

Ингибиторы NO-синтаз, содержащие карбоксамидиновую группу и ее изостеры

С.Я.Проскуряков, А.Г.Коноплянников, В.Г.Скворцов, А.А.Мандругин, В.М.Федосеев

Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук
249036 Обнинск, ул. Королева, 4, факс (095) 956–1440

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095) 939–3187

В обзоре приводятся структура, активность и селективность ингибиторов синтазы оксида азота (NOS), относящихся к различным классам химических соединений. Рассмотрены линейные, циклические и гетероциклические структуры, содержащие фрагменты гуанидина, амидина и/или изотиомочевины. Анализ закономерностей, связывающих структуру и активность таких ингибиторов, проведен в сравнении с их действием на индуцибельную изоформу NOS и может служить основанием для получения новых, еще более эффективных соединений.

Библиография — 115 ссылок.

Оглавление

I. Введение	939
II. L-Аргинин-зависимый синтез NO [•]	940
III. Структура и активность ингибиторов синтазы оксида азота	941
IV. Циклические аналоги субстрат-подобных ингибиторов	946
V. Заключение	950

I. Введение

Со времени установления того факта, что оксид азота(II) является эндотелиальным фактором релаксации сосудов (EDRF), и доказательства его ферментативного происхождения прошло уже более 15 лет.^{1,2} За это время обнаружено, что как при нормальной жизнедеятельности организма, так и в различных патофизиологических состояниях (ишемические, воспалительные и дегенеративные процессы, канцерогенез) радикал NO[•] выполняет уникальные функции.^{3–6} Эти откры-

тия послужили стимулом для поиска и синтеза веществ, способных регулировать активность и содержание радикала NO[•] в организме животных и человека в целях терапии многих распространенных заболеваний.^{7,8}

Ряд заболеваний характеризуется усиленным образованием NO[•] (артрит, диабет, сепсис, ишемия миокарда), поэтому важным направлением их лечения является снижение содержания NO[•]. Существующие ингибиторы изоформ синтазы оксида азота (NOS) — фермента, синтезирующего NO[•], — обладают недостаточной активностью и избирательностью и не могут быть локализованы в разных тканях и клеточных органеллах. Это делает поиск новых химических ингибиторов NOS весьма актуальной проблемой.^{9,10}

Учитывая, что L-аргинин — практически единственный эндогенный субстрат, гуанидиновая группа которого при ферментативном окислении служит источником атома азота для синтеза NO[•], можно ожидать, что среди его аналогов будут и высокоспецифичные субстраты ферментов NOS. Поэтому наибольшее внимание в настоящее время уделяется получению соединений, содержащих в своей структуре группировки, изостеричные гуанидиновой группе L-аргинина. Целью настоящего обзора является анализ литературы за период 1997–2003 гг., посвященной связи химической структуры и биохимической активности ингибиторов, специфически связывающихся с каталитическим центром фермента, в котором акцентируется и окисляется L-аргинин. При этом свойства ингибиторов рассматриваются по отношению к индуцибельной изоформе NOS (iNOS), которая выполняет не только ключевые функции в реализации неспецифического иммунитета,⁴ но и подавляет защитные механизмы в патогенезе ряда заболеваний, синтезируя избыток NO[•].^{8,11,12}

С.Я.Проскуряков. Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной ядерной медицины МРНЦ РАМН. Телефон: (08439)7–4863, e-mail: pros@mrrc.obninsk.ru, noo@mrrc.obninsk.ru

А.Г.Коноплянников. Профессор, доктор биологических наук, руководитель лаборатории экспериментальной лучевой терапии того же центра. Телефон: (08439)7–2054, e-mail: konopl@mrrc.obninsk.ru

В.Г.Скворцов. Кандидат биологических наук, руководитель лаборатории экспериментальной ядерной медицины того же центра. Телефон: (08439)7–4065, e-mail: skvortsov@mrrc.obninsk.ru

А.А.Мандругин. Профессор, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры радиохимии Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3845, e-mail: mandrug@radio.chem.msu.ru

В.М.Федосеев. Профессор, доктор химических наук, заведующий той же кафедрой. Телефон: (095)939–3187, e-mail: fedoseev@radio.chem.msu.ru

Область научных интересов авторов: синтез биологически активных соединений, радиобиология, в том числе стволовых клеток, радиохимия, радиофармакология, биохимия и физиология оксидов азота.

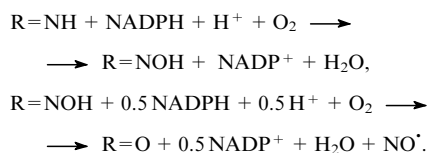
Дата поступления 15 марта 2004 г.

II. L-Аргинин-зависимый синтез NO[•]

В организме NO[•] в основном образуется в ходе ферментативного окисления L-аргинина,^{13,14} хотя существуют и другие его источники.¹⁵ Различают три формы ферментов, синтезирующих NO[•]: две конститутивные и одну индуцибельную, которая экспрессируется провоспалительными цитокинами и бактериальными продуктами. Изоформы кодируются собственными генами и именуются по месту преимущественной локализации: нейрональная NOS (NOS-1, nNOS), индуцибельная NOS (NOS-2, iNOS) и эндотелиальная NOS (NOS-3, eNOS).

1. Субстраты и кофакторы

При синтезе NO[•] фермент, представляющий собой гомодимер, использует три субстрата: L-аргинин (R=NH), кислород и источник электронов — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН, NADPH). В ходе двухстадийного окисления аминокислоты сначала образуется промежуточный продукт — N^ω-гидроксид-L-аргинин (R=NOH), а затем L-цитруллин (R=O) и NO[•] в эквимольных количествах.¹³



Активность NOS обеспечивают несколько кофакторов и простетических групп. Некоторые из них входят в каждую субъединицу, например FAD, FMN, гем с пентакоординированным Fe²⁺, белок, связывающий Ca²⁺ (кальмодулин, CaM), Zn²⁺. Согласно некоторым данным, в димере могут отсутствовать другие кофакторы, кроме (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерина (BH₄).¹⁴ Флавины, находящиеся в редуктазном домене, переносят электроны от NADPH к оксидазному домену, содержащему гем (окислительный центр), участки связывания BH₄ и L-аргинина и ион цинка.¹⁶

2. Димеризация и протеолиз NOS

Фермент окисляет L-аргинин и синтезирует NO[•] только в состоянии гомодимерного комплекса. При этом L-аргинин, BH₄ и гем совместно участвуют в формировании активной формы фермента. Поэтому замещение субстрата ингибитором не только препятствует синтезу NO[•], но и во многих случаях не дает возможности сформироваться активной третиной структуре NOS.^{14,16,17} В интактной клетке ~50% полипептидов NOS находятся в виде димеров.¹⁸ Включение гема в полипептид NOS, по-видимому, является первым необходимым этапом димеризации для всех изоформ.¹⁹ Однако роль BH₄ и L-аргинина более дифференцирована. В частности, субстрат эффективнее в ассоциации субъединиц nNOS, чем BH₄, однако для iNOS эта зависимость является обратной. В целом при наличии указанных кофакторов и субстрата устойчивость димера к диссоциации и протеолизу среди изоформ NOS уменьшается в последовательности eNOS ≫ nNOS > iNOS.²⁰ Следует, однако, отметить неожиданный факт возможности связывания L-аргинина с центром eNOS, связывающим BH₄.²¹

3. Структура оксидазного домена NOS

В оксидазном домене NOS расположены четыре важнейшие структуры фермента: окислительный центр, содержащий гем с пентакоординированным железом, участок связывания

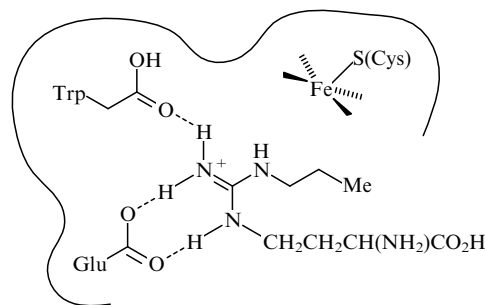


Рис. 1. Схема предполагаемого взаимодействия N^ω-n-пропил-L-аргинина (субстрат-подобного ингибитора NOS) с каталитическим центром NO-синтазы, в котором связывается и окисляется субстрат (L-аргинин).

L-аргинина, акцептирующая BH₄ полость и тиолатный комплекс Zn⁺. Центральную роль в связывании L-аргинина играют две консервативные аминокислоты. В проксимальной по отношению к гему полости протон одной из аминокислот (из гуанидиновой структуры) L-аргинина акцептируется карбонильной группой триптофана. В дистальной полости второй протон той же аминокислоты и протон при атоме N(5) связываются карбонильными группами глутаминовой кислоты.²¹ Сам L-аргинин, по-видимому, входит в акцептирующую полость оксидазного домена в вытянутой E-конформации.²² На рис. 1 показано расположение одного из ингибиторов NOS — N^ω-n-пропил-L-аргинина (PLA) в гуанидин-связывающей полости NOS^{23,24} и выделены две основные аминокислоты акцепторного «кармана»: Glu и Trp. С окислительным карманом, содержащим гем с пента- или гексакоординированным ионом железа, субстрат-подобные ингибиторы могут взаимодействовать, вытесняя шестой лиганд (без образования связи) или с образованием шестой координационной связи с ионом железа гема (например, L-тиоцитруллин). Карбонильные группы Trp и Glu участвуют в связывании PLA таким же образом, как и в связывании L-аргинина. Одну из аксиальных связей пента- или гексакоординированного Fe²⁺ занимает остаток цистеина из полипептида NOS, другая связь может образовываться с ингибитором, что существенно влияет на его эффективность.

