

## ОБЗОР

### ИНГИБИТОРЫ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ: КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНТЕРЕС

З.М. Шайхутдинова<sup>1</sup>, Т.Н. Паширова<sup>1,2</sup>, П. Массон<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
420008, Казань, ул. Кремлевская, 18; \*эл. почта: [rum.masson@free.fr](mailto:rum.masson@free.fr)

<sup>2</sup>Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН,  
420088, Казань, ул. Академика Арбузова, 8

В настоящее время актуален поиск новых ингибиторов медленного связывания ферментов (ИМС) — потенциальных лекарственных веществ для лечения различных заболеваний — и их распознавание на этапе *in vitro* исследований. ИМС, в отличие от их классических обратимых аналогов, проявляют кинетику медленного связывания с ферментом, в ходе которой стационарное состояние в системе достигается не за микросекунды, а в течение более продолжительного времени. Подобные соединения могут быть перспективными лекарствами, так как вне зависимости от их фармакокинетики в кровотоке они обладают такими преимуществами, как высокая аффинность к мишени-ферменту, длительное время удержания, пролонгированное действие. Такие фармакологические свойства обеспечивают правильную дозировку лекарств для достижения их высокой активности с меньшими побочными эффектами. Цель настоящего обзора заключается в рассмотрении механизмов взаимодействия ИМС с ферментами, принципов распознавания ИМС на этапе *in vitro* кинетических исследований и фармакологической значимости.

**Ключевые слова:** ингибиторы медленного связывания; ферментативная кинетика; константа ингибирования; время удержания

**DOI:** 10.18097/PBMCR1536

## ВВЕДЕНИЕ

Относительно недавно стало известно, что фармакологическая активность препаратов-ингибиторов зависит не только от аффинности, но и от того насколько быстро препарат связывается с сайтом-мишенью и как долго он там находится [1, 2]. Согласно модели, предложенной Copeland [3] эффект от лекарственного вещества (ЛВ) продолжается до тех пор, пока оно связано с мишенью, и исчезает тогда, когда комплекс лекарство-мишень диссоциирует. Существует много примеров, когда фармакодинамика сохраняется ещё долгое время после того, как большая часть ЛВ элиминирована из кровотока [4, 5]. Поэтому для поиска и разработки новых ЛВ в комплексе с их термодинамическими, кинетическими и традиционными фармакологическими параметрами, такими как ЛД<sub>50</sub> (50% смертельная доза), IC<sub>50</sub> (концентрация, вызывающая 50% ингибирование), ЭД<sub>50</sub> (полуэффективная доза), константа диссоциации, всё чаще стали учитывать процессы ассоциации-диссоциации ЛВ с мишенью и использовать параметр “время удержания ЛВ на мишени” [1]. С каждым годом увеличивается число публикаций, в которых авторы предлагают включать кинетику связывания препарата с мишенью как один из этапов разработки ЛВ [6–13]. Неправильная оценка аффинности лигандов к мишени [14–16] имеет пагубные последствия для разработки ЛВ, включая неверные прогнозы дозировки для человека, путаницу в выборе

молекул-кандидатов для их усовершенствования, несоответствие между оценками активности лигандов *in vivo* и *in vitro*.

Среди большого числа ЛВ — обратимых ингибиторов ферментов — огромный интерес представляют обратимые ингибиторы медленного связывания (ИМС, *slow-binding inhibitors*). Обычно в случае быстрых обратимых ингибиторов, также как и для субстратов, обратимые комплексы с ферментом образуются в течение нескольких микросекунд (<50 мкс). После короткого индукционного периода наступает стационарное состояние системы. В отличие от классических обратимых ингибиторов, для ИМС индукционный период намного дольше (>>50 мкс). Наблюдаемое время индукции более чем 10 с после быстрого смешивания фермента и реагентов при постоянной температуре (термостатирование) служит доказательством ИМС, которое должно быть подтверждено уточнённым кинетическим анализом с использованием аналитического оборудования для изучения кинетики быстрых реакций, например, методом остановленной струи [17–19]. Однако с практической точки зрения (фармакологической значимости) наибольший интерес представляют ИМС с более длительным временем удержания (>2 мин).

Первые работы по кинетике медленного связывания ингибиторов с ферментами были опубликованы во второй половине прошлого века [20–22].



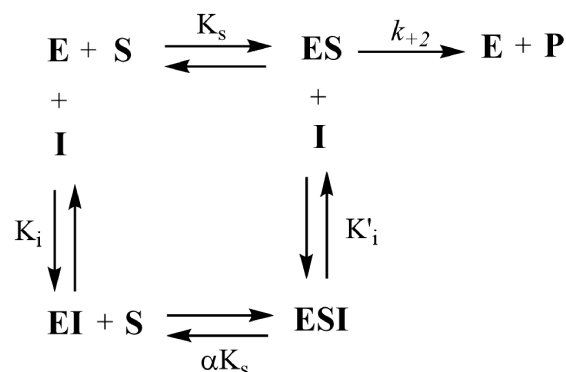
В 1982 году Morrison представил способ анализа кинетических зависимостей ферментативных реакций в присутствии ИМС [23]. Согласно поиску PubMed по ключевым словам “slow-binding”, “inhibitors”, “enzyme” к настоящему времени описано более 500 примеров ИМС, из которых 50 работ были опубликованы за последние 5 лет. Интерес к подобным соединениям обусловлен тем, что вне зависимости от их фармакокинетики в кровотоке они обладают высокой аффинностью к мишени-ферменту и длительным временем удержания [24, 25]. Поэтому в настоящее время ведется поиск и разработка новых ИМС — потенциальных ЛВ для лечения различных заболеваний [26–29]. Установление механизмов медленного ингибирования на этапе разработки *in vitro* оценки ЛВ позволяет предсказать более длительное время действия ЛВ и одновременно уменьшить его дозу и побочное действие [30] и тем самым спрогнозировать эффективность и безопасность будущего лекарственного препарата в условиях *in vivo* [31, 32].

Настоящий обзор направлен на рассмотрение механизмов связывания ингибиторов медленного связывания с ферментами, принципов распознавания ИМС на этапе *in vitro* исследований. В обзоре рассмотрены примеры прочносвязанных ингибиторов, обладающих высоким сродством и функциональностью в одном диапазоне концентраций с ферментом ( $[E] \sim [I]$ ) [30], которые в большинстве случаев являются необратимыми ингибиторами. В первой части обзора представлены теоретические основы ИМС. Во второй и третьей частях описываются способы распознавания ИМС, ход анализа кинетических зависимостей и определение параметров и типа механизмов ферментативной реакции, характеризующих ИМС. В заключительной части приведены встречающиеся в литературе примеры ИМС.

## 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Общая схема механизма взаимодействия фермента (E) и субстрата (S) с образованием продукта реакции (P) в присутствии ингибиторов (I) представлена на рисунке 1 и, как правило, описывается моделью Михаэлиса-Ментен.

Константа ингибирования ( $K_i$ ), численно равная концентрации ингибитора, которая связывает 50% фермента, и измеряемая в моль/л, — один из основных параметров ферментативной реакции. Чем ниже значение  $K_i$ , тем меньшее количество ингибитора необходимо для достижения эффекта, т.е. ниже доза ЛВ, и меньше побочных эффектов, а именно фармако-токсикологического действия на второстепенных мишенях. Поэтому в настоящее время наибольший интерес представляют ингибиторы, проявляющие эффект в нано- и пикомолярной области концентраций.  $K_i$  зависит от констант скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ) комплекса фермент-ингибитор (EI) (уравнение 1):



**Рисунок 1.** Общая схема действия классических обратимых ингибиторов, где  $K_s$  — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса,  $K_i$  и  $K'_i$  — константы ингибирования (константы диссоциации комплексов фермент-ингибитор),  $k_{+2}$  — константа скорости образования продукта реакции и свободного фермента.

$$K_i = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (1).$$

$k_{on}$  отражает энергетический барьер реакции связывания фермента и ингибитора и её значение обычно находится в пределах  $10^3$ – $10^8$   $M^{-1}s^{-1}$ .  $k_{off}$  описывает термодинамическую стабильность комплекса EI и измеряется в обратных секундах  $s^{-1}$  [33, 34]. Значение  $k_{off}$  меняется в зависимости от механизма действия фермента и ингибитора. Например, в одной из недавно опубликованных работ в ходе компьютерной симуляции кинетических зависимостей ингибирования фермента и последующего анализа данных показано, что с изменением  $k_{off}$  от 100  $s^{-1}$  до 0,0001  $s^{-1}$  происходит изменение типа ингибирования с конкурентного на бесконкурентный [35].

ИМС характеризуются медленным связыванием с ферментом и далее медленной диссоциацией, поэтому для описания токсико-фармакологических свойств ИМС необходимо ввести ряд кинетических параметров. В качестве таких параметров используют величины, обратные константе скорости диссоциации  $k_{off}$ : время удержания ( $\tau_R$ ) (уравнение 2) и время полудиссоциации комплекса фермент-ингибитор ( $t_{1/2}$ ) (уравнение 3) [1]:

$$\tau_R = \frac{1}{k_{off}} \quad (2);$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{off}} \quad (3).$$

$\tau_R$  может дать более полное понимание о динамической природе взаимодействий ЛВ с мишенью в условиях *in vivo* [36]. В общем случае,  $\tau_R$  — это “время жизни” комплекса лекарство-мишень, т.е. время, в течение которого лиганд и мишень находятся в связанном состоянии. Чем выше это значение, тем дольше ингибитор связан с ферментом-мишенью и тем дольше будет проявляться эффект ЛВ *in vivo*, что может позволить уменьшить дозу приёма и пролонгировать фармакологический эффект [37].

$k_{on}$  также играет важную роль в определении времени удержания, в первую очередь из-за эффекта повторного связывания (rebinding) [7]. Данный эффект заключается в том, что в ограниченном пространстве (в синапсах или в органеллах), где концентрация ингибитора на мишени будет высокой, при диссоциации комплекса ЕИ ингибитор может снова связаться с этой же мишенью или с любой другой мишенью, находящейся рядом [4]. Этот эффект способствует увеличению времени действия ЛВ, так как оно дольше находится в связанном состоянии, несмотря на его быструю фармакокинетику. Эффект повторного связывания будет зависеть не только от высокой концентрации ЛВ на мишени и ограниченного пространства, но и от  $k_{on}$ : чем выше  $k_{on}$ , тем быстрее образуется комплекс ЕИ [38].

