Clark R.J., Sommerhoff C.P., Craik D.J. (2006) J. Biol. Chem., **281**(33), 23668-23675.
132. Fittler H., Depp A., Avrutina O., Dahms S.O., Than M.E., Empting M., Kolmar H. (2015) Chembiochem, **16**(17), 2441-2444.
133. Avrutina O., Schmoldt H.U., Gabrielcic-Geiger D., Wentzel A., Frauendorf H., Sommerhoff C.P., Diederichsen U., Kolmar H. (2008) Chembiochem, **9**(1), 33-37.
134. Jaulent A.M., Leatherbarrow R.J. (2004) Protein Eng. Des. Sel., **17**(9), 681-687.
135. Legowska A., Lesner A., Bulak E., Jaskiewicz A., Sieradzan A., Cydzic M., Stefanowicz A., Szewczuk Z., Rolka K. (2010) FEBS J., **277**(10), 2351-2359.
136. Cascales L., Henriques S.T., Kerr M.C., Huang Y.H., Sweet M.J., Daly N.L., Craik D.J. (2011) J. Biol. Chem., **286**(42), 36932-36943.
137. Guo S., Casu C., Gardenghi S., Booten S., Aghajan M., Peralta R., Watt A., Freier S., Monia B.P., Rivella S. (2013) J. Clin. Invest., **123**(4), 1531-1541.
138. Xu S., Li H., Shao X., Fan C., Ericksen B., Liu J., Chi C., Wang C. (2012) J. Med. Chem., **55**(15), 6881-6887.
139. Debowski D., Pikula M., Lubos M., Langa P., Trzonkowski P., Lesner A., Legowska A., Rolka K. (2014) PLoS One, **9**(2), e89465.
140. Gitlin A., Debowski D., Karna N., Legowska A., Stirnberg M., Rolka K. (2015) Chembiochem, **16**(11), 1601-1607.
141. Kimura R.H., Cheng Z., Gambhir S.S., Cochran J.R. (2009) Cancer Res., **69**(6), 2435-2442.
142. Moore S.J., Hayden Gephart M.G., Bergen J.M., Su Y.S., Rayburn H., Scott M.P., Cochran J.R. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **110**(36), 14598-14603.
143. Jiang L., Kimura R.H., Ma X., Tu Y., Miao Z., Shen B., Chin F.T., Shi H., Gambhir S.S., Cheng Z. (2014) Mol. Pharm., **11**(11), 3885-3892.
144. Jiang L., Tu Y., Kimura R.H., Habte F., Chen H., Cheng K., Shi H., Gambhir S.S., Cheng Z. (2015) J. Nucl. Med., **56**(6), 939-944.
145. Malik U., Silva O.N., Fensterseifer I.C., Chan L.Y., Clark R.J., Franco O.L., Daly N.L., Craik D.J. (2015) Antimicrob. Agents Chemother., **59**(4), 2113-2121.

Поступила: 28. 12. 2015.  
Принята к печати: 28. 03. 2016.

## PROSPECTS FOR THE DESIGN OF NEW THERAPEUTICALLY SIGNIFICANT PROTEASE INHIBITORS BASED ON KNOTTINS AND SUNFLOWER SEED TRYPSIN INHIBITOR (SFTI 1)

S.S. Kuznetsova<sup>1</sup>, E.F. Kolesanova<sup>1</sup>, A.V. Talanova<sup>1,2</sup>, A.V. Veselovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: 8(499)246-33-75, 8(926)384-04-99;  
e-mail: sofa\_kuznetsova@mail.ru

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University,  
1 bld. 5 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia

Plant seed knottins, mainly from the *Cucurbitacea* family, and sunflower seed trypsin inhibitor (SFTI 1) are the most low-molecular canonical peptide inhibitors of serine proteases. High efficiency of inhibition of various serine proteases, structure rigidity together with the possibility of limited variations of amino acid sequences, high chemical stability, lack of toxic properties, opportunity of production by either chemical synthesis or use of heterologous expression systems make these inhibitors attractive templates for design of new compounds for regulation of therapeutically significant serine protease activities. Hence the design of such compounds represents a prospective research field. The review considers structural characteristics of these inhibitors, their properties, methods of preparation and design of new analogs. Examples of successful employment of natural serine protease inhibitors belonging to knottin family and SFTI 1 as templates for the design of highly specific inhibitors of certain proteases are given.

**Key words:** serine proteases, inhibitors, knottins, design of peptide inhibitors of proteases