Анализ зависимости между размерами заместителей в L-аргининподобных ингибиторах и прочностью комплексов ингибитор–NOS (ингибиторный анализ), а также изучение спектральных характеристик nNOS, iNOS и eNOS показали, что размеры субстратной полости у изоформ изменяются в последовательности: nNOS > iNOS > eNOS.^{25,26} Кроме того, обнаружены топологические особенности у дистального и проксимального карманов, акцептирующих гуанидиновые аминокислоты. Связывающий участок для аминокислот (являющейся источником азота для NO[•]) может взаимодействовать с существенно более объемными объектами, чем группы NH₂ или =NOH. Напротив, центр связывания дистального азота не способен вмещать подобные группы. Эти особенности топологии субстрат-связывающей полости сохраняются и среди изоформ. Так, iNOS слабее реагирует с N-алкильными группами большего размера, чем этильная, около гема и не может акцептировать группу SR в дистальной гуанидин-связывающей полости. В то же время ингибиторы, содержащие группы SAlk, NAlk большего размера, прочнее связываются с каталитическим центром nNOS и, следовательно, более сильно и избирательно ингибируют nNOS по сравнению с iNOS.²⁴

Следует отметить, что, несмотря на структурные особенности каталитических центров изоформ NOS, в избирательном связывании ингибитора с ферментом, по-видимому, более существенную роль играют пептидные участки, расположенные в канале доступа к гемму. Именно они акцептируют BH_4 и определяют димеризацию мономеров, их ковалентную модификацию и локализацию белка в клетке. Эти структурные особенности, остающиеся пока вне поля зрения рентгеноструктурного анализа, перспективны для дизайна высоко-селективных и активных ингибиторов NOS.

III. Структура и активность ингибиторов синтазы оксида азота

За время, прошедшее после открытия ферментативного происхождения NO^* , на модели изолированного фермента различной степени очистки в качестве ингибиторов NOS были исследованы сотни веществ. Однако эти необходимые и полезные данные были получены при отсутствии общепринятых стандартов для анализа видовой принадлежности ферментов, методов их выделения, условий проведения реакций и т.д. Кроме того, оценка ингибирующей активности соединений на выделенных ферментах исключает ряд важных механизмов, которые могут определять эффективность ингибиторов на клеточном уровне. К ним, например, относятся: модификация устойчивости фермента к протеолизу, скорость метаболизма ингибитора, проницаемость клеточной мембраны и др.

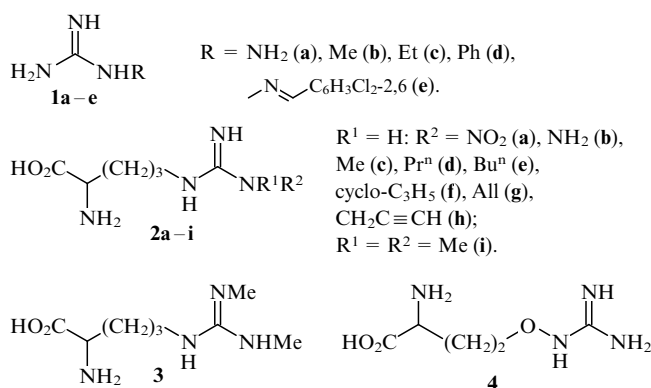
Активность ингибиторов синтазы оксида азота принято характеризовать устойчивостью комплекса ингибитор – фермент с помощью параметров K_i (см.[†]) и IC_{50} ,[‡] определяемых из кинетических данных. По их величине соединения делят на четыре группы, для которых K_i (IC_{50}) находятся в пределах >100 , $10-100$, <10 и <1 мкМ соответственно. Например, константа Михаэлиса – Ментен в случае аргинина $K_M^{\text{Arg}} = 1-10$ мкМ для NOS,²⁷ а для L-гомоаргинина примерно в 10 раз больше. Данные по селективному ингибированию определенной изоформы NOS представляются в виде отношения $K_i^{\text{eNOS}}/K_i^{\text{iNOS}}$ (e/i) и $K_i^{\text{hNOS}}/K_i^{\text{iNOS}}$ (n/i) (или в виде соответствующих отношений IC_{50}). По численной величине параметра «селективность» также выделяют четыре группы ингибиторов: e/i и n/i <1 или >1 , e/i и n/i <0.1 или >10 , e/i и n/i <0.01 или >100 , а также e/i и n/i <0.001 или >1000 . Помимо сокращений для названий ингибиторов NOS, предложенных международным союзом по фармакологической номенклатуре,²⁸ остальные аббревиатуры и обозначения соответствуют приведенным в оригинальных работах.

1. Производные гуанидина и L-аргинина

Одним из простейших по структуре и наиболее известным ингибитором NOS является аминогуанидин. Он ингибирует все изоформы NOS и проявляет некоторую селективность в отношении iNOS. Интерпретация его действия *in vivo* существенно осложняется наличием альтернативных биохимических мишеней (см. комментарии к статье¹³). Аминогуанидин (**1a**), как и другие его производные, необратимо инактивируют все изоформы NOS (табл. 1).

[†] Константу ингибирования K_i (в предположении конкурентности и стационарности реакции) рассчитывают по уравнению $1/v = 1/V_{\text{max}} + (K_M^{\text{Arg}}/V_{\text{max}}[\text{Arg}]) \cdot (1 + [I]/K_i)$, где $[I]$ и $[\text{Arg}]$ — концентрации ингибитора и аргинина соответственно; K_M^{Arg} — константа Михаэлиса – Ментен.

[‡] IC_{50} — концентрация ингибитора, при которой активность NOS подавляется на 50% при данной концентрации аргинина.



Замена аминогруппы в соединении **1a** на метильную заметно ослабляет ингибирующую активность N-метилгуанидина (**1b**) ($IC_{50}^{\text{iNOS}} \approx 100$ мкМ).³¹ Среди замещенных в положении 1 гуанидинов наиболее сильным ингибитором iNOS оказался N-этилгуанидин (**1c**), который в отличие от соединения **1a**, был более избирательным к этой изоформе.

Ингибирование NOS было обнаружено у известного фармакопейного вазорелаксанта, агониста α_2 -адренорецепторов, — 1-(2,6-дихлорбензилиденамино)гуанидина (**1e**).³⁵ Ингибирование фермента в цитозоле клеток НЕК 293 под действием этого препарата в начальный период было обратимым ($K_i^{\text{nNOS}} = 1$ мкМ), однако в дальнейшем происходила необратимая инактивация nNOS. В культуре клеток в при-

Таблица 1. Ингибирующая активность производных гуанидина и L-аргинина.

Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ (см. ^a)	Селективность (см. ^b)		Ссылки
		n/i	e/i	
1a	30 ^c	6	10	14
	30 ^d	12	9	28
	5 ^e	>1	>1	31
1c	1 ^e	>10	>10	31
2a	3 ^c	0.09	<0.1	14
	2 ^{c, d}	0.02	0.05	28
	13 ^e	0.2	0.09	31
2c	0.7 ^f	0.02	0.04	32
	7	0.7	0.5	14
	5 ^d	0.2	0.2	24
	1.3 ^d	1	0.3	29
2e	1 ^f	1	0.5	33
	100 ^d	0.004	0.05	24
	25 ^d	0.02	0.08	34
2h	0.6 ^g	>1	>1	34

Примечание. Здесь и далее приведены округленные данные, которые могут быть использованы для сравнительного анализа только в рамках настоящего обзора.

^a Величины K_i в специально указанных случаях рассчитаны из данных соответствующих работ по соотношению $IC_{50} = K_i(1 + [\text{Arg}])/K_M^{\text{Arg}}$.

^b Селективность (преимущественное ингибирование одной изоформы NOS по сравнению с другой) выражается отношением величин, представляющих активность ингибитора, IC_{50} или K_i ($n/i = IC_{50}^{\text{nNOS}}/IC_{50}^{\text{iNOS}}$, $e/i = IC_{50}^{\text{eNOS}}/IC_{50}^{\text{iNOS}}$).

^c h-NOS, IK_{50} ; $[\text{Arg}] = 30$ мкМ (видовая принадлежность NOS: m, r, b, h — из мышей, крыс, быка, человека соответственно).

^d K_i рассчитано из данных работ^{24, 29, 30}.

^e m-i NOS, r-nNOS, b-eNOS.

^f h-NOS.

^g m-i NOS, b-nNOS, b-eNOS, IK_{50} ; $[\text{Arg}] = 120$ мкМ.

существовании соединения **1e** время жизни nNOS снижалось с 20 до 10 ч.³⁶

Первыми изученными ингибиторами NOS были производные L-аргинина (**2a–i**), содержащие заместители в гуанидиновой группе. Следует подчеркнуть, что их D-изомеры не влияют на ферментативную активность NOS.²⁴ По iNOS-ингибирующей активности N^ω-нитро-L-аргинин (**2a**) можно отнести к сильным ингибиторам ($K_i < 10$ мкМ, см. табл. 1). При этом активность nNOS и eNOS подавляется в большей степени по сравнению с iNOS благодаря различию в механизмах связывания с изоформами ферментов. С iNOS происходит быстрое связывание и такое же быстрое замещение L-аргинином. С конститутивными NOS ингибитор связывается медленно и еще медленнее отделяется от ферментов в присутствии субстрата.^{37,38} Аминопериодат аргинина **2b** также ингибирует NOS *in vitro* и *in vivo* путем необратимого удаления гема из полипептида или ковалентного связывания гема с полипептидом.³⁹

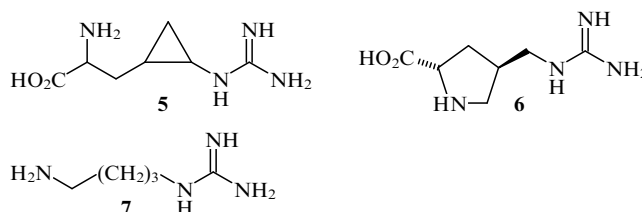
Активные соединения найдены также среди моноалкиларгининов. N^ω-Метил-L-аргинин (**2c**), как и нитропроизводное **2a**, является эффективным ингибитором всех NOS без выраженной селективности. По механизму действия соединение **2c** представляет собой ингибитор, инактивирующий фермент, и в качестве псевдосубстрата оно гидроксигируется NOS аналогично L-аргинину. Однако продукты, образующиеся на следующей стадии (MeNO⁺, CH₂O и др.), ковалентно модифицируют фермент, вероятно, с удалением гема.^{40–42} Следует отметить, что N^ω-метил-L-аргинин (**2c**), а также N^ω,N^ω-диметил-L-аргинин (**2i**) (асимметричный диметиларгинин) являются эндогенными ингибиторами NOS, образующимися в организме. Активность производных **2c,i** примерно одинакова ($K_i^{\text{nNOS}} \approx 0.5$ и 0.7 мкМ),⁴³ что объясняется отсутствием связи с субстрат-связывающим участком одной из аминогрупп гуанидинового фрагмента L-аргинина (см. рис. 1). В то же время симметричный N^ω,N^ω-диметил-L-аргинин (**3**) является очень слабым ингибитором.