Для эффективных ингибиторов ферментов значения  $K_i$  должны быть как можно ниже (в нано/пиколярных концентрациях), а  $\tau_R$  как можно выше, вплоть до нескольких минут. Однако при высоких значениях  $\tau_R$ , когда стадия диссоциации комплекса ЕИ очень медленная, ингибирование можно считать необратимым. Поэтому кинетические исследования ингибиторов ферментов должны быть дополнены молекулярным докингом и молекулярной динамикой для понимания молекулярных механизмов связывания ингибитора с ферментом, что позволит определить расчётные параметры и даст представление о том, какие соединения необходимо исследовать экспериментальными методами [39–41].

## 2. АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАВИСИМОСТЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИНГИБИТОРОВ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Для классических обратимых ингибиторов стационарное состояние в системе фермент-ингибитор-субстрат (E-I-S) достигается за микросекунды. Для ингибиторов медленного связывания такое состояние может достигаться за несколько секунд, минут и даже часов [2, 42], т.е. стационарное состояние системы достигается спустя некоторое время.

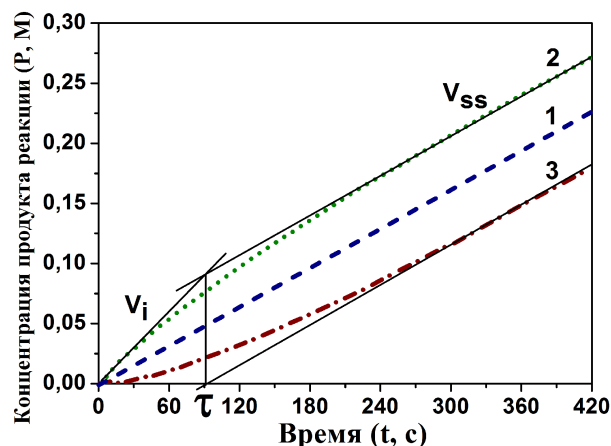
Для классических ингибиторов при стационарном состоянии наблюдается линейный рост концентрации продукта реакции [P] во времени при условии избытка субстрата (рис. 2, линия 1), описываемый уравнением (4):

$$[P] = V \times t \quad (4),$$

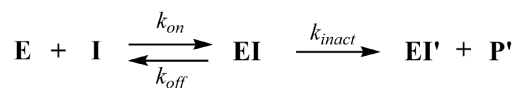
где [P] — концентрация продукта реакции;  $t$  — время;  $V$  — скорость реакции при стационарном состоянии для классического ингибитора.

Для ИМС (рис. 2, линии 2,3) кинетические зависимости нелинейные и подчиняются экспоненциальному уравнению (5) [19, 20]:

$$[P] = V_{ss} \times t + \frac{(V_i - V_{ss}) \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})}{k_{obs}} \quad (5),$$



**Рисунок 2.** Графики роста концентрации продукта реакции во времени в присутствии классического ингибитора (линия 1) и ИМС (линии 2 и 3) без предварительного инкубирования (линия 2) и с предварительным инкубированием (линия 3). График построен на основе литературных данных [23, 30, 48].



**Рисунок 3.** Схема механизма старения фермента в присутствии ингибитора, где EI' — необратимо модифицированный комплекс фермент-ингибитор, P' — уходящая группа.

где [P] — концентрация продукта реакции;  $t$  — время;  $V_{ss}$  — скорость реакции при стационарном состоянии;  $V_i$  — начальная скорость реакции;  $k_{obs}$  — константа скорости первого порядка.

В ходе усложнения механизма реакции, например, при необратимой химической модификации комплекса EI, когда  $V_{ss} = 0$  (рис. 3), уравнение (5) упрощается до уравнения (6):

$$[P] = \frac{V_i \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})}{k_{obs}} \quad (6).$$

Как видно из рисунка 2, типичные зависимости ИМС без предварительной инкубации с ферментом, при условии, что субстрат находится в избытке, выглядят следующим образом: 1) резкий старт с начальной скоростью  $V_i$ ; 2) снижение скорости реакции до  $V_{ss}$  в результате установления стационарного состояния системы; 3) время индукции  $\tau$  (lag time) [43, 44], т.е. момент времени, при котором концентрация продукта при начальной скорости и при скорости стационарного состояния была бы одинакова. Обратная величина  $\tau$  равна  $k_{obs}$  (уравнение 7) [28]:

$$\tau = \frac{1}{k_{obs}} \quad (7).$$

В некоторых случаях связывание ингибитора и фермента происходит довольно долго [42], поэтому ферментативную реакцию проводят с предварительной инкубацией фермента с ИМС в течение некоторого времени, необходимого для формирования устойчивого комплекса EI.

Во время инкубации устанавливается равновесие между ферментом и ингибитором. В результате медленной стадии диссоциации комплекса EI на начальном отрезке кинетической зависимости 3 (рис. 2) наблюдается небольшой угол наклона, а рост продукта реакции при стационарном состоянии происходит лишь спустя некоторое время. В этом случае начальная скорость  $V_i$  будет ниже, чем скорость стационарного состояния [30]. В литературе описаны также случаи, когда после инкубации фермента с ингибитором начальная скорость реакции не изменялась по сравнению с реакцией, проведённой без инкубации, так как ингибирование происходило только в присутствии субстрата [45].

Графики зависимости  $V_i$ ,  $V_{ss}$  и  $k_{obs}$  от концентрации ингибитора позволяют определить тип и механизм действия ИМС. Как правило, тип любого ингибитора определяется графическим методом путём построения зависимостей  $1/V_{ss}$  от концентрации ингибитора (график Диксона) и  $[S]/V_{ss}$  от концентрации ингибитора (график Корниш-Боудена) [46].

Определить тип ингибирования можно и с помощью графиков зависимости  $k_{obs}$  от концентрации субстрата. Tian и Tsou показали связь между значением  $k_{obs}$  и концентрацией субстрата для конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного типов ингибирования [30, 47]. Так, для неконкурентного ингибитора величина  $k_{obs}$  не зависит от концентрации субстрата (рис. 4, кривая 1). Для бесконкурентного ингибитора значения  $k_{obs}$  будут увеличиваться с повышением концентрации субстрата (рис. 4, кривая 2). Для конкурентного медленно-связывающегося ингибитора наблюдается понижение  $k_{obs}$  с увеличением концентрации субстрата (рис. 4, кривая 3).

## 3. МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Предложено три механизма ферментативной реакции, протекающей в присутствии медленно-связывающихся ингибиторов (рис. 5) [23, 30, 48].

### 3.1. Механизм А

Схема реакции в присутствии ИМС, протекающая по механизму А, представлена на рисунке 5А. Как видно из этого рисунка — это одноступенчатый процесс, который характеризуется медленной стадией связывания ингибитора с ферментом и образованием комплекса EI и далее медленной стадией диссоциации этого комплекса. Для механизма А  $k_{off} = k_{-3}$  и  $k_{on} = k_{+3}$ .

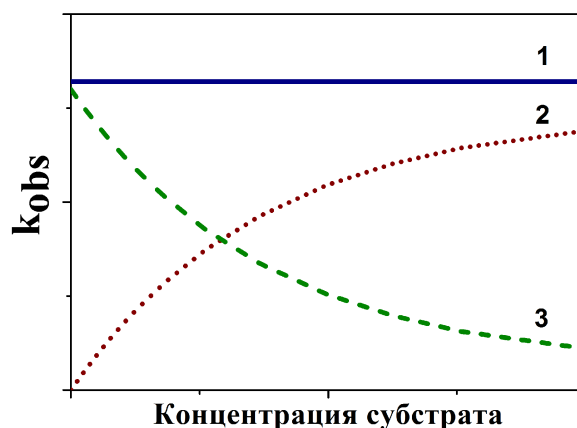


Рисунок 4. График зависимости  $k_{obs}$  от концентрации субстрата для неконкурентного (1), бесконкурентного (2) и конкурентного (3) типов ингибирования [30, 47].

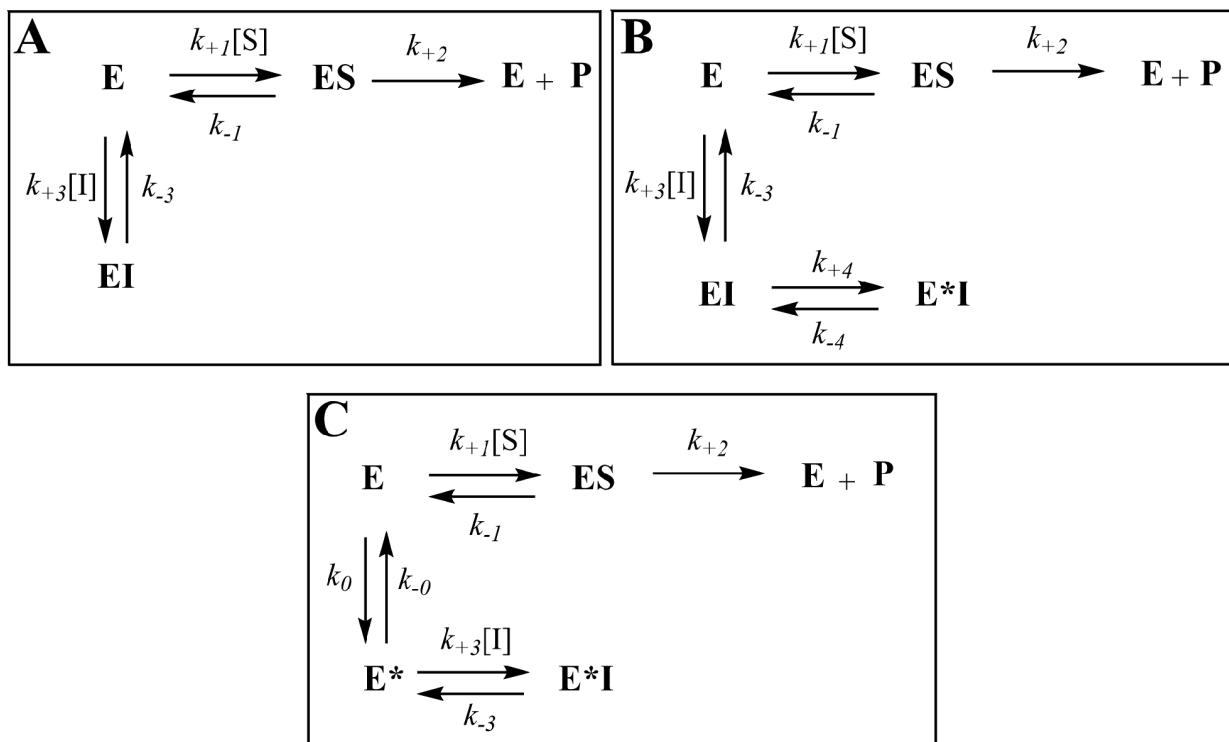


Рисунок 5. Механизмы А, В, С ферментативной реакции в присутствии ИМС.