В ряду производных L-аргинина с алифатическими заместителями в N^ω-положении ингибирующая активность соединений по отношению к iNOS существенно уменьшается с увеличением размера заместителя (> 4000 мкМ для N^ω-n-бутил-L-аргинина (**2e**), но при этом растет по отношению к nNOS.²⁴ Так, N^ω-n-пропиларгинин (**2d**), будучи слабым ингибитором iNOS ($IC_{50}^{\text{iNOS}} \approx 950$ мкМ), проявлял высокую селективность к nNOS ($n/i < 0.001$)³¹ и умеренную селективность к eNOS ($e/i < 0.1$). N^ω-Циклопропил-L-аргинин (**2f**) оказался сильным ингибитором m-iNOS ($K_i^{\text{iNOS}} \approx 8$ мкМ).⁴²

Появление кратной связи в алкильном заместителе аргинина (в N^ω-аллил-L-аргинине (**2g**) и N^ω-пропаргил-L-аргинине (**2h**)) сопровождается уменьшением их ингибирующей активности по отношению к nNOS и увеличением — к iNOS и eNOS. Вероятно, это вызвано инактивацией iNOS под действием ингибиторов с кратной связью.⁴⁴

Аминокислота растительного происхождения — L-канаванин (**4**), — в которой δ-метиленовая группа L-аргинина заменена атомом кислорода, слабо и избирательно ингибировала синтез NO[•] ($IC_{50}^{\text{nNOS}} \approx 130$ мкМ). Вероятной причиной этого является невозможность образования водородной связи с участием атома водорода у атома N(5), так как в предпочтительной таутомерной форме L-канаванина подвижный водород отсутствует.²⁴ Однако физиологические эксперименты свидетельствуют о специфической активности этой аминокислоты к iNOS. В частности, гипертензивный эффект ингибитора был значительно выше у животных, обработанных липополисахаридом — индуктором iNOS, — чем у интактных животных, у которых тонус сосудов определяется NO[•], продуцируемым eNOS.⁴⁵

Исследованы⁴⁶ NO-ингибирующие свойства близких по структуре к L-аргинину производных **5–7**, у которых заместитель введен в аминокислотную часть при неизменной структуре гуанидиновой группы.



Оказалось, что среди конформационных изомеров (±)-*транс*-3-(2-гуанидино)циклопропилаланина (**5**) *син*, *транс*-гуанидиноциклопропилаланин является плохим субстратом, а *анти*-изомер — слабым ингибитором NOS. Слабым ингибитором NOS была также аминокислота **6**, в которой орнитиновый фрагмент L-аргинина заменен на L-пролин.⁴⁷ Как свидетельствуют многочисленные данные, отсутствие аминокислотной части не препятствует образованию комплекса между ингибитором и гуанидин-связывающим участком. Однако ее наличие ограничивает число изомеров (обычно L-формы), способных связываться с каталитическим центром фермента.

Исследования 1-амино-4-гуанидинобутана (агматина (**7**)) — одного из продуктов метаболизма L-аргинина — открыли у него новые NOS-ингибирующие свойства. Агматин (**7**) усиливал окисление NADPH и образование H₂O₂ изомером nNOS, который при этом инактивировался. В обратимый начальный период ингибирования средство агматина (**7**) к nNOS характеризовалось величиной $K_i^{\text{nNOS}} \approx 30$ мкМ.⁴⁸

С учетом удовлетворительной ингибирующей активности соединения **2a** были синтезированы и изучены производные N^ω-нитро-L(D)-аргинина в виде дипептидов, содержащих D- и L-изомеры фенилаланина. Константы ингибирования ($K_i^{\text{iNOS}} > 10$ мкМ) показывают, что эти соединения можно считать слабыми ингибиторами, среди которых наиболее активным по отношению к iNOS является бензиловый эфир N^ω-нитро-L-аргинил-L-фенилаланина, условно селективный в отношении iNOS ($K_i^{\text{iNOS}} = 18$ мкМ, n/i и $e/i > 1$).

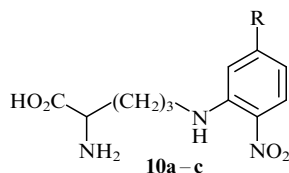
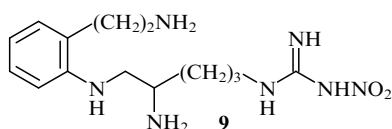
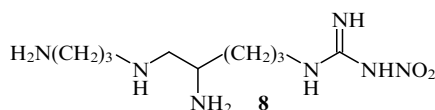
Вместе с этим среди неэффективных для iNOS ингибиторов ($K_i^{\text{iNOS}} > 1000$ мкМ) в этой серии были обнаружены соединения с уникальной селективностью для nNOS и eNOS. В частности, метиловый эфир D-фенилаланил-N^ω-нитро-D-аргинина избирательно ингибировал nNOS и eNOS по сравнению с iNOS ($K_i^{\text{iNOS}} = 3600$ мкМ, $n/i < 0.001$, $e/i < 0.01$). Следует отметить, что дипептиды, содержащие фрагменты нитро-D-аргинина (D-NA) и D/L-фенилаланина (D/L-Phe), оказались неконкурентными L-аргинину ингибиторами iNOS, но конкурентными для nNOS и eNOS.^{49,50} Эти данные указывают на наличие специфических мест связывания в iNOS вне гуанидин-связывающей полости, которая может акцептировать аминокислотные фрагменты «нестандартной» геометрии.

При замене карбоксильной группы на амидную в дипептидах были получены более активные и селективные ингибиторы. Амиды N^ω-нитро-L-аргинил-D-аспарагина ($K_i^{\text{iNOS}} = 9$ мкМ, $n/i < 0.1$, $e/i > 10$) и N^ω-нитро-L-аргинил-D-2,4-диаминобутановой кислоты ($K_i^{\text{iNOS}} = 25$ мкМ, $n/i < 0.01$, $e/i > 1$) обладали исключительной избирательностью в отношении к nNOS по сравнению eNOS. Один из наименее активных iNOS-ингибиторов — амид L-лизил-N^ω-нитро-D-аргинина проявил избирательность в отношении всех трех изоформ ($K_i^{\text{iNOS}} = 4700$ мкМ, $n/i < 0.001$, $e/i > 0.1$).

При восстановлении амидной группы до аминной в этом классе стереоселективных соединений был получен пептидомиметик **8**, который при умеренной iNOS-ингибирующей

активности ($K_i^{\text{iNOS}} > 10$ мкМ) проявил еще более высокую селективность для pNOS ($n/i < 0.01$ и $n/e < 0.001$).⁵¹ С целью увеличения липофильности подобных соединений были синтезированы аналоги, один из которых (соединение **9**) также имел исключительную активность и селективность к pNOS ($K_i^{\text{iNOS}} = 3.5$ мкМ, $n/i \approx 0.01$ и $n/e < 0.001$).⁵²

Еще один класс ингибиторов NOS без карбоксамидиновой группы, имеющих структурное сходство с аргинином **2a**, был обнаружен среди соединений **8–10**. Наиболее активным оказался 2-нитро-5-метилфенил-*N*(5)-L-орнитин (**10b**), проявляющий небольшую селективность к pNOS ($K_i^{\text{iNOS}} = 1.4$ мкМ, $n/i < 1$, $e/i < 1$). В отличие от производных аргинина стереоселективность этого соединения не была выраженной. Стереизомер D-орнитина **10c** ингибировал pNOS в 30 раз слабее, чем L-форма **10b**.⁵³



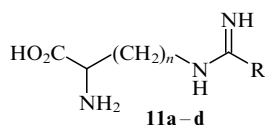
R = H (a), Me (L-форма) (b); Me (D-форма) (c).

Таким образом, среди соединений с гуанидиновой группой, обладающей высокой основностью, были найдены эффективные ингибиторы NOS. Однако существенное влияние на степень связывания с ферментами оказывает другая часть молекулы ингибитора, которая определяет и его избирательность к изоформам NOS.

2. Ингибиторы с карбоксамидиновой группой

Из теоретической модели²⁴ L-аргинин-связывающей полости NOS следует, что окисляемая аминогруппа гуанидинового фрагмента не принимает участия в образовании комплекса между L-аргинином (или субстрат-подобным ингибитором) и соответствующими аминокислотами каталитического центра. Поэтому модификация или полная замена окисляемой до NO[•] аминогруппы не должна существенно влиять на взаимодействие субстрат-подобного ингибитора с ферментом (см. рис. 1).

В ряду *N*^ω-(1-иминоалкил)-L-орнитинов **11a,b** и L-лизин (**11c,d**) наиболее активным ингибитором iNOS был *N*(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитин (**11a**), обладавший небольшой избирательностью к pNOS и eNOS (табл. 2). Увеличение длины алкильного заместителя снижало активность ингибиторов для всех изоформ NOS, в отличие от *N*^ω-алкил-L-аргонинов **2**, сродство которых к pNOS в этом случае увеличивалось.²⁴



$n = 3$: R = Me (a), All (b);
 $n = 4$: R = Et (c), All (d).

Влияние аллильного заместителя на поведение молекулы L-орнитина показано на примере *N*(5)-(1-иминобут-3-енил)-

Таблица 2. Ингибирующая активность производных аминокислот, содержащих амидиновый фрагмент.

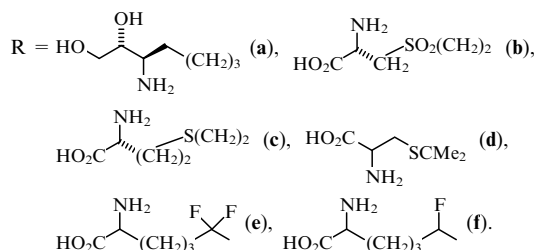
Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
11a	5 ^a	< 1	< 1	24
11b	60	0.002	< 1	54
11c	2 ^b	> 0.1	> 10	50
	1 ^b	10	16	55
12a	2 ^b	500	≈ 10	56
12b	8 ^{b,c}	80	100	57
12c	1.4 ^b	300	100	57
12d	1 ^a	60	130	58

^a IC_{50} . ^b K_i рассчитана из данных работы³¹. ^c h-NOS [Arg] = 30 мкМ.