Отношение констант скоростей ассоциации ( $k_{+3}$ ) и диссоциации ( $k_{-3}$ ), как для классических ингибиторов, равно константе ингибирования ( $K_i$ ). Механизм ассоциации/диссоциации комплекса EI описывается приведённым выше уравнением (1). Для механизма А зависимость  $k_{obs}$  от концентрации ингибитора будет линейна и описывается уравнением (8), а начальная скорость реакции  $V_i$  не зависит от концентрации ингибитора (рис. 6А):

$$k_{obs} = k_{-3} + \frac{k_{+3}[I]}{1 + [S]/K_m} \quad (8)$$

Константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор ( $k_{-3}$ ) будет определяться как отсечение на оси ординат (рис. 6А).

### 3.2. Механизм В

В случае протекания реакции по механизму В (рис. 5В) ингибитор “классически” связывается с ферментом с образованием комплекса EI, после чего происходит его медленная изомеризация в другую конформацию ( $E^*I$ ). Эта изомеризация может быть также связана с медленным переносом ингибитора от начального сайта связывания к конечному. Так, первая константа ингибирования (взаимодействие фермента Е и ингибитора I) описывается уравнением (1), но ассоциация/диссоциация проходит быстро, как для классических ингибиторов. Вторая константа ингибирования ( $K_i^*$ ), связанная с изомеризацией комплекса  $E^*I$ , описывается уравнением (9) при условии, что ингибитор находится в избытке ( $I \gg E$ ). Этот механизм часто называют моделью индуцированного соответствия:

$$K_i^* = \frac{[E][I]}{[EI] + [E^*I]} = \frac{K_i k_{-4}}{k_{+4} + k_{-4}} \quad (9)$$

При таком механизме реакции медленными стадиями могут быть как изомеризация EI в  $E^*I$  (константа скорости  $k_{+4}$ ), так и обратный процесс превращения  $E^*I$  в EI (константа скорости  $k_{-4}$ ). В некоторых случаях, когда  $k_{-4} \ll k_{+4}$  (то есть, когда обратная изомеризация фермента в исходную конформацию проходит намного медленнее прямого процесса)  $k_{-4}$  считают незначительной и сам процесс необратимым [49]. Для механизма В  $k_{off}$  описывается уравнением (10):

$$k_{off} = \frac{k_{-3} k_{-4}}{k_{-3} + k_{+4} + k_{-4}} \quad (10)$$

При механизме В зависимость  $k_{obs}$  от концентрации ингибитора является выпукло-гиперболической (рис. 6В) и аппроксимируется нелинейным уравнением (11). При этом пересечение зависимости с осью ординат дает значение  $k_{-4}$  (рис. 6В). Начальная скорость реакции  $V_i$  от концентрации ингибитора также будет зависеть гиперболически:

$$k_{obs} = k_{-4} + \frac{k_{+4}[I]}{K_i(1 + [S]/K_m) + [I]} \quad (11)$$

### 3.3. Механизм С

В случае механизма С (рис. 5С) две формы фермента (Е и  $E^*$ ) находятся в медленном равновесии друг с другом (гистерезисное поведение фермента), и только одна форма фермента быстро связывается с ингибитором (однако не исключено возможное существование более сложной модели, в которой связывание ингибитора медленное с обеими конформациями), вызывая изомеризацию фермента в конформацию, способную связаться с ингибитором ( $E \rightleftharpoons E^*$ ). Этот механизм часто называют моделью конформационной селекции [23].

Для механизма С  $k_{off} = k_{-3}$ . Зависимость  $k_{obs}$  от концентрации ингибитора, представленная на рисунке 6С, вогнуто-гиперболическая и описывается уравнением (12):

$$k_{obs} = \frac{k_{-0}}{1 + [I]/K_i} + \frac{k_0}{1 + [S]/K_m} \quad (12)$$

### 3.4. Необратимые и квази-необратимые ИМС

В большинстве случаев медленное ингибирование обратимо. Однако при усложнении механизма возможны и необратимые этапы, которые приводят к инактивации фермента (рис. 3). Конформационные превращения комплекса EI могут вызвать изменения в стабильности фермента, например, уменьшать его конформационную пластичность с образованием более жёсткой структуры [50, 51].

Так, после обратимого медленного ингибирования возможен ковалентный этап, в результате чего между ингибитором и активным центром фермента образуется ковалентная связь. Наиболее часто подобное наблюдается для ингибиторов — аналогов переходного состояния. В частности, такой тип ингибирования был показан Mucha и соавт. для металлоаминопептидаз [52]. Исследование механизма медленного ковалентного ингибирования

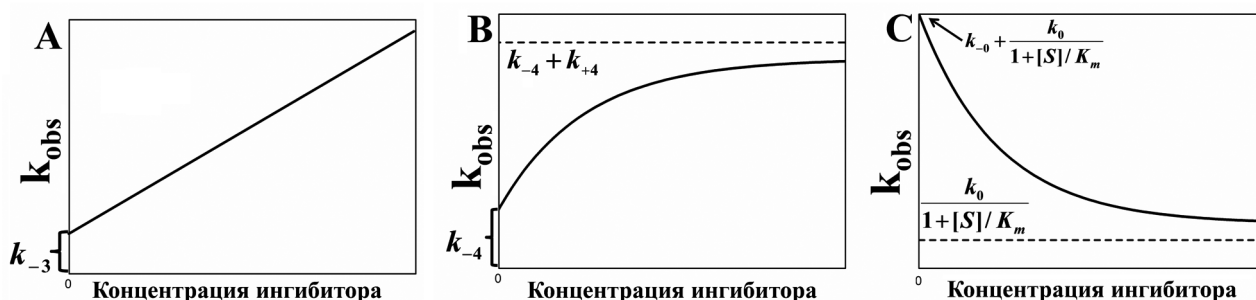


Рисунок 6. Графики зависимости  $k_{obs}$  от концентрации ингибитора для механизмов А, В, С ферментативной реакции в присутствии ИМС.

## ИНГИБИТОРЫ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ

аминопептидаз подобными ингибиторами (производными амастатина и бестатина) [53, 54] показало, что он соответствует механизму ИМС типа В (рис. 5В). После медленной изомеризации комплекса EI в E\*I следует этап, в результате которого между E\* и I образуется ковалентная связь. Другие примеры ингибиторов переходного состояния, вызывающие ковалентное медленное ингибирование, были рассмотрены ранее [17]. Например, трифлуорокетон (ТФК; 1-(3-*трет*-бутилфенил)-2,2,2-трифлуороэтанон) — ИМС ацетилхолинэстеразы человека типа В с  $\tau_R = 20$  мин — после связывания с ферментом образует гемикетальную связь с остатком серина активного центра. Деацилирование серина активного центра под действием воды происходит медленно, и активность фермента восстанавливается через 40 мин [55]. Необратимому ингибированию холинэстераз путём фосфорилирования серина активного центра могут предшествовать медленные стадии связывания. В частности, крезилсалигенин фосфат — активный метаболит три-*орто*-крезилфосфата — является необратимым ИМС холинэстераз типа С [56, 57].

### 3.5. Аллостерические ферменты и ИМС

Механизмы, описанные выше, характерны для ферментов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса-Ментен. Однако существуют более сложные механизмы. Например, неподчинение кинетике Михаэлиса-Ментен из-за активации или ингибирования фермента избытком субстрата, которые возникают в результате некооперативных конформационных изменений [58], или из-за аллостерических эффектов в олигомерных ферментах, возникающих в результате кооперативности между субъединицами. В первом случае, во избежание усложнённой кинетики при высоких концентрациях субстрата [59],

рекомендуется исследовать обратимое ингибирование при низких концентрациях субстрата, то есть при условиях, в которых фермент подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. Во втором случае, для аллостерических ферментов, которые подчиняются классической согласованной модели Моно-Уаймена-Шанжё (МУШ) или последовательной модели Кошланда-Немети-Филмера, связывание аллостерических эффекторов с сайтами связывания, отличными от активного центра, вызывает конкурентное или неконкурентное ингибирование [60]. В этом случае графический кинетический анализ ингибирования медленного связывания может быть затруднён из-за взаимодействий между пространственной и кинетической кооперативностью. Различные случаи и формальные методы кинетического анализа описаны Segel [61]. Теоретический кинетический анализ ИМС аллостерических ферментов был выполнен для ИМС типа С модели МУШ [62]. Такой подход показывает сложность анализа подобных случаев и необходимость очень точных экспериментальных данных. В любом случае, кинетический анализ ИМС аллостерических ферментов должен сопровождаться молекулярным моделированием (молекулярным докинг и молекулярной механикой) и биофизическими методами для изучения конформационных изменений. Поэтому необходима комбинация различных подходов, сочетающая кинетический и структурный анализ ферментов [63–65].

## 4. ПРИМЕРЫ ИНГИБИТОРОВ МЕДЛЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ МЕХАНИЗМОВ

В литературе существует множество примеров ИМС для различных ферментов-мишеней (табл. 1).