L-орнитина (**11b**), который также имел повышенную избирательность по отношению к pNOS. По-видимому (как и в предыдущих случаях), это связано с инактивационным механизмом взаимодействия соединения **11b** с ферментом.

Замена орнитина на лизин приводит к *N*(6)-(1-иминоэтил)-L-лизину (**11c**) с наибольшей iNOS-ингибирующей активностью. В отличие от производных L-орнитина производное лизина обладает умеренной избирательностью к iNOS (см. табл. 2). Замена этильного заместителя на аллильный в *N*(6)-(1-иминобут-3-енил)-L-лизине практически не изменяет активность и избирательность. Таким образом, на ингибирующую активность соединений **11a–d** по отношению к iNOS алифатический заместитель у карбоксамидиновой и гуанидиновой групп оказывает одинаковое действие. Однако модификация такого заместителя (введение ненасыщенной связи), так же как и изменение аминокислотного остатка (лизин вместо орнитина), существенно влияет на селективность ингибиторов аминокислотного класса.

Создана оригинальная серия стереоспецифических NOS-ингибиторов **12a–f** — аналогов соединения **11c** (см. табл. 2).



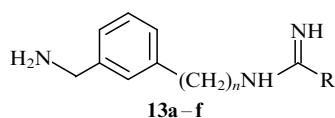
Исследование влияния карбоксильной группы на эффективность ингибирования проведено на примере соединений **11c** и *N*-(5(*S*)-амино-6(*R*),7-дигидроксигептил)ацетамидина (**12a**), который хотя и был менее активен в отношении iNOS, однако оказался высокоизбирательным к ней (по сравнению с eNOS).

В ряду производных, в которых атом углерода заменен на атом S и группу SO₂ (**12b,c**), L-изомеры обладали большей iNOS-ингибирующей активностью ($IC_{50} = 0.7–1.6$ мкМ) по сравнению с D-изомерами. Три соединения из этого ряда: *S*-{2-[(1-иминоэтил)амино]этил}-4,4-диоксо-L-цистеин (**12b**), *S*-{2-[(1-иминоэтил)амино]этил}-L-гомоцистеин (**12c**) и *S*-{2-[(1-иминоэтил)амино]изопропил}-L-цистеин (**12d**) показали высокую селективность по отношению к iNOS.

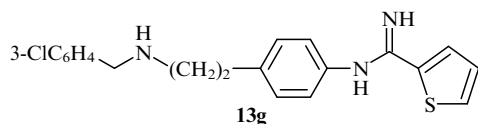
Фторирование лизина в положение 4 приводит к ингибиторам iNOS — *N*(5)-(1-иминоэтил)-4,4-дифтор-*L*-лизину (**12e**) и *N*(5)-(1-иминоэтил)-4-фтор-*L*-лизину (**12f**).⁵⁹

Для ингибиторов с карбоксамидиновой группой⁶⁰ наличие аминокислотного остатка не является необходимым, также как и для соединений с гуанидиновой группой.

Среди неаминокислотных ингибиторов, содержащих амидиновую группу, *N*-[3-(аминометил)бензил]ацетамидин (**13a**) оказался iNOS-селективным. Вероятно, определяющим фактором такой активности и специфичности является двухстадийное химическое взаимодействие ингибитора с индуцибельным ферментом. В отличие от быстрого и обратимого взаимодействия ариламида **13a** с конститутивными NOS, вторая стадия реакции этого ингибитора с iNOS протекает медленно и практически необратимо⁶¹ (табл. 3).



Соединение 13	R	n	Соединение 13	R	n
a	Me	1	d	CH ₂ F	0
b	Me	0	e	2-тиенил	0
c	MeSCH ₂	0	f	2-фурил	0



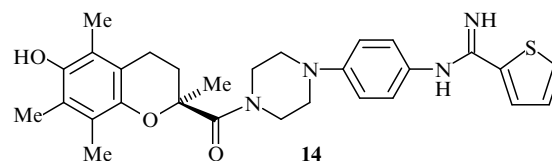
Среди других аналогов структуры **13a** обнаружены nNOS-селективные ингибиторы, в частности *N*-[3-(аминометил)фенил]ацетамидин (**13b**), отличающийся от соединения **13a** на одну метиленовую группу. Включение тиометильной группы в ацетамидиновый фрагмент в *N*-[3-(аминометил)фенил]метилтиоацетамидине (**13c**) дало наиболее активный ингибитор в этом классе соединений по отношению как к iNOS, так и к nNOS. Таким же высокоактивным ингибитором nNOS оказалось соединение **13d** с фторметильным заместителем в ацетамидиновой группе. Аналогично замена ацетамидиновой группы на гетариламидиновую (**13e,f**) усиливает nNOS-ингибирующую активность полученных соединений ($K_i^{\text{nNOS}} = 6$ и 9 нМ соответственно). Среди других тиофен-2-карбоксамидинов высокоактивным ингибитором iNOS является *N*-[4-[2-((3-хлорфенил)метил)амино]этил]фенил}-тиофен-2-карбоксамидин **13g** (см. табл. 3), в котором тиофеновый фрагмент проявил себя перспективным фармакофором.¹⁵

Таблица 3. Ингибирующая активность неаминокислотных соединений, содержащих амидиновую группу.

Соединение 13	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
a	0.14	> 10	≈ 500	29
	0.2 a, b	> 10	> 1000	14
b	2 c	0.02	> 1	29
c	0.02 c	< 1	> 10	29
g	5 a, b	0.004	< 1	12
	0.3 a	< 1	> 1	14

^a IC₅₀. ^b h-NOS, [Arg] = 30 мкМ. ^c h-NOS. ^d m-i NOS, r-nNOS, h-eNOS.

Наличие в одной молекуле тиофенкарбоксамидиновой группы и активного центра витамина Е позволило получить высокоизбирательный ингибитор nNOS-**14** ($K_i^{\text{r-nNOS}} \approx 0.9$, $K_i^{\text{b-eNOS}} \approx 110$, $K_i^{\text{m-iNOS}} > 300$ мкМ) и антиоксидант BN80933 с антиишемическим действием.^{31, 62}

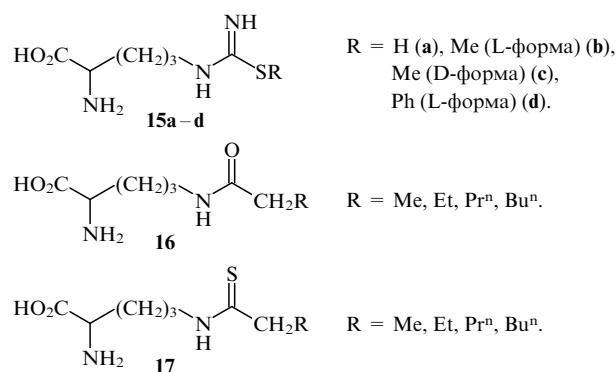


Одним из направлений получения соединений, биологически активных *in vivo*, является синтез пропрепаратов, т.е. веществ, обладающих полезными фармакологическими свойствами (необходимой липофильностью, растворимостью и др.), которые после попадания в организм метаболизируют с выделением ингибитора NOS. Так, *N*-тетразол-5-иламид *N*(6)-(1-иминоэтил)-*L*-лизина **11c** показал в модели эндотоксического шока и артрита эффективность, сравнимую с эффективностью соединения **11a**.⁶³

Полученные данные демонстрируют, что уменьшение основности гуанидин-подобной группы (определяющей связывание ингибитора с ферментом) путем полной замены одной из аминогрупп не ослабляет ингибирующую активность. Более того, после модификации карбоксамидинового остатка арильными и гетарильными фрагментами удалось получить более активные соединения **13a,c,g**.

3. L-Тиоцитруллин и его изотиокарбамидные аналоги

L-Цитруллин и его аналоги **15–17** относятся к обширному классу соединений, в которых один из атомов азота, входящих в гуанидиновую группу, замещен на атом кислорода или серы. Сам L-цитруллин — один из продуктов ферментативного окисления L-аргинина — является чрезвычайно слабым ингибитором NOS.²⁴ Однако L-тиоцитруллин (**15a**) оказался сильным ингибитором, причем nNOS он ингибировал в ~ 50 раз сильнее, чем iNOS (табл. 4).



Одним из механизмов, определяющих прочность связывания соединения **15a** с нейрональной изоформой фермента, является образование связи между атомом Fe гема и тиольной группой ингибитора, что зафиксировано спектрофотометрически (тип II дифференциального спектра гема, регистрируемого при связывании соединений в качестве шестого лиганда гексакоординированного атома Fe).

Введение метильного заместителя в тиольную группу L-тиоцитруллина **15a** с образованием S-метил-L-тиоцитруллина (**15b**) существенно усиливало связывание с ферментом и одновременно уменьшало избирательность. При дальнейшем увеличении размеров алифатического заместителя ингибирующая активность снижалась в ~ 50 раз. В отличие от

Таблица 4. Ингибирующая активность *S*-замещенных производных цитрулина и тиомочевины.

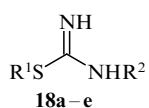
Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
15a	4 ^a	0.02	—	64
15b	0.8 ^b	< 0.1	—	33
18a	6 ^c	> 1	> 1	28
18b	0.1	> 1	1	28
	0.02 ^d	> 1	> 1	65
	0.02 ^c	> 10	> 10	66
18c	0.01	> 10	> 10	66
18d	0.2	> 1	> 10	66
21a	0.007	> 1	> 10	66

^a r-NOS. ^b r-NOS. ^c K_i рассчитано из данных работы³¹. ^d h-NOS.
^e m-iNOS, r-nNOS, b-eNOS.

L-тиоцитрулина **15a** связывание его алифатических производных с ферментом характеризовалось спектральным сдвигом типа I (т.е. дифференциальным спектром, подобным спектру гема при образовании комплекса L-аргинин–фермент). Это отражает вытеснение шестого лиганда от гексакоординированного атома железа гема без образования с ним связи.⁶⁴ В отличие от *N*^ω-алкил-L-аргининов в этой группе ингибиторов для связывания с ферментом стереоселективность не была абсолютно необходима. *S*-Метил-D-тиоцитруллин (**15c**) хотя и слабо, но ингибировал iNOS и nNOS ($IC_{50} \approx 470$ и 160 мкМ соответственно). *S*-Метил-L-тиоцитруллин-L-фенилаланин оказался сильным и селективным ингибитором iNOS ($IC_{50} = 0.65$ мкМ, $n/i \approx 60$).⁶⁷

Замена в L-цитрулине или в L-тиоцитрулине второй аминогруппы на алкильную практически полностью (на два порядка) ослабляет ингибирующую активность таких соединений. Для *N*(5)-ацил-L-орнитинов **16** и *N*(5)-тиоацил-L-орнитинов **17** $IC_{50} \geq 1000$ мкМ. Это свидетельствует о слабой афинности гетероатомов серы и кислорода к каталитическому центру, если алкильная группа находится в положении 6 молекулы. Таким образом, для образования прочного комплекса с ферментом в структуре ингибитора необходима вторая NH-группа, образующая карбоксамидный фрагмент.²⁴

В соединениях, содержащих изотиокарбамидную группу, как и в случае гуанидинов и карбоксамидинов, аминокислотная часть не является обязательным компонентом для создания эффективных ингибиторов. Исключением является тиокарбамид, в котором при атоме азота находится концевой остаток L-тиоцитрулина ($K_i > 2500$ мкМ), а также его *N*-метильные производные. Их ингибирующая активность была значительно меньше (в > 500 раз), чем у соответствующих *S*-алкилпроизводных. Наиболее активными ингибиторами iNOS были этил- (**18b**) и изопропилтиокарбамиды (**18c**), обладающие слабой избирательностью к этой изоформе (см. табл. 4).



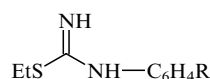
Соединение 18	R^1	R^2
a	$(CH_2)_2NH_2$	H
b	Et	H
c	Pr ⁱ	H
d	$(CH_2)_2C_6H_4OMe-3$	H
e	H	Ph

Все *S*-алкилизотиокарбамиды представляют собой конкурентные обратимые ингибиторы; одновременно они являются субстратами по отношению к гему.^{34, 65, 66} *S*-Этил-изотиокарбамид промотировал димеризацию iNOS в боль-

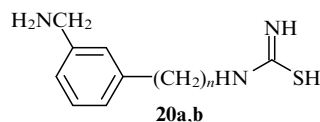
шей степени, чем даже L-аргинин.⁶⁸ *S*-(2-Аминоэтил)-изотиокарбамид (**18a**), как и аминоксидин **1a**, ингибировал экспрессию белка iNOS в макрофагах мыши и в легких крыс.⁶⁹ В водных растворах (pH 7) *S*-аминоалкилизотиокарбамиды претерпевают перегруппировку в соответствующие меркаптоалкилгуанидины,⁷⁰ которые также являются ингибиторами iNOS.⁷¹

Среди *S*-фенилалкильных производных изотиокарбамидов лишь соединение **18d** проявляло селективность, которая выражалась в более слабом ингибировании (в 20 раз) b-eNOS по сравнению с m-iNOS.⁷²

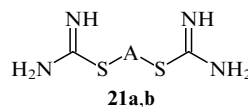
N-Фенильные производные более активно ингибировали nNOS. В то же время, слабой избирательностью обладал *N*-фенилизотиокарбамид (**18e**) ($K_i^{\text{iNOS}} \approx 0.9$ мкМ, $n/i \approx 0.1$ и $e/i \approx 0.5$). Можно отметить, что производные *S*-этил-*N*-фенилизотиокарбамиды проявляли меньшую активность в отношении iNOS по сравнению с nNOS. Значения K_i , n/i и e/i для 2- и 4-трифторметилфенильных производных **19a,b** составляли соответственно: $K_i \approx 20$ и 40 мкМ; $n/i \approx 0.06$ и 0.01; $e/i \approx 1$ и 0.3. Соединение **19b** не ингибировало nNOS в культуре ткани (см. табл. 4).⁷³



19a,b $R = 2\text{-CF}_3$ (**a**), 4-CF_3 (**b**).



20a,b $n = 0$ (**a**), 1 (**b**).



21a,b $A = (CH_2)_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-(CH}_2)_2$ (**a**), $(CH_2)_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-(CH}_2)_2$ (**b**).

Амидин **13a** и его аналог **13b** известны как уникальные ингибиторы. Поэтому на их основе были созданы изотиокарбамидные производные **20a,b**.⁷⁴ Однако ожидаемой ингибирующей активности они не проявили. Наиболее активным был *N*-(3-аминометилфенил)изотиокарбамид (**20a**) ($IC_{50}^{\text{iNOS}} = 23$ мкМ без выраженной селективности). Однако оказалось, что бензильные производные изотиокарбамидов (в частности, соединение **20b**) являются стимуляторами h-iNOS при добавлении одновременно с ¹⁴C-аргинином, без предшествующей инкубации с ферментом.

Введение *N*-аминогруппы в изотиокарбамиды (по аналогии с аминоксидином) не привело к получению достаточно сильных и селективных ингибиторов. Эти соединения были во много раз (> 100) менее активными, чем соответствующие *S*-алкилизотиокарбамиды. Как и аминоксидин, они инактивировали NOS и ускоряли автоинактивацию nNOS в отсутствие субстрата.³¹

Активными оказались соединения **21a,b**, содержащие две изотиокарбамидные группы. *S,S'*-[1,4-Фенилен(бисэтилен)-диизотиокарбамид (**21a**) даже в наномолярной концентрации ингибировал iNOS. Изменение положения заместителей с пара на мета приводило к появлению селективности, так как для *S,S'*-[1,3-фенилен(бисэтилен)]диизотиокарбамиды (**21b**) наблюдалось значительное уменьшение активности по отношению к eNOS ($IC_{50}^{\text{iNOS}} \approx 0.05$ мкМ, $n/i \approx 5$, $e/i \approx 200$).

Кристаллографическое исследование комплексов *S*-алкилизотиокарбамидов (и их селеновых аналогов) с eNOS показало, что в связывании с субстратным «карманом» фермента играют роль не только водородные связи консервативных аминокислот Trp и Glu, являющихся акцепторами субстрата для всех изоформ, но и неполярные взаимодей-

вия в каталитической полости фермента.⁷⁵ Изучение ингибирующей активности соединений **19**, **21a,b** по отношению к eNOS позволило выявить топологические причины афинности ингибиторов к этому конститутивному ферменту, которые частично определялись взаимодействием второй уреидной группы с пропионатом пиррольного кольца D гема.

К получению активных ингибиторов NOS приводило и увеличение длины углеводородного фрагмента, связывающего два изотиокарбамидных остатка, до C_{12–14}. Возможно, это вызвано вовлечением в контакт с ингибитором новых пептидных связей вне каталитического центра и канала доступа субстрата, поскольку бис(изотиокарбамиды) (в отличие от простых S-алкилизотиокарбамидов) ингибируют электронный перенос в восстановительном домене NOS.⁶² К сожалению, фармакологическое использование этого класса соединений ограничено из-за токсичности и плохой проницаемости через клеточные мембраны.⁶⁶

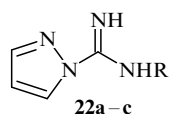
В целом и ингибирующая активность описанных выше соединений, и их избирательность обусловлены механизмом взаимодействия фермент–ингибитор. Самые сильные и селективные ингибиторы отличаются либо «медленной» скоростью связывания с ферментом, либо способностью инактивировать его («суицидные» ингибиторы). Последние (аргинин **2b**, орнитин **11a** и изотиокарбамид **18a**) усиливают протеолиз NOS, в то время как обратимые ингибиторы, такие как соединения **2a** и **18b**, промотируют устойчивость димера NOS.^{36, 76}

IV. Циклические аналоги субстрат-подобных ингибиторов

Включение гуанидин-подобной группы в состав циклической структуры открывает обширное поле для химического конструирования ингибиторов NOS, узнаваемых ферментом-мишенью по принципу подобия с L-аргинином. Эти соединения, содержащие один или два амидиновых атома азота в составе цикла, имеют свои особенности в механизме воздействия.

1. 1H-Пиразол-1-карбоксамидины

1H-Пиразол-1-карбоксамидины представляют собой немногочисленную группу конкурентных ингибиторов NOS, содержащих в гетероцикле один из атомов азота гуанидинового фрагмента.^{77, 78} Базовым соединением является 1H-пиразол-1-карбоксамидин (**22a**), представляющий собой очень сильный, но не селективный ингибитор NOS (табл. 5).



R = H (**a**), CH(NH₂)CH₂NH₂ (**b**),
HNC₆H₄(CH₂)₂NH₂-3 (**c**).

Таблица 5. Ингибирующая активность пиразолов и пирролидинов.

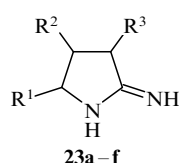
Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
22a	0.7 ^a	~1	~1	78
22b	12	<1	>10	78
23a	5 ^b	<1	>1	56
23b	0.3 ^b	>1	>1	79
23c	0.03	~1	>1	79
23d	0.07	10	400	79
23f	0.15 ^b	>10	>1000	80

^a m-iNOS, r-nNOS, b-eNOS. ^b K_i рассчитано из данных работы³¹.

Введение метильной группы в положение 3 или 4 пиразольного кольца на порядок снижает ингибирующую активность. В целом соединения этого класса в большей степени ингибируют nNOS, в меньшей — eNOS. Выраженная селективность обнаружена у N^G-замещенных производных — 1H-пиразол-N-(1,2-диаминоэтил)-1-карбоксамидина (**22b**) и 1H-пиразол-N-(3-аминоэтиланилино)-1-карбоксамидина (**22c**) (n/i ≈ 0.1, e/i ≈ 10).

2. Циклические амидины

Наиболее исследованным классом циклических ингибиторов NOS являются соединения, содержащие амидиновую группу, в основном гетероциклические имины и имидазолы. Введение алифатических заместителей в положения 4 и 5 пирролидинового кольца сильно увеличивало активность и селективность новых соединений, особенно 4-метил-2-иминопирролидина (**23b**) и 4-метил-*транс*-5-этил-2-иминопирролидина **23c** (см. табл. 5).



R¹ = R² = R³ = H (**a**);
R¹ = R³ = H, R² = Me (**b**);
R¹ = *trans*-Et, R² = Me, R³ = H (**c**);
R¹ = *cis*-n-C₅H₁₁, R² = (+)-Me, R³ = H (**d**);
R¹ = *cis*-n-C₅H₁₁, R² = (+)-CF₃, R³ = H (**e**);
R¹ = (R)-n-C₅H₁₁, R² = (S)-Me,
R³ = (S)-OH (**f**).