Таблица 1. Примеры ИМС – константы, механизмы, время удержания

Фермент-мишень	Механизм	Ингибитор	$K_i$ , нМ	$\tau_R$ , мин	Ссылка
АХЭ	А	Фасцикулин-2	0,331	14,5	[66]
		Фасцикулин-2	0,0023	227	[67]
		$\alpha$ -Токоферол	4900 ( $K_i$ ) / 1600 ( $K_i'$ )	2	[57]
		Гуперзин А	40,5	50,5	[70]
	В	С-547	0,022	20	[78]
БХЭ	С	Крезилсалигенинфосфат	—	—	[62]
Тирозиназа	А	2-Флорозкол	8200	12,8	[72]
	В	2-О-(2,4,6-тригидроксифенил)-6,6'-биэкол	5800	—	
	А	Пуэрол А	107,5	333	[73]
Нейраминидаза	А	Производные хроменонов	310–460	20–24	[74]
РТР1В	А	Теафлаванозид IV	0,2	8,3	[76]
	А	Угонин J	123,4	14	[77]
LpxC	А	Производные пиридонметилсульфона	0,010–0,274	5–124	[83]
20S протеасома	А	Иксазомиб	4,9	7,2	[85]
	А	Боргезомиб	1,6	43,8	
	А	Деланзомиб	1,4	138	
Плазмин	А	Макроциклы с С-концевой бензиламиновой группой	1,83–16,80	4,4–13,7	[86]
Уреаза	А	Фосфоновые кислоты на основе коричной кислоты	509–6040	6,8–24,4	[87]

## 4.1. Природные ИМС

Природный полипептид нейротоксин — фасцикулин, содержащийся в яде зелёной мамбы (*Dendroaspis angusticeps*) — один из самых известных примеров ИМС типа А, обладающий высокой аффинностью и селективностью к ацетилхолинэстеразе (АХЭ).  $K_i$  в отношении АХЭ угря *Electrophorus electricus* составляет 0,33 нМ с временем удержания около 14,5 мин [66]. Его сродство к АХЭ млекопитающих намного сильнее, например, в отношении АХЭ мыши  $K_i = 0,002$  нМ, а время удержания намного больше [67], именно поэтому яд зелёной мамбы очень опасен. Подобное сильное ингибирование связано с тем, что токсин перекрывает вход в канал активного центра фермента. Бутирилхолинэстераза (БХЭ) имеет меньшее сродство к фасцикулину (на восемь порядков,  $K_i = 0,21$  мМ). Замена трёх аминокислотных остатков в структуре АХЭ Tyr72Asn, Tyr124Gln, Trp286Arg, расположенных на периферическом участке связывания (начальном участке связывания лигандов), на соответствующие аминокислотные остатки, как в структуре БХЭ, также приводило к понижению сродства фасцикулина к ферменту ( $K_i = 0,23$  мМ).

$\alpha$ -Токоферол (витамин Е) является ещё одним примером обратимого ИМС по типу А фермента АХЭ человека (рис. 7). Анализ кинетики стационарного состояния, проведённый методом Эллмана с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолина, показал, что  $\alpha$ -токоферол взаимодействует с АХЭ человека по смешанному типу с константами ингибирования  $K_i = 0,49$  мкМ и  $K'_i = 1,6$  мкМ, а время удержания  $\alpha$ -токоферола составило 2 мин. Моделирование молекулярной динамики подтвердило, что  $\alpha$ -токоферол образует множественные неспецифические взаимодействия с поверхностью АХЭ вблизи входа в ущелье, связываясь с периферической стороной и далее медленно скользя вниз по ущелью до каталитического активного центра, не вызывая значительных конформационных изменений фермента (рис. 8) [57]. Полученные результаты согласуются с константой ингибирования АХЭ электрического угря (*Electrophorus electricus*)  $\alpha$ -токоферол гемисукцинатом [68].

В 1998 году Sepčić и соавт. обнаружили, что первые 20 мин ингибирования АХЭ полимером, содержащим N-бутил(3-бутилпиридиниевые) мономерные звенья из морской губки *Reniera sarai*,

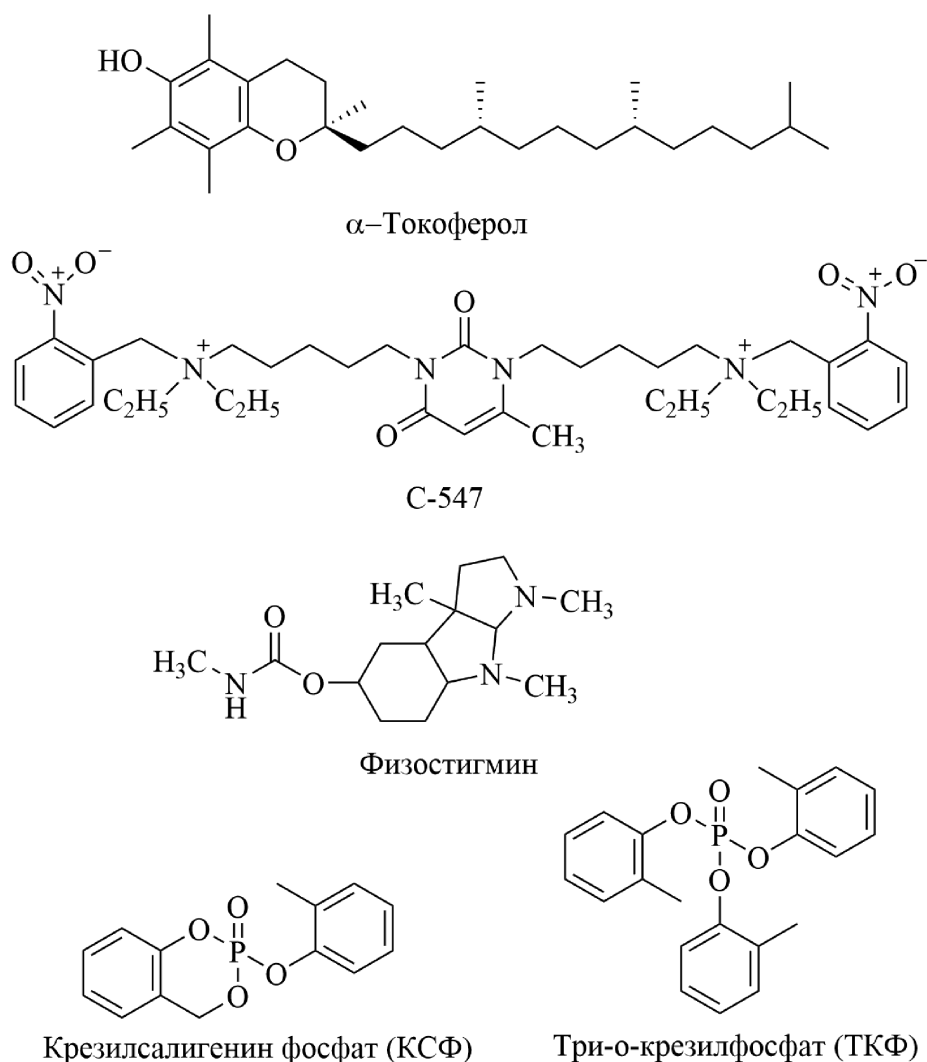
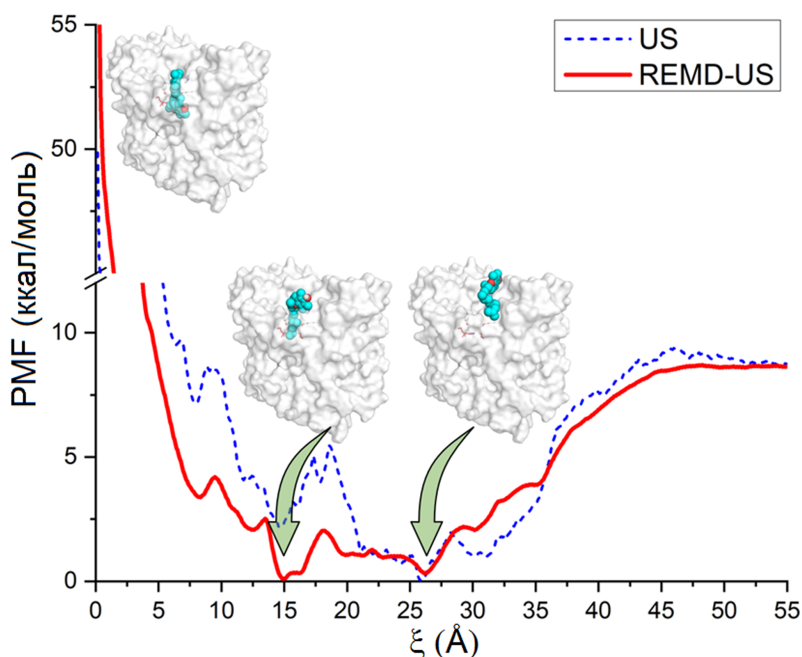


Рисунок 7. Структуры ингибиторов медленного связывания в отношении АХЭ и БХЭ.





**Рисунок 8.** Профиль свободной энергии связывания  $\alpha$ -токоферола с АХЭ человека. US (Umbrella sampling) и REMD-US (Replica exchange molecular dynamics) – методы молекулярной динамики. PMF (Potential mean force) – потенциал средней силы.  $\xi$  – расстояние между хроманольным кольцом  $\alpha$ -токоферола и активным центром фермента АХЭ [57] (с разрешения Elsevier).

характеризовались нелинейной кинетикой во времени. Авторы предположили, что полимер быстро образует обратимый комплекс АХЭ-полимер, а затем происходит медленное связывание остатков пиридиния полимера на других сайтах связывания АХЭ [69].

Алкалоид гуперзин — ещё один пример ИМС типа А по отношению к АХЭ и БХЭ человека. Найденные параметры каталитической реакции составляют  $K_i = 40,5$  нМ с временем полудиссоциации  $t_{1/2} = 35$  мин и, соответственно, временем удержания около 50,5 мин и  $K_i = 42$  мкМ для БХЭ человека [70].

Обратимым ИМС типа В для реакции с БХЭ является алкалоид физостигмин (эзерин) (рис. 7). Установлено, что на начальном этапе реакции происходит быстрое, но относительно слабое связывание эзерина с активным центром фермента с дальнейшим образованием конформационного комплекса EI\*. После чего наблюдается карбамилрование серина активного центра фермента и далее самая медленная стадия — деацилирование [71].