Ингибирующая активность производных пирролидина **23b**, **23c** по отношению к iNOS на два порядка выше, чем у исходного соединения **23a** ($K_i^{\text{iNOS}} < 1$ мкМ). Разделение рацемических смесей (+)-4-метил-*цис*-5-н-пентил-2-иминопирролидина (**23d**) и 4-трифторметил-*цис*-5-н-пентил-2-иминопирролидина (**23e**) на стереоизомеры показало, что (+)-*цис*-изомеры почти на порядок более избирательны по отношению к iNOS, чем к eNOS ($K_i \approx 0.1$ мкМ, n/i ≈ 10, e/i > 100).⁷⁹ Это свидетельствует о выявлении у iNOS новых стереоспецифических акцепторов. Недавно описанный ингибитор iNOS — (3S,4S,5R)-3-гидрокси-4-метил-5-н-пентил-2-иминопирролидин (**23f**), проявивший в три раза более высокую избирательность (e/i) по сравнению с соединением **23d**, еще раз подтвердил перспективность поиска стереоселективных ингибиторов iNOS в классе иминопирролидинов.

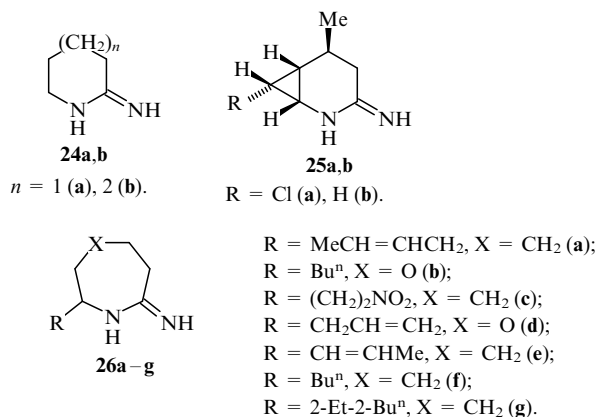
В серии гетероциклических иминов, содержащих от пяти до девяти атомов углерода в цикле, был найден ряд высокоактивных конкурентных ингибиторов iNOS с $K_i < 1$ мкМ (табл. 6), не обладавших, однако, выраженной селектив-

Таблица 6. Ингибирующая активность производных 2-имино-N-содержащих гетероциклов.

Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
24a	0.2 ^a	~1	>1	56
24b	0.4	~1	>1	56
25a	0.002 ^b	—	10	81
26a	0.2 ^a	>1	150	82
26b	0.5	10	300	82
26c	0.03	>1	10	82
26d	0.04 ^a	>1	>10	83
26e	0.03 ^c	>1	>10	83
26f	0.1	~2	130	83
26g	0.4	>1	200	83

^a K_i рассчитан из данных работы³¹. ^b h-NOS. ^c Экспериментальное значение $K_i = 0.09$ мкМ.

ностью. Активность их возрастала при переходе от 2-иминопирролидина (**23a**) к шестичленному амидину — 2-иминопиперидину **24a**, который был в ~25 раз активнее, чем соединение **23a**. При дальнейшем увеличении размеров молекулы ингибитора активность уменьшалась (см. табл. 6).

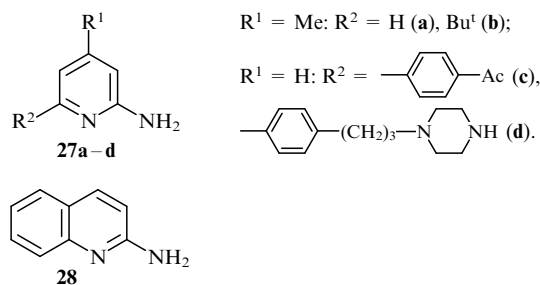


Уникальные ингибирующие свойства были обнаружены у конденсированных шестичленных амидинов. В этом ряду самым активным по отношению к h-iNOS оказался бициклический амидин (1*S*,5*S*,6*R*,7*R*)-3-имино-5-метил-7-хлор-2-азабицикло[4.1.0]гептан (**25a**) (см. табл. 6). Среди других конденсированных и спиробициклических производных 2-иминопиперидина были найдены высокоактивные ингибиторы iNOS ($IC_{50} < 0.1$ мкМ, $e/i > 1$).⁸⁴ Гидрохлорид DL-(1*R*,5*S*,6*R*)-3-имино-5-метил-2-азабицикло[4.1.0]гептана (**25b**) проявил *in vitro* и *in vivo* очень высокую ингибирующую активность ($IC_{50}^{h-iNOS} = 0.09$, $IC_{50}^{m-iNOS} = 0.007$ мкМ соответственно). В экспериментах на мышах, обработанных липополисахаридом, доза препарата, необходимая для уменьшения концентрации нитрит-аниона (продукта метаболизма NO[•]) в плазме крови, составила $0.013 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, что почти в 1500 раз меньше, чем максимально переносимая животными.

Введение боковых заместителей и модификация кольца у гексагидро-2-иминоазепина (**24b**) позволила получить ингибиторы, избирательные к iNOS. Так, гексагидро-7-(бут-2-енил)-2-иминоазепин (**26a**), имеющий в положении 7 алкенильный заместитель, в ~100 раз сильнее ингибировал iNOS по сравнению с eNOS. Появление атома кислорода в положении 5 почти в два раза увеличило селективность гексагидро-7-*n*-бутил-2-имино-5-оксазепина (**26b**) к iNOS по сравнению с eNOS при незначительном изменении ингибирующей активности в отношении nNOS.⁵⁶ Гексагидро-2-имино-7-(2-нитроэтил)азепин (**26c**), содержащий полярную нитроэтильную группу, почти на порядок сильнее ингибировал iNOS, хотя его селективность была невысокой.

Алкилирование в положение 7 в группе гексагидро-2-иминоазепинов (см. табл. 6) увеличивало активность и селективность таких ингибиторов, как гексагидро-7-*n*-бутил-2-имино-5-оксазепин (**26d**), гексагидро-2-имино-7-пропенилазепин (**26e**), гексагидро-7-*n*-бутил-2-иминоазепин (**26f**), гексагидро-2-имино-7-(2-этил-2-*n*-бутил)азепин (**26g**) ($K_i < 1$ мкМ, $e/i > 100$).⁸³

Естественным продолжением поиска ингибиторов NOS в классе гетероциклических иминов стал синтез аналогов иминопиперидинов — аминопиперидинов **27a–d**.

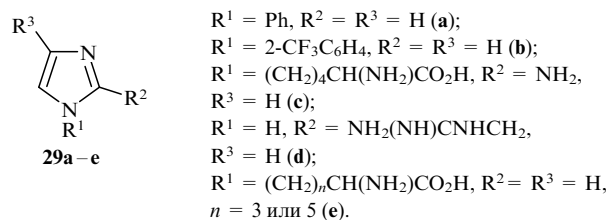


Один из первых ингибиторов этого класса — 2-амино-4-метилпиперидин (**27a**)⁸⁵ (K_i для h-iNOS, h-nNOS, h-eNOS = 55, 65 и 98 мкМ соответственно) — позднее был использован как конкурентный радиолиганд для оценки аффинности и селективности других ингибиторов NOS.³¹ Однако ни соединение **27a**, ни другие моно- и дизамещенные алкильные производные 2-аминопиперидина не проявили выраженной избирательности к индуцибельному ферменту ($n/i > 1$, $e/i > 1$). Наиболее сильным ингибитором iNOS среди них был 2-амино-6-трет-бутил-4-метилпиперидин (**27b**) ($IC_{50} < 1$ мкМ). В группе 2-амино-6-(4-замещенных)фенилпиперидинов (например, **27c**) не наблюдалось iNOS-ингибирующей активности, однако соединение **27d** с арилиденпиперазиновым мостиком оказалось сильным ингибитором для h-nNOS ($IC_{50} < 1$ мкМ) при незначительной селективности ($e/n > 1$). Наибольшую избирательность проявило соединение **27d**; оно ингибировало h-nNOS в шесть раз сильнее, чем h-eNOS ($IC_{50}^{h-nNOS} = 0.14$ мкМ).⁸⁶ 2-Аминопиперидины, конденсированные с пяти- или шестичленными насыщенными и ненасыщенными циклами, оказались активными ингибиторами iNOS ($IC_{50} < 10$ мкМ) без выраженной селективности. При этом соединения, содержащие ненасыщенные циклы, были более активны. Наиболее активным ингибитором iNOS является 2-аминохинолин **28** ($IC_{50} \approx 2$ мкМ).⁸⁷

3. Имидазолы и нитроимидазолы

Производные имидазола можно считать циклическими аналогами карбоксамидинов, включающими в гетероцикл оба амидиновых атома азота. При взаимодействии с ферментом их основной мишенью является гем. Имидазолы связываются с ферментом как шестой лиганд гексакоординированного атома железа в геме, т.е. также как CO, NO[•], O₂, CN[•]. Это свойство хорошо изучено для цитохрома P-450, с которым NOS имеют близкое сходство.⁸⁸

Ингибирование NOS имидазолами носит обратимый характер, однако в зависимости от вида заместителей и источника NOS конкуренцию за связывание с каталитическим центром им составляет BH₄ и/или L-аргинин. Например, 1-фенилимидазол (**29a**) ($IC_{50}^{h-iNOS} \approx 40$ мкМ) — один из наиболее сильных ингибиторов iNOS — неконкурентно (по отношению к L-аргину) связывается с m-iNOS и конкурентно — с b-eNOS (табл. 7).



Эти различия в механизмах ингибирования затрудняют интерпретацию констант ингибирования, полученных спектральными или кинетическими методами.

Таблица 7. Ингибирующая активность производных имидазола и 7-нитроиндазола.

Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
29a	35 ^a	~ 10	~ 20	10
29b	30 ^{a, b}	1	> 10	89, 90
29c	30 ^{a, d}	< 1	< 1	91
29d	10	< 1	> 1	92
31b	0.03 ^{a, e}	> 1	1000	93
33	1.6 ^{a, f}	0.1	0.5	94

^a IK_{50} . ^b r-iNOS, m-nNOS, b-eNOS. ^c r-nNOS, e-hNOS. ^d r-iNOS, r-nNOS, h-eNOS. ^e h-iNOS, грубый клеточный лизат. ^f m-iNOS, b-nNOS, b-eNOS.