Группа из Кореи [72] исследовала несколько флоротаннинов, выделенных из морских бурых водорослей *Ecklonia cava* (семейство Laminariaceae), на ингибирующую активность в отношении тирозиназы (ЕС 1.14.18.1) — ключевого металлофермента, отвечающего за процессы, связанные с выработкой меланина для защиты кожи от ультрафиолетового излучения и активных форм кислорода, и нейромеланина, связанного с процессами нейродегенерации и болезнью Паркинсона. Авторами было установлено, что два соединения, имеющие значения  $IC_{50}$  менее 10 мкМ, относятся к ИМС типа А и В с каталитическими параметрами:

для 2-флорозкол ( $K_i = 8,2 \pm 1,1$  мкМ, время удержания 12,8 мин) и 2-О-(2,4,6-тригидроксифенил)-6,6'-бизкол ( $K_i = 5,8 \pm 0,8$  мкМ). Методом молекулярного моделирования подтверждено, что данные молекулы связывались с аминокислотными остатками His85 и Asn260 активного центра тирозиназы. Исследование фенольных соединений, выделенных из метанольных экстрактов корней *Amorpha fruticosa* этой же группой, показало, что один из компонентов — пуэрол А — является обратимым, конкурентным ИМС с константой скорости диссоциации  $0,003$  мин<sup>-1</sup> и, соответственно, временем удержания 333 минуты [73].

Производные хроменонов, выделенные из метанольных экстрактов корневой части растения *Flemingia philippinensis*, включая два новых соединения филиппин D и E, проявляли свойства обратимых конкурентных ИМС типа А бактериальной нейрамидазы, играющей ключевую роль в патогенезе ряда микробных заболеваний, высвобождении воспалительных цитокинов, сепсисе и развитии биоплёнки. Константы ингибирования для филиппинов D и E составили  $0,46 \pm 0,07$  мкМ и  $0,31 \pm 0,02$  мкМ, а время удержания 24 мин и 20 мин соответственно [74]. Данные были подтверждены методом молекулярного моделирования. Другой группой был проведён глубокий анализ, включающий молекулярные докинг и молекулярную динамику, свидетельствующий о том, что ингибиторы нейрамидазы — ксантоны, содержащие гераниловые и пренильные группы, выделенные из коры корней растения *Cratoxylum cochinchinense*, — обладали высокой аффинностью и низкими константами ингибирования ( $IC_{50}$  варьировало в диапазоне 0,38–38,9 мкМ). Время удержания соединения-лидера составило 49 мин [75].



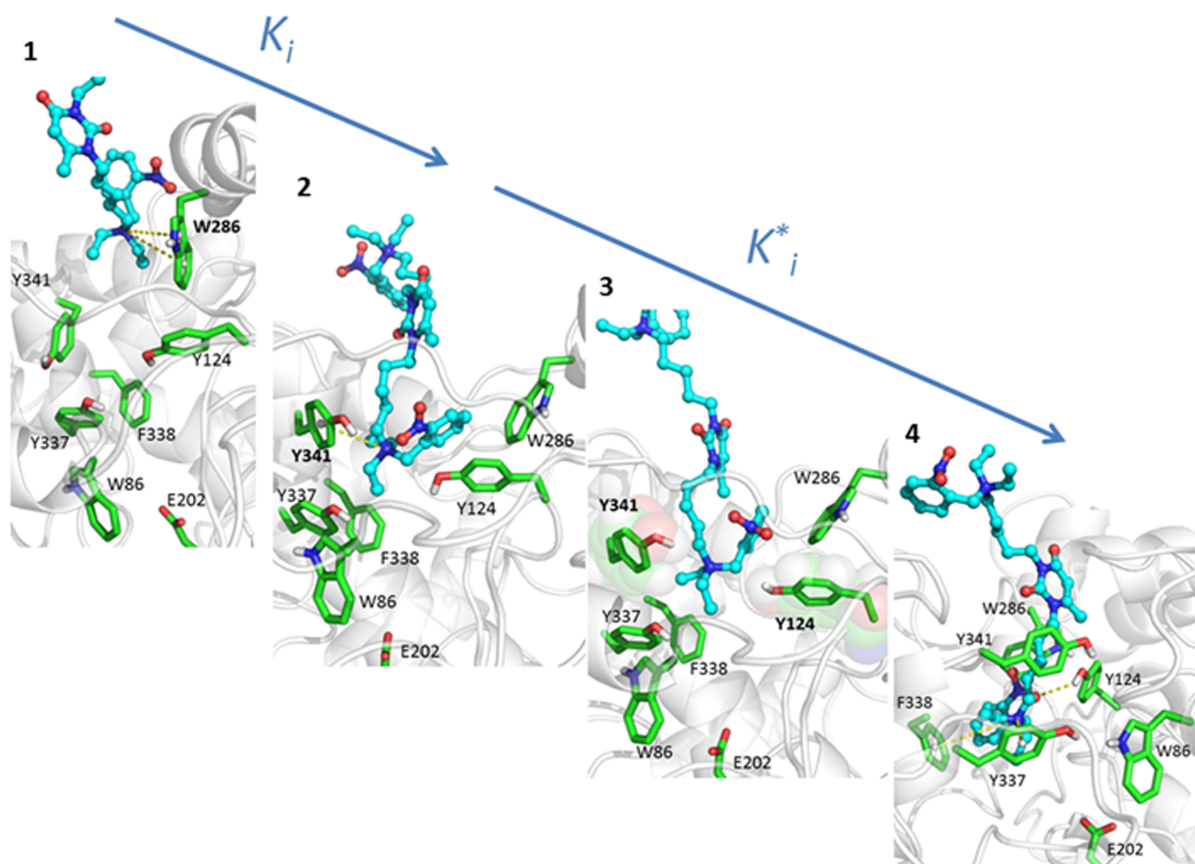
Сверхэкспрессия одного из ключевых ферментов протеин-тирозинфосфатазы (1BPTP1B) приводит к резистентности к инсулину и в конечном итоге к гипергликемии и метаболическим нарушениям, которые являются важными патогенными причинами сахарного диабета и ожирения. Теафлаванозид IV ( $IC_{50} = 8,7 \pm 1,1$  мкМ) и кофеин ( $IC_{50} = 37,9 \pm 3,5$  мкМ), выделенные из метанольного экстракта скорлупы семян *Camellia sinensis*, ингибировали PTP1B, также как и урсоловая кислота ( $IC_{50} = 22,4 \pm 1,9$  мкМ) — конкурентный ингибитор данного фермента, проявляющий смешанный ингибирующий эффект. Константа скорости диссоциации и время удержания теафлаванозида IV составили  $0,002$  мин<sup>-1</sup> и  $8,3$  мин соответственно [76]. Наибольшим сродством к тирозинфосфатазе 1B обладал выделенный из этилацетатного экстракта корней *Helminthostachys zeylanica* флавоноид угонин J, проявлявший свойства конкурентного ИМС с более длительным временем удержания ( $\tau_R = 14$  мин,  $k_{off} = 0,0705$  мин<sup>-1</sup>), кроме того, этот флавоноид также эффективно ингибировал  $\alpha$ -глюкозидазу [77].

#### 4.2. Синтетические ИМС

Алкиламмониевое производное 6-метилурацила под рабочим названием С-547 (рис. 7), разрабатываемое как препарат для лечения миастении, — пример ИМС, взаимодействующего с АХЭ человека по механизму В. Авторами показано [78], что образование исходного комплекса EI характеризуется константой

ингибирования  $K_i = 0,14$  нМ, а затем в ходе стадии индуцированного соответствия устанавливается конечный комплекс с  $K_i^* = 0,022$  нМ. Методом молекулярного моделирования подтверждено, что благодаря конформационным изменениям фермента для соединения С-547 становится возможным пересекать узкий участок канала активного центра АХЭ (“бутылочное горлышко”) с последующим образованием конечного комплекса (рис. 9). Найденное расчётное значение  $k_{off}$  составило  $0,05$  мин<sup>-1</sup>, а  $\tau_R$  —  $20$  мин. Однако в отношении БХЭ человека С-547 является классическим обратимым ингибитором смешанного типа с  $K_i = 1,77$  мкМ и  $K_i' = 3,17$  мкМ. В дальнейших работах было показано, что С-547 в дозе  $0,01$  мг/кг защищает мышей, отравленных параоксоном ( $2 \times LD_{50}$ ), в течение  $96$  ч [79].

Группа китайских исследователей занимается разработкой ингибиторов АХЭ нового поколения для терапии болезни Альцгеймера с целью снижения дозы лекарственных веществ и расширения терапевтического окна безопасности существующих препаратов. Так, были синтезированы 44 новых производных донепезила, содержащие атом фтора в структуре. Константы диссоциации комплекса фермент-ингибитор наиболее активных соединений варьировались в пределах  $0,004768$ – $0,01764$  с<sup>-1</sup>, что соответствует времени удержания около  $1$ – $3,5$  мин. Доклинические исследования фторпезила (DC20) показали, что данное соединение может быть



**Рисунок 9.** Молекулярное моделирование ингибирования АХЭ в присутствии соединения С-547 [2] (с разрешения Elsevier).

использовано в качестве ингибитора АХЭ нового поколения с установленным механизмом, высокой селективностью к фармакологической мишени и широким терапевтическим окном безопасности [80]. В настоящее время проводятся клинические испытания фторпезила [81].

С целью расширения терапевтического окна разрабатываемых ингибиторов металлофермента UDP-3-O-(R-3-гидроксимиристоил)-N-ацетилглюкозаминдеацетилазы (LpxC) был проведён синтез новых соединений на основе пиридонсульфонамида и исследована взаимосвязь структура-кинетические свойства [82]. Данные соединения проявили ингибирующую активность в отношении LpxC с различным временем удержания на мишени [83]. Известно, что LpxC участвует в процессе биосинтеза липида А — важного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий. В настоящий момент ни один из ингибиторов LpxC не прошёл клинические испытания. Разработка нового соединения со временем удержания до 124 мин и значениями постантибиотического эффекта 4 ч открывает перспективы для создания новых ингибиторов с увеличенным временем удержания на мишени, приводящем к удлинению постантибиотического эффекта после фазы элиминирования, т.е. лучшим терапевтическим окном. Медленным этапом являются конформационные изменения фермента при связывании ингибитора.

Разработка ингибиторов фермента гистондеацетилазы (HDAC) привела к созданию нескольких лекарственных препаратов для лечения рака [19]. Однако оказалось, что их терапевтическая эффективность ограничена из-за плохой селективности и проявляющихся побочных эффектов на физиологических функциях. Кроме того, известно, что HDAC зарекомендовала себя как мишень в регуляции иммунного ответа, в развитии невропатий и болезни Альцгеймера. Недавно было показано, что производные 1,3,4-оксидиазолов образуют комплексы HDAC-ингибитор с длительным временем удержания [84] и проявляют высокую селективность к данной мишени [51]. Полученные ИМС являются аналогами субстрата и образуют прочносвязанный комплекс с ферментом.