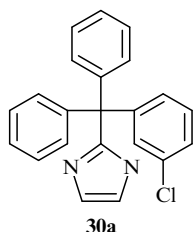
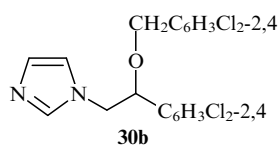
Модификация заместителя при атоме азота приводит к получению ингибиторов, активных по отношению к nNOS. Однако часто используемый 1-(2-трифторметилфенил)-имидазол (**29b**) в опытах *in vitro* значительной активности и избирательности не проявил (см. табл. 7), хотя он снижал болевую чувствительность животных к формалину, что отражает его nNOS-ингибирующую способность. Производные имидазола с заместителями в положениях 2 и 4 уменьшают свою ингибирующую активность ($IC_{50} > 1000$ мкМ),⁹⁵ поэтому среди 1,2-дизамещенных имидазолов получить высокоэффективные ингибиторы не удалось. Считается, что соединения с подобной структурой могут быть полезными инструментами для выяснения особенностей гуанидин-кислород- и BH_4 -связывающих участков NOS.⁹⁶

Увеличение длины алифатического мостика между имидазолом и аминокислотной группой позволило получить активные соединения.⁹² Ингибиторы с нечетным числом метиленовых групп **29e** были более избирательны к nNOS ($K_i^{\text{nNOS}} = 2$ мкМ для обоих соединений). Соединения, содержащие четное число метиленовых групп, проявляли меньшую активность.

Кристаллографические исследования показали, что с окислительным доменом мономера m-iNOS могут одновременно связываться две молекулы имидазола: одна в каталитическом центре как шестой лиганд атома железа гема; другая — в гуанидин-связывающей полости с Glu371.²² В связи с этим были синтезированы гуанидин-замещенные имидазолы. Однако большинство препаратов оказались мало активны или совсем неактивны. Наиболее сильным ингибитором среди них было производное имидазола **29d** (по отношению к iNOS ($IC_{50} \approx 140$ мкМ)).⁹⁷

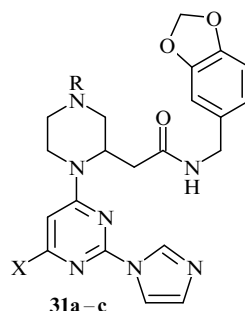
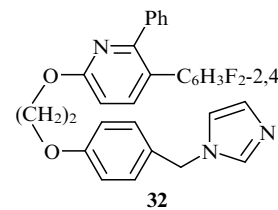
Были сделаны попытки усиления ингибирующей активности имидазолов путем включения в молекулу этих ингибиторов аминокислотного остатка. 2-Амино-5-(имидазол-1-ил)пентановая кислота (**29c**) была наиболее активной (см. табл. 7).

Среди имидазолов, содержащих объемные заместители, обнаружены антигрибковые препараты — клотримазол (**30a**) и миконазол (**30b**), которые ингибировали nNOS конкурентно с CaM .⁹⁸

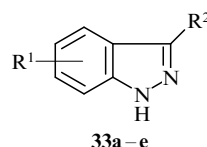
**30a****30b**

Кроме того, эти препараты *in vitro* являлись ингибиторами димеризации окислительного домена iNOS. В клетках RAW264.7 клотримазол (50 мкМ) также блокировал образование димерной iNOS,⁹⁹ в отличие от субстрат-подобных ингибиторов, в присутствии которых доля димерной iNOS увеличивалась с 50 до 90%.^{18, 69}

Мощные ингибиторы с объемными заместителями были обнаружены при скрининге 8649 соединений, полученных методом комбинаторной химии на основе азотсодержащих гетероциклов.⁹³ Из 53 соединений, ингибирующих iNOS на 60% при 200 мкМ, были отобраны три — соединения **31a–c**, имеющие $IC_{50}^{\text{iNOS}} < 1$ мкМ в клеточной тест-системе.

**31a–c****32**

R = H, X = Cl (**a**); R = CO₂Me, X = H (**b**);
R = CO₂Et, X = H (**c**).

**33a–e**

R¹ = 7-NO₂; R² = H (**a**), Br (**b**);
R¹ = 6-NO₂, R² = H (**c**);
R¹ = R² = H (**d**);
R¹ = 5-NO₂, R² = H (**e**).

Соединение **31b** было высокоактивным ингибитором nNOS не только в культуре клеток,¹⁰⁰ но и при введении животным, обработанным липополисахаридом ($ID_{50} = 1.2$ мг · кг⁻¹) (см. §) (по критерию снижения содержания нитрита в плазме крови крыс). Кристаллографический анализ комплекса окислительного домена iNOS с соединением **31b** показал, что свободный азот имидазола координируется с атомом железа гема в шестом аксиальном положении и что под действием имидазольного, пиримидинового и пиперазинового колец, находящихся рядом, нарушается структура гуанидин-связывающей последовательности, включающей Glu371. Ингибиторы из этого ряда соединений не подавляли активность димерных NOS. Однако среди имидазолсодержащих соединений были найдены и ингибиторы.

3-(2,4-Дифторфенил)-6-{2-[4-(1H-имидазол-1-илметил)фенокси]этокси}-2-фенилпиридин (**32**) ингибировал синтез NO[•] в активированных макрофагах с $IC_{50} = 0.08$ мкМ и проявлял терапевтический эффект в модели экспериментального артрита.¹⁰¹

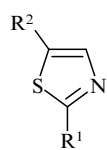
Механизм ингибирования посредством взаимодействия с гемом осуществлялся для соединений нитроиндазольного ряда. Наиболее известный препарат — 7-нитроиндазол **33a** — является конкурентным ингибитором iNOS (по отношению к L-аргину и к BH_4) и eNOS (по отношению к BH_4). Это связано с тем, что соединение **33a**, как и его аналог — 3-бром-7-нитроиндазол (**33b**) ($IC_{50}^{\text{iNOS}} = 0.29$ мкМ, n/I < 1, e/I > 1),¹⁰² контактирует с одной из пропионатных групп гема, подавляя его взаимодействие с BH_4 .⁶²

§ ID_{50} — доза препарата, при которой скорость синтеза NO[•] уменьшается в два раза по сравнению с интактным объектом.

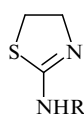
Нитроиндазолы **33с** ($K_i^{b-nNOS} = 40$ мкМ) и **33а** были наиболее сильными ингибиторами b-nNOS, в то время как ингибирующие активности индазола (**33д**) и 5-нитроиндазола (**33е**) были крайне слабыми ($IC_{50} > 1000$ мкМ).¹⁰³ Однако по данным работы¹⁰⁴ соединения **33с,е** практически не различались по активности при ингибировании г-nNOS. Селективность 7-нитроиндазола **33а** по отношению к nNOS, которая проявляется *in vivo*, вероятно, связана с его проницаемостью через клеточные мембраны и метаболизмом.¹⁴

4. Циклические аналоги изотиомочевин

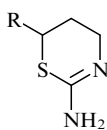
Циклизацией S-аминоалкилизотиомочевин можно получить соответствующие S,N-гетероциклы со структурой, изостерической гуанидиновой группе L-аргинина.^{105,106} Хотя сам тиазол **34а** — очень слабый ингибитор всех изоформ NOS ($K_i > 200$ мкМ), введение в него аминогруппы с образованием 2-аминотиазола (**34б**) в ~5 раз увеличивало ингибирующую активность по отношению к iNOS (табл. 8).



34a–d



35a,b



36a,b

$R^1 = R^2 = H$ (a);
 $R^1 = NH_2$; $R^2 = H$ (b), Me (c);
 $R^1 = NH(CH_2)_3Cl$, $R^2 = H$ (d).

$R = H$ (a);

$(CH_2)_3Ala$ (b).

$R = H$ (a);

Me (b).

Еще более активен 2-амино-5-метилтиазол (**34с**) ($IC_{50} \approx 12$ мкМ).⁶¹ Однако эти ингибиторы не проявили селективности ни к одной изоформе NOS. N(5)-(Тиазолин-2-ил)-L-орнитин (**35b**), полученный модификацией аминогруппы 2-амино-2-тиазолина (**35а**), является активным ингибитором eNOS ($IC_{50} \approx 1$ мкМ). В то же время N(5)-(тиазол-2-ил)-L-орнитин (**34д**) оказался слабым ингибитором.¹⁰⁷

Продукт циклизации S-аминопропиллизотиомочевин — 2-амино-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин (**36а**) — обладал активностью и избирательностью, подобной соединению **35а** (см. табл. 8). Замещение в положение 6 существенно увеличивало активность и селективность получаемых производных (как и в N-содержащих гетероциклических иминах) (см. табл. 6). Так, 2-амино-6-метил-5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин (**36б**) почти в 150 раз сильнее ингибировал iNOS по сравнению с тиазином **36а**.

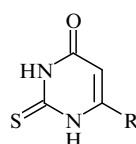
Таблица 8. Ингибирующая активность циклических аналогов изотиомочевин.

Соединение	K_i^{iNOS} , мкМ	Селективность		Ссылки
		n/i	e/i	
34b	50 ^a	<1	<1	61
35a	0.3	2	1	61
35b	8 ^{b,c}	<1	<1	107
36a	0.6 ^d	1	2	56
36b	0.004 ^e	>10	>10	65
39	9 ^f	1	0.3	108
40	2	20	4	108
41	2	25	1	108
42	0.8 ^g	>1	>1	109

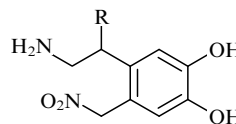
^a h-NOS. ^b IC_{50} . ^c r-iNOS, r-nNOS, h-eNOS. ^d K_i рассчитано из данных работы³¹. ^e m-iNOS, r-nNOS, b-eNOS. ^f [Arg] = 5 мкМ, m-iNOS, m-nNOS, b-eNOS. ^g h-NOS.