В 2018 году Hasinoff и Patel проведён анализ кинетических параметров известных противораковых препаратов для лечения множественной миеломы на основе бороновых кислот и эпоксикетонов — ингибиторов 20S протеасомы, а также исследования по повреждениям ими миоцитов и проявлениям побочных эффектов, связанных с кардиотоксичностью. Было установлено, что Иксазомиб ( $K_i = 4,9$  нМ), Бортезомиб ( $K_i = 1,6$  нМ) и Деланзомиб ( $K_i = 1,4$  нМ) являются ингибиторами медленного связывания в отношении 20S протеасомы со временем удержания равным 7,2 мин; 43,8 мин и более 138 мин, соответственно [85].

Часто повышенная активность плазима — трипсиноподобной сериновой протеазы, ключевого фермента фибринолиза — может вызвать нарушения свертываемости крови. Поэтому Wiedemeyer и соавт.

в 2023 году синтезировали серию высокоактивных и селективных макроциклических ингибиторов плазима с константами ингибирования в пределах 1,83–16,8 нМ и временем удержания 4,4–13,7 мин. Механизмы связывания макроциклов объясняют их высокую селективность в качестве ингибиторов плазима [86].

Ингибиторы, содержащие фосфонатные/фосфинатные группы, обладают сродством к металлогидролазам, включая металлопротеазы, и другие гидролазы, такие как уреазы. Разработка ингибиторов уреазы обусловлена их применением для лечения различных патогенов, связанных с инфекциями, вызванными уреазой-зависимыми микроорганизмами, например, язвой этиологии *Helicobacter pylori* или хроническими инфекциями мочевыводящих путей, колонизированных видами *Proteus*. Поиск ингибиторов с высоким сродством к бактериальным уреазам сосредоточен на синтезе нескольких групп активных соединений на основе фосфонатов/фосфинатов. Одним из примеров являются фосфоновые кислоты на основе коричной кислоты — ИМС *Sporosarcina pasteurii* уреазы с константами ингибирования 0,509–6,040 мкМ и временем удержания 6,8–24,4 мин [87]. Наиболее активными оказались ИМС уреазы — фосфонаты или (2-карбоксиэтил)фосфинаты на основе катехола [88], кинетические параметры исследуемых ингибиторов составили  $K_i^* = 0,13$  мкМ и  $\tau_R = 205$  мин.

Из примеров, представленных выше, видно, что интерес к ИМС связан с тем, что они проявляют длительное время удержания. За последние несколько лет этот параметр стал незаменимым показателем эффективности соединения на ранней стадии разработки и открытия лекарственных препаратов [4, 37, 89].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепция, предложенная Copeland и представленная в данном обзоре, подтверждает важность стадии мониторинга и оптимизации кинетики препарата с мишенью на этапе *in vitro* для поиска новых лекарственных веществ. Такие параметры, как время удержания, константа ингибирования, константы скорости ассоциации и диссоциации, определяют эффективность применения лекарственного вещества *in vivo*. Лекарства с быстрой фармакокинетикой, но долгим временем удержания будут иметь пролонгирующий эффект, что позволит распределить дозирование и достигнуть высокой эффективности с меньшими побочными эффектами. Поэтому ингибиторы медленного связывания представляют большой фармакологический интерес. Однако не нужно забывать афоризм Парацельса “Всё — яд, всё — лекарство; то и другое определяет доза”. Терапевтический интерес к таким соединениям — это всегда компромисс между аффинностью связывания и кинетикой связывания лигандов и рецепторов. Лиганды с высокой аффинностью и прочносвязанные ингибиторы с очень низким  $K_i$  ( $K_i \sim [E]$ ), но с очень долгим временем удержания, могут отличаться высокой

токсичностью. В частности, высокая токсичность может быть связана с расположением мишени в ограниченном пространстве (например, в синапсах, в митохондриях), где после диссоциации комплекса лиганд-мишень их повторное связывание способствует значительному увеличению времени пребывания лиганда на мишени.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Приоритет 2030).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов Д.В., Веселовский А.В. (2020) Кинетика связывания лиганда с рецептором в разработке лекарств. Биомедицинская химия, **66**(1), 42–53. [Borisov D.V., Veselovsky A.V. (2020) Ligand-receptor binding kinetics in drug design. Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(1), 42–53.] DOI: 10.18097/pbmc20206601042
2. Masson P., Lushchekina S.V. (2016) Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance. Arch. Biochem. Biophys., **593**, 60–68. DOI: 10.1016/j.abb.2016.02.010
3. Copeland R.A., Pompliano D.L., Meek T.D. (2006) Drug-target residence time and its implications for lead optimization. Nat. Rev. Drug Discov., **5**(9), 730–739. DOI: 10.1038/nrd2082
4. Knockenhauer K.E., Copeland R.A. (2024) The importance of binding kinetics and drug-target residence time in pharmacology. Br. J. Pharmacol., **181**(21), 4103–4116. DOI: 10.1111/bph.16104
5. Sharma S., Joshi S., Kalidindi T., Digwal C.S., Panchal P., Lee S.-G., Zanzonico P., Pillarsetty N., Chiosis G. (2023) Unraveling the mechanism of epichaperome modulation by zelavespib: biochemical insights on target occupancy and extended residence time at the site of action. Biomedicines, **11**(10), 2599. DOI: 10.3390/biomedicines11102599
6. Swinney D.C. (2004) Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success? Nat. Rev. Drug Discov., **3**(9), 801–808. DOI: 10.1038/nrd1500
7. Vauquelin G., Charlton S.J. (2010) Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong *in vivo* drug action. Br. J. Pharmacol., **161**(3), 488–508. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00936.x
8. Lu H., Tonge P.J. (2010) Drug-target residence time: critical information for lead optimization. Curr. Opin. Chem. Biol., **14**(4), 467–474. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.06.176
9. Tonge P.J. (2018) Drug-target kinetics in drug discovery. ACS Chem. Neurosci., **9**(1), 29–39. DOI: 10.1021/acscchemneuro.7b00185
10. Yang H., Li X., Li G., Huang H., Yang W., Jiang X., Sen M., Liu J., Liu Y., Pan Y., Wang G. (2021) Accurate quantitative determination of affinity and binding kinetics for tight binding inhibition of xanthine oxidase. Biomed. Pharmacother., **139**, 111664. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111664
11. Daryaei F., Tonge P.J. (2019) Pharmacokinetic-pharmacodynamic models that incorporate drug-target binding kinetics. Curr. Opin. Chem. Biol., **50**, 120–127. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.03.008
12. Dahl G., Akerud T. (2013) Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. Drug Discov. Today, **18**(15–16), 697–707. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.02.010
13. Lee K.S.S., Yang J., Niu J., Ng C.J., Wagner K.M., Dong H., Kodani S.D., Wan D., Morisseau C., Hammock B.D. (2019) Drug-target residence time affects *in vivo* target occupancy through multiple pathways. ACS Central Science, **5**(9), 1614–1624. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00770
14. Hoare S.R.J. (2021) The problems of applying classical pharmacology analysis to modern *in vitro* drug discovery assays: slow binding kinetics and high target concentration. SLAS Discovery, **26**(7), 835–850. DOI: 10.1177/24725552211019653
15. Zhang R., Wong K. (2017) High performance enzyme kinetics of turnover, activation and inhibition for translational drug discovery. Expert Opin. Drug Discov., **12**(1), 17–37. DOI: 10.1080/17460441.2017.1245721
16. Srinivasan B., Flórez Weidinger J.D., Zhai X., Lemercier G., Ikeda T., Brewer M., Zhang B., Heyse S., Wingfield J., Steigle S. (2022) High-throughput mechanistic screening of non-equilibrium inhibitors by a fully automated data analysis pipeline in early drug-discovery. SLAS Discovery, **27**(8), 460–470. DOI: 10.1016/j.slasd.2022.09.003
17. Lushchekina S.V., Masson P. (2020) Slow-binding inhibitors of acetylcholinesterase of medical interest. Neuropharmacology, **177**, 108236. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108236
18. Mukherjee A., Zamani F., Suzuki T. (2023) Evolution of slow-binding inhibitors targeting histone deacetylase isoforms. J. Med. Chem., **66**(17), 11672–11700. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01160
19. Bondarev A.D., Attwood M.M., Jonsson J., Chubarev V.N., Tarasov V.V., Schiöth H.B. (2021) Recent developments of HDAC inhibitors: emerging indications and novel molecules. Br. J. Clin. Pharmacol., **87**(12), 4577–4597. DOI: 10.1111/bcp.14889
20. Fridovich I. (1968) A study of the interaction of acetoacetic decarboxylase with several inhibitors. J. Biol. Chem., **243**(5), 1043–1051. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)93620-3
21. Wentworth D.F., Wolfenden R. (1974) Slow binding of D-galactal, a reversible inhibitor of bacterial  $\beta$ -galactosidase. Biochemistry, **13**(23), 4715–4720. DOI: 10.1021/bi00720a006
22. Wentworth D.F., Wolfenden R. (1975) Interaction of 3,4,5,6-tetrahydrouridine with human liver cytidine deaminase. Biochemistry, **14**(23), 5099–5105. DOI: 10.1021/bi00694a012
23. Morrison J.F. (1982) The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. Trends Biochem. Sci., **7**(3), 102–105. DOI: 10.1016/0968-0004(82)90157-8
24. Almeida L., Rocha J.F., Falcão A., Nuno Palma P., Loureiro A.I., Pinto R., Bonifácio M.J., Wright L.C., Nunes T., Soares-da-Silva P. (2013) Pharmacokinetics,

- pharmacodynamics and tolerability of opicapone, a novel catechol-o-methyltransferase inhibitor, in healthy subjects. *Clin. Pharmacokinet.*, **52**(2), 139–151. DOI: 10.1007/s40262-012-0024-7
25. Ren T., Zhu X., Jusko N.M., Krzyzanski W., Jusko W.J. (2022) Pharmacodynamic model of slow reversible binding and its applications in pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling: review and tutorial. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, **49**(5), 493–510. DOI: 10.1007/s10928-022-09822-y
  26. Kwon Y.-J., Lee J., Seo E.-B., Lee J., Park J., Kim S.-K., Yu H., Ye S.-K., Chang P.-S. (2024) Cysteine protease 129 propeptide from *Calotropis procera* R. Br. as a potent cathepsin L inhibitor and its suppressive activity in breast cancer metastasis. *Sci. Rep.*, **14**(1), 23218. DOI: 10.1038/s41598-024-73578-3
  27. Shah A.B., Baiseitova A., Lee G., Kim J.H., Park K.H. (2024) Analogues of dihydroflavonol and flavone as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the leaves of *Artocarpus elasticus*. *ACS Omega*, **9**(8), 9053–9062. DOI: 10.1021/acsomega.3c07471
  28. Chen Z., Du R., Cooper L., Achi J.G., Dong M., Ran Y., Zhang J., Zhan P., Rong L., Cui Q. (2023) Sulforaphane is a reversible inhibitor of 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, **95**(3), e28609. DOI: 10.1002/jmv.28609
  29. Graboski A.L., Simpson J.B., Pellock S.J., Mehta N., Creekmore B.C., Ariyaratna Y., Bhatt A.P., Jariwala P.B., Sekela J.J., Kowalewski M.E., Barker N.K., Mordant A.L., Borlandelli V.B., Overkleef H., Herring L.E., Jin J., James L.I., Redinbo M.R. (2024) Advanced piperazine-containing inhibitors target microbial  $\beta$ -glucuronidases linked to gut toxicity. *RSC Chem. Biol.*, **5**(9), 853–865. DOI: 10.1039/D4CB00058G
  30. Copeland R.A. (2013) In: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. Wiley, 538 p. DOI: 10.1002/9781118540398
  31. de Witte W.E.A., Danhof M., van der Graaf P.H., de Lange E.C.M. (2016) *In vivo* target residence time and kinetic selectivity: the association rate constant as determinant. *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**(10), 831–842. DOI: 10.1016/j.tips.2016.06.008
  32. Walkup G.K., You Z., Ross P.L., Allen E.K.H., Daryaei F., Hale M.R., O'Donnell J., Ehmann D.E., Schuck V.J.A., Buurman E.T., Choy A.L., Hajec L., Murphy-Benenato K., Marone V., Patey S.A., Grosser L.A., Johnstone M., Walker S.G., Tonge P.J., Fisher S.L. (2015) Translating slow-binding inhibition kinetics into cellular and *in vivo* effects. *Nat. Chem. Biol.*, **11**(6), 416–423. DOI: 10.1038/nchembio.1796
  33. Spassov D.S. (2024) Binding affinity determination in drug design: insights from lock and key, induced fit, conformational selection, and inhibitor trapping models. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(13), 7124. DOI: 10.3390/ijms25137124
  34. Srinivasan B. (2023) A guide to enzyme kinetics in early drug discovery. *FEBS J.*, **290**(9), 2292–2305. DOI: 10.1111/febs.16404
  35. Lamba D., Pesaresi A. (2022) Kinetic modeling of time-dependent enzyme inhibition by pre-steady-state analysis of progress curves: the case study of the anti-Alzheimer's drug galantamine. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(9), 5072. DOI: 10.3390/ijms23095072
  36. Copeland R.A. (2021) Evolution of the drug-target residence time model. *Expert Opin. Drug Discov.*, **16**(12), 1441–1451. DOI: 10.1080/17460441.2021.1948997
  37. Liu H., Zhang H., IJzerman A.P., Guo D. (2024) The translational value of ligand-receptor binding kinetics in drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, **181**(21), 4117–4129. DOI: 10.1111/bph.16241
  38. Vauquelin G. (2016) Effects of target binding kinetics on *in vivo* drug efficacy:  $k_{\text{off}}$ ,  $k_{\text{on}}$  and rebinding. *Br. J. Pharmacol.*, **173**(15), 2319–2334. DOI: 10.1111/bph.13504
  39. Ziada S., Diharce J., Raimbaud E., Aci-Sèche S., Ducrot P., Bonnet P. (2022) Estimation of drug-target residence time by targeted molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.*, **62**(22), 5536–5549. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c00852
  40. Araki M., Matsumoto S., Bekker G.-J., Isaka Y., Sagae Y., Kamiya N., Okuno Y. (2021) Exploring ligand binding pathways on proteins using hypersound-accelerated molecular dynamics. *Nat. Commun.*, **12**(1), 2793. DOI: 10.1038/s41467-021-23157-1
  41. Wang J., Do H.N., Koirala K., Miao Y. (2023) Predicting biomolecular binding kinetics: a review. *J. Chem. Theory Comput.*, **19**(8), 2135–2148. DOI: 10.1021/acs.jctc.2c01085
  42. Morrison J.F., Walsh C.T. (1988) The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **61**, 201–301. DOI: 10.1002/9780470123072.ch5
  43. Goličnik M., Stojan J. (2004) Slow-binding inhibition: a theoretical and practical course for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **32**(4), 228–235. DOI: 10.1002/bmb.2004.494032040358
  44. Массон П. (2012) Кинетические особенности реакций, катализируемых холинэстеразами. *Биохимия*, **77**(10), 1383–1400. [Masson P. (2012) Time-dependent kinetic complexities in cholinesterase-catalyzed reactions. *Biochemistry (Moscow)*, **77**(10), 1147–1161.] DOI: 10.1134/S0006297912100070
  45. Pellock S.J., Creekmore B.C., Walton W.G., Mehta N., Biernat K.A., Cesmat A.P., Ariyaratna Y., Dunn Z.D., Li B., Jin J., James L.I., Redinbo M.R. (2018) Gut microbial  $\beta$ -glucuronidase inhibition via catalytic cycle interception. *ACS Central Science*, **4**(7), 868–879. DOI: 10.1021/acscentsci.8b00239
  46. Cornish Bowden A. (1974) A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non competitive inhibitors. *Biochem. J.*, **137**(1), 143–144. DOI: 10.1042/bj1370143
  47. Tian W.X., Tsou C.L. (1982) Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry*, **21**(5), 1028–1032. DOI: 10.1021/bi00534a031
  48. Cha S. (1975) Tight-binding inhibitors-I: kinetic behavior. *Biochem. Pharmacol.*, **24**(23), 2177–2185. DOI: 10.1016/0006-2952(75)90050-7
  49. Copeland R.A. (2011) Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time. *Future Med. Chem.*, **3**(12), 1491–1501. DOI: 10.4155/fmc.11.112
  50. Fagnani L., Nazzicone L., Bellio P., Franceschini N., Tondi D., Verri A., Petricca S., Iorio R., Amicosante G., Perilli M., Celenza G. (2022) Protocetraric and salazinic acids as potential inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease: biochemical, cytotoxic, and computational characterization of depsidones as slow-binding inactivators. *Pharmaceuticals*, **15**(6), 714. DOI: 10.3390/ph15060714
  51. Cellupica E., Caprini G., Cordella P., Cukier C., Fossati G., Marchini M., Rocchio I., Sandrone G., Vanoni M.A., Vergani B., Żrubek K., Stevenazzi A., Steinkühler C. (2023) Difluoromethyl-1,3,4-oxadiazoles are slow-binding substrate analog inhibitors of histone deacetylase 6 with unprecedented isotype selectivity. *J. Biol. Chem.*, **299**(1), 102800. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102800