5. Другие ингибиторы

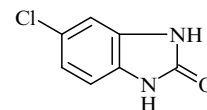
Ингибирующие свойства по отношению к NOS были обнаружены у ряда антигипертензивных препаратов из класса тиоурацилов. 6-Метил- (**37а**) и 6-н-пропил-2-тиоурацил (**37б**) проявили избирательность к ингибированию г-nNOS. В концентрации 500 мкМ соединение **37а** ингибировало синтез L-цитруллин изоформами фермента — m-iNOS, r-nNOS и b-eNOS на ≈ 20 , 80 и 40% соответственно.¹¹⁰ Ингибирование имело конкурентный и обратимый характер; определенную роль в эффекте играло подавление BH_4 -зависимой димеризации nNOS.¹¹¹



37a,b



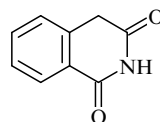
38a,b



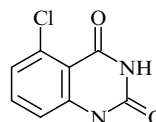
39

$R = Me$ (a), Pr^n (b).

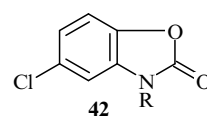
$R = H$ (a), OH (b).



40



41



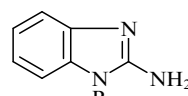
42

$R = CH_2-N(CH_2)_2-O$.

Включение нитрогруппы в дофамин и норадреналин привело к нитропроизводным: 4-(2-аминоэтил)-5-нитрометилпирокатехину (**38а**) и 4-(2-аминоэтил-1-гидрокси)-5-нитрометилпирокатехину (**38б**), которые ингибировали NOS более чем на два порядка сильнее ($K_i \approx 50$ мкМ) по сравнению с исходными катехоламинами. Ингибирование было обратимым и конкурентным с L-аргонином и BH_4 ; кроме того, наблюдалась небольшая избирательность в отношении г-nNOS, что может объясняться подавлением димеризации фермента.¹¹² Полученные результаты говорят о существенной роли нитрогруппы в образовании комплекса ингибитор–NOS.

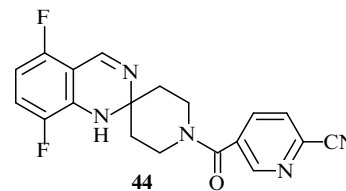
При скрининге химической библиотеки был обнаружен ряд перспективных бициклических ингибиторов NOS. Так, IC_{50}^{m-iNOS} для 5-хлор-1,3-дигидро-2H-бензимидазол-2-она (**39**), 1,3-(2H,4H)-изохинолиндиона (**40**) и 5-хлор-2,4-(1H,3H)-хиназолондиона (**41**) были <10 мкМ. Избирательность по отношению к г-nNOS (n/i) у соединений **39** и **41** — >10, а по отношению к b-eNOS >1. Среди бензоксазолонов активным ингибитором h-iNOS оказался N-морфолин-ометил-6-хлорбензоксазолон (**42**), не обладавший, однако, заметной селективностью (см. табл. 8).

Описано,¹¹³ что замещенные 2-аминобензимидазолы **43а–д** проявляют ингибирующую активность по отношению к NOS. 2-Аминобензимидазол (**43а**) конкурентным образом ингибировал iNOS при минимальной селективности по отношению к eNOS ($IC_{50}^{h-iNOS} = 25$ мкМ, n/i ≈ 3 , e/i > 5). Более избирательным к h-nNOS оказался 2-амино-1-аминометилбензимидазол (**43б**) ($IC_{50}^{h-nNOS} \approx 6$ мкМ, n/i < 0.1, n/e < 0.1). 1-Этил- (**43д**) и 2-амино-1-изопропиламинобензимидазол (**43с**) были неактивны.¹¹³



43a–d

$R = H$ (a), CH_2NH_2 (b),
 Pr^iNH (c), Et (d).



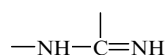
44

Недавно обнаружена iNOS-ингибирующая активность среди соединений класса 1,2-дигидрохиназолинаминов и их спироциклических производных.¹¹⁴ Так, высокую эффективность *in vitro* и *in vivo* показал гидрохлорид 1-(6-циано-3-пиридилкарбонил)-5',8'-дифторспиро[пиперидин-4,2'-(1'H)-хиназолин]-4'-амина (**44**) ($IC_{50}^{h-iNOS} = 0.04$ мкМ, $n/i > 10$, $e/i > 1000$).

В. Заключение

На основании приведенных выше данных можно выделить следующие физико-химические особенности, которые обуславливают эффективность ингибиторов NOS, взаимодействующих с каталитическим центром фермента.

1. Гуанидиновая, карбоксамидиновая или изотиокарбамидная группы в линейной или циклической структуре



обеспечивает образование водородной связи с Glu и/или координационной связи с атомом Fe гема.

2. Необходимы небольшие гидрофобные заместители у гуанидин-подобной группы (алкильные, фенильные, тинильные), которые могут обеспечивать дополнительные связи с пептидными участками, проксимальными к гему.

3. Химическая активность гуанидин-подобной группы как псевдосубстрата может решающим образом влиять и на селективность, и на ингибирующую активность субстрат-подобных соединений.

4. Помимо этих факторов повышению эффективности ингибирования NOS *in vivo* могут способствовать такие свойства соединений, как подавление супероксид-синтазной активности фермента, регуляция процесса димеризации NOS и инактивация активных форм кислорода, продуцируемых NOS.¹¹⁵

Следует ожидать, что следующим этапом химического синтеза и отбора фармакологических агентов, модифицирующих ферментативное образование NO[•], будет создание соединений, сочетающих несколько функций: специфичность к изоформам NOS, антиоксидантную активность и специфичность к накоплению в субклеточных мишенях (кавеолах, синапсах, митохондриях и др.).

Авторы приносят благодарность за полезные обсуждения и замечания профессору Т.М.Рошиной, профессору Ф.А.Трофимову и кандидату химических наук В.Ю.Ковтуну, а также создателям сайта molbiol.ru за информационную поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 03-04-48349 и 04-04-48218), Правительства Калужской области (проект № 04-04-97238), Международного научно-технического центра (проект № 779В).

Литература

1. L.J.Ignarro, K.S.Wood, R.E.Byms. *Circulation*, **74**, II-287 (1986)
2. R.M.J.Palmer, A.G.Ferrige, S.Moncada. *Nature (London)*, **327**, 524 (1987)
3. С.Я.Проскуряков, А.Г.Коноплянников, А.И.Иванников, В.Г.Скворцов. *Успехи совр. биологии*, **119**, 380 (1999)
4. С.Я.Проскуряков, А.И.Иванников, В.Г.Скворцов, С.Ф.Бикетов. *Иммунология*, **4**, 9 (2000)
5. С.Я.Проскуряков, А.Г.Коноплянников, А.И.Иванников, В.Г.Скворцов, А.Ф.Цыб. *Вопросы онкологии*, **47**, 257 (2001)
6. С.Я.Проскуряков, В.Л.Габай, А.Г.Коноплянников. *Биохимия*, **67**, 467 (2002)
7. M.N.Muscara, J.L.Wallace. *Am. J. Physiol.*, **276**, G1313 (1999)
8. A.J.Hobbs, A.Higgs, S.Moncada. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 191 (1999)
9. В.Г.Граник, С.Ю.Рябова, Н.Б.Григорьев. *Успехи химии*, **66**, 792 (1997)
10. L.Salerno, V.Sorrenti, C.Di Giacomo, G.Romeo, M.A.Siracusa. *Curr. Pharm. Desigh*, **8**, 177 (2002)
11. E.W.J.A.Albrecht, C.A.Stegeman, P.Heeringa, R.H.Henning, H.van Goor. *J. Pathol.*, **199**, 8 (2003)
12. D.W.Reif, D.J.McCarthy, E.Gregan, J.E.Macdonald. *Free Radical Biol. Med.*, **28**, 1470 (2000)
13. W.K.Alderton, C.E.Cooper, R.G.Knowles. *Biochem. J.*, **357**, 593 (2001)
14. A.C.F.Gorren, B.Mayer. *Curr. Drug Metab.*, **3**, 133 (2002)
15. J.L.Zweier, A.Samouilov, P.Kuppusamy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 250 (1999)
16. D.K.Ghosh, J.C.Salerno. *Front. Biosci.*, **8**, D193 (2003)
17. H.Li, C.S.Raman, C.B.Glaser, E.Blasko, T.A.Young, J.F.Parkinson, M.Whitlow, T.L.Poulos. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21276 (1999)
18. Q.A.Albakri, D.J.Stuehr. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5414 (1996)
19. B.M.List, B.Klosch, C.Volker, A.C.F.Gorren, W.C.Sessa, E.R.Werner, W.R.Kukovetz, K.Schmidt, B.Mayer. *Biochem. J.*, **323**, 159 (1997)
20. K.Panda, R.J.Rosenfeld, S.Ghosh, A.L.Meade, E.D.Getzoff, D.J.Stuehr. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31020 (2002)
21. T.O.Fischmann, A.Hruza, X.D.Niu, J.D.Fossetta, C.A.Lunn, E.Dolphin, A.J.Prongay, P.Reichert, D.J.Lundell, S.K.Narula, P.C.Weber. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 233 (1999)
22. Y.Lee, M.A.Marletta, P.Martasek, L.J.Roman, B.S.S.Masters, R.B.Silverman. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1097 (1999)
23. R.Fedorov, E.Hartman, D.K.Ghosh, I.Schlichting. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45818 (2003)
24. B.R.Babu, C.Frey, O.W.Griffith. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25218 (1999)
25. B.C.Fan, J.L.Wang, D.J.Stuehr, D.L.Rousseau. *Biochemistry*, **36**, 12660 (1997)
26. N.C.Gerber, I.Rodriguez-Crespo, C.R.Nishida, P.R.O.de Montellano. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6285 (1997)
27. L.E.Bretscher, H.Y.Li, T.L.Poulos, O.W.Griffith. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46789 (2003)
28. S.Moncada, A.Higgs, K.Furchgott. *Pharmacol. Rev.*, **49**, 137 (1997)
29. P.E.Chabrier, M.Augué, B.Spinnewyn, S.Auvin, S.Cornet, C.Demerle-Pallardy, C.Guillemard-Favre, J.G.Marin, B.Pignol, V.Gillard-Roubert, C.Roussilote-Harnet, J.Schulz, I.Viossat, D.Bigg, S.Moncada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10824 (1999)
30. K.Narayanan, L.Spack, K.McMillan, R.G.Kilbourn, M.A.Hayward, B.S.S.Masters, O.W.Griffith. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11103 (1995)
31. R.Boer, W.-R.Ulrich, T.Klein, B.Mirau, S.Haas, I.Baur. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 1026 (2000)
32. D.J.Wolf, D.S.Gauld, M.J.Neulander, G.Southan