52. Mucha A., Drag M., Dalton J.P., Kafarski P. (2010) Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie*, **92**(11), 1509–1529. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.04.026
53. Rich D.H., Moon B.J., Harbeson S. (1984) Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derivatives. Effect of inhibitor structure on slow-binding processes. *J. Med. Chem.*, **27**(4), 417–422. DOI: 10.1021/jm00370a001
54. Wilkes S.H., Prescott J.M. (1985) The slow, tight binding of bestatin and amastatin to aminopeptidases. *J. Biol. Chem.*, **260**(24), 13154–13162. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)38851-8
55. Zueva I.V., Lushchekina S.V., Pottier I.R., Darvesh S., Masson P. (2020) 1-(3-Tert-butylphenyl)-2,2,2-trifluoroethanone as a potent transition-state analogue slow-binding inhibitor of human acetylcholinesterase: kinetic, MD and QM/MM studies. *Biomolecules*, **10**(12), 1–21. DOI: 10.3390/biom10121608
56. Carletti E., Schopfer L.M., Colletier J.-P., Froment M.-T., Nachon F., Weik M., Lockridge O., Masson P. (2011) Reaction of cresyl saligenin phosphate, the organophosphorus agent implicated in aerotoxic syndrome, with human cholinesterases: mechanistic studies employing kinetics, mass spectrometry, and X-ray structure analysis. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**(6), 797–808. DOI: 10.1021/tx100447k
57. Zueva I., Lushchekina S., Shulnikova P., Lenina O., Petrov K., Molochkina E., Masson P. (2021)  $\alpha$ -Tocopherol, a slow-binding inhibitor of acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.*, **348**, 109646. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109646
58. Mukhametgalieva A.R., Nemtarev A.V., Sykaev V.V., Pashirova T.N., Masson P. (2023) Activation/inhibition of cholinesterases by excess substrate: interpretation of the phenomenological b factor in steady-state rate equation. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(13), 10472. DOI: 10.3390/ijms241310472
59. Masson P., Mukhametgalieva A.R. (2023) Partial reversible inhibition of enzymes and its metabolic and pharmacotoxicological implications. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(16), 12973. DOI: 10.3390/ijms241612973
60. Wenthur C.J., Gentry P.R., Mathews T.P., Lindsley C.W. (2014) Drugs for allosteric sites on receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **54**(1), 165–184. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134525
61. Segel I.H. (1993) In: *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley, 992 p.
62. Kurganov B.I., Dorozhko A.I., Kagan Z.S., Yakovlev V.A. (1976) The theoretical analysis of kinetic behaviour of “hysteretic” allosteric enzymes. I. The kinetic manifestations of slow conformational change of an oligomeric enzyme in the Monod, Wyman and Changeux model. *J. Theor. Biol.*, **60**(2), 247–269. DOI: 10.1016/0022-5193(76)90059-X
63. Auzat I., Gawlita E., Garel J.-R. (1995) Slow ligand-induced transitions in the allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **249**(2), 478–492. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0310
64. Pargellis C., Tong L., Churchill L., Cirillo P.F., Gilmore T., Graham A.G., Grob P.M., Hickey E.R., Moss N., Pav S., Regan J. (2002) Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **9**(4), 268–272. DOI: 10.1038/nsb770
65. Casey A.K., Baugh J., Frantom P.A. (2012) The slow-onset nature of allosteric inhibition in  $\alpha$ -isopropylmalate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a flexible loop. *Biochemistry*, **51**(24), 4773–4775. DOI: 10.1021/bi300671u
66. Goličnik M., Stojan J. (2002) Multi-step analysis as a tool for kinetic parameter estimation and mechanism discrimination in the reaction between tight-binding fasciculins and electric eel acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1597**(1), 164–172. DOI: 10.1016/S0167-4838(02)00285-6
67. Radić Z., Duran R., Vellom D.C., Li Y., Cervenansky C., Taylor P. (1994) Site of fasciculins interaction with acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, **269**(15), 11233–11239. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)78115-0
68. Chelliah J., Smith J.D., Fariss M.W. (1994) Inhibition of cholinesterase activity by tetrahydroaminoacridine and the hemisuccinate esters of tocopherol and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1206**(1), 17–26. DOI: 10.1016/0167-4838(94)90067-1
69. Sepčić K., Marcel V., Klæbe A., Turk T., Šuput D., Fournier D. (1998) Inhibition of acetylcholinesterase by an alkylpyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1387**(1–2), 217–225. DOI: 10.1016/S0167-4838(98)00125-3
70. Ashani Y., Peggs J.O., Doctor B.P. (1992) Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**(2), 719–726. DOI: 10.1016/0006-291X(92)90649-6
71. Stojan J., Pavli M.R. (1997) Mechanism of eserine action on the hydrolysis of butyrylthiocholine by butyrylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib.*, **11**(3), 199–208. DOI: 10.3109/14756369709027650
72. Kim J.H., Lee S., Park S., Park J.S., Kim Y.H., Yang S.Y. (2019) Slow-binding inhibition of tyrosinase by *Ecklonia cava* phlorotannins. *Marine Drugs*, **17**(6), 359. DOI: 10.3390/md17060359
73. Kim J.H., Jang D.H., Lee K.W., Kim K.D., Shah A.B., Zhumanova K., Park K.H. (2020) Tyrosinase inhibition and kinetic details of puerol A having but-2-enolide structure from *Amorpha fruticosa*. *Molecules*, **25**(10), 2344. DOI: 10.3390/molecules25102344
74. Wang Y., Kim J.Y., Song Y.H., Li Z.P., Yoon S.H., Uddin Z., Ban Y.J., Lee K.W., Park K.H. (2019) Highly potent bacterial neuraminidase inhibitors, chromenone derivatives from *Flemingia philippinensis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **128**, 149–157. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.105
75. Kim J.Y., Li Z.P., Lee G., Kim J.H., Shah A.B., Lee Y.H., Park K.H. (2023) Investigation of bacterial neuraminidase inhibition of xanthenes bearing geranyl and prenyl groups from *Cratogeomys cochinchinense*. *Front. Chem.*, **11**, 1245071. DOI: 10.3389/fchem.2023.1245071
76. Woo H.S., Im H.J., Kim J.Y., Lee M.-S., Kim D.W. (2022) Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition by theaflavonoid IV isolated from methanolic extract of tea (*Camellia sinensis*) seed shells. *Nat. Prod. Res.*, **36**(12), 3189–3192. DOI: 10.1080/14786419.2021.1952576
77. Shah A.B., Yoon S., Kim J.H., Zhumanova K., Ban Y.J., Lee K.W., Park K.H. (2020) Effectiveness of cyclohexyl functionality in ugonins from *Helminthostachys zeylanica* to PTP1B and  $\alpha$ -glucosidase inhibitions. *Int. J. Biol. Macromol.*, **165**, 1822–1831. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.061
78. Kharlamova A.D., Lushchekina S.V., Petrov K.A., Kots E.D., Nachon F., Villard-Wandhammer M., Zueva I.V., Krejci E., Reznik V.S., Zbov V.V., Nikolsky E.E., Masson P. (2016) Slow-binding inhibition of acetylcholinesterase by an alkylammonium derivative of 6-methyluracil: mechanism and possible advantages for myasthenia gravis treatment. *Biochem. J.*, **473**(9), 1225–1236. DOI: 10.1042/BCJ20160084

79. Lenina O.A., Zueva I.V., Zobov V.V., Semenov V.E., Masson P., Petrov K.A. (2020) Slow-binding reversible inhibitor of acetylcholinesterase with long-lasting action for prophylaxis of organophosphate poisoning. *Sci. Rep.*, **10**(1), 16611. DOI: 10.1038/s41598-020-73822-6
80. Zhou Y., Fu Y., Yin W., Li J., Wang W., Bai F., Xu S., Gong Q., Peng T., Hong Y., Zhang D., Zhang D., Liu Q., Xu Y., Xu H.E., Zhang H., Jiang H., Liu H. (2021) Kinetics-driven drug design strategy for next-generation acetylcholinesterase inhibitors to clinical candidate. *J. Med. Chem.*, **64**(4), 1844–1855. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01863
81. Qian H., Yu C., Zhu H., Ding Q., Cai Y., Jing J., Xu X., Guo R., Zhang H., Liu H., Chen X., Liu Y. (2023) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of fluoropezil (DC20), a novel acetylcholinesterase inhibitor: a phase I study in healthy young and elderly Chinese subjects. *Clin. Transl. Sci.*, **16**(5), 810–822. DOI: 10.1111/cts.13490
82. Montgomery J.I., Brown M.F., Reilly U., Price L.M., Abramite J.A., Arcari J., Barham R., Che Y., Chen J.M., Chung S.W., Collantes E.M., Desbonnet C., Doroski M., Doty J., Engtrakul J.J., Harris T.M., Huband M., Knafels J.D., Leach K.L., Liu S., Marfat A., McAllister L., McElroy E., Menard C.A., Mitton-Fry M., Mullins L., Noe M.C., O'Donnell J., Oliver R., Penzien J., Plummer M., Shanmugasundaram V., Thoma C., Tomaras A.P., Uccello D.P., Vaz A., Wishka D.G. (2012) Pyridone methylsulfone hydroxamate LpxC inhibitors for the treatment of serious gram-negative infections. *J. Med. Chem.*, **55**(4), 1662–1670. DOI: 10.1021/jm2014875
83. Basak S., Li Y., Tao S., Daryaei F., Merino J., Gu C., Delker S.L., Phan J.N., Edwards T.E., Walker S.G., Tonge P.J. (2022) Structure-kinetic relationship studies for the development of long residence time LpxC inhibitors. *J. Med. Chem.*, **65**(17), 11854–11875. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00974
84. Cellupica E., Caprini G., Fossati G., Mirdita D., Cordella P., Marchini M., Rocchio I., Sandrone G., Stevenazzi A., Vergani B., Steinkühler C., Vanoni M.A. (2023) The importance of the “time factor” for the evaluation of inhibition mechanisms: the case of selected HDAC6 inhibitors. *Biology (Basel)*, **12**(8), 1049. DOI: 10.3390/biology12081049
85. Hasinoff B.B., Patel D. (2018) Myocyte-damaging effects and binding kinetics of boronic acid and epoxyketone proteasomal-targeted drugs. *Cardiovasc. Toxicol.*, **18**(6), 557–568. DOI: 10.1007/s12012-018-9468-9
86. Wiedemeyer S.J.A., Wu G., Pham T.L.P., Lang-Henkel H., Perez Urzua B., Whisstock J.C., Law R.H.P., Steinmetzer T. (2023) Synthesis and structural characterization of macrocyclic plasmin inhibitors. *ChemMedChem*, **18**(6), e202200632. DOI: 10.1002/cmdc.202200632
87. Ntatsopoulos V., Macegoniuk K., Mucha A., Vassiliou S., Berlicki L. (2018) Structural exploration of cinnamate-based phosphonic acids as inhibitors of bacterial ureases. *Eur. J. Med. Chem.*, **159**, 307–316. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.09.074
88. Pagoni A., Grabowiecka A., Tabor W., Mucha A., Vassiliou S., Berlicki L. (2021) Covalent inhibition of bacterial urease by bifunctional catechol-based phosphonates and phosphinates. *J. Med. Chem.*, **64**(1), 404–416. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01143
89. Vauquelin G., Maes D. (2023) Competition in drug binding and the race to equilibrium. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **37**(1), 147–157. DOI: 10.1111/fcp.12824

Поступила в редакцию: 19. 11. 2024.

После доработки: 14. 03. 2025.

Принята к печати: 24. 03. 2025.

## SLOW-BINDING INHIBITORS OF ENZYMES: KINETIC CHARACTERISTICS AND PHARMACOLOGICAL INTEREST

Z.M. Shaihtudinova<sup>1</sup>, T.N. Pashirova<sup>1,2</sup>, P. Masson<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga region) Federal University,

18 Kremlevskaya str., Kazan, 420008 Russia; \*e-mail: pym.masson@free.fr

<sup>2</sup>Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 8 Acad. Arbuzov str, Kazan, 420088 Russia

Currently, the search for new slow-binding inhibitors of enzymes (SBI) and their identification primary *in vitro* studies still attracts much attention in the context of their potential role as putative pharmacological agents for the treatment of various diseases. In contrast to their classical reversible analogues, SBI exhibit a slow enzyme binding kinetics, where the equilibrium steady-state is reached not in microseconds, but after longer time intervals. Such compounds could be promising drugs, because regardless of their pharmacokinetics in the bloodstream, they have such advantages as high affinity for the target enzyme, long residence time on the target, and therefore, prolonged action. These pharmacological properties ensure optimized dosage of drugs required to achieve high activity with less side effects. In this review we have considered mechanisms of SBI interaction with enzyme targets, the principles of their recognition at the level of *in vitro* studies and analysis of binding and kinetic parameters.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Keywords:** slow-binding inhibitors; enzyme kinetics; inhibition constant; residence time

**Funding.** This work was performed within the frame of the Strategic Academic Leadership Program “Priority 2030” of the Kazan Federal University of the Government of the Russian Federation.

Received: 19.11.2024; revised: 14.03.2025; accepted: 24.03.2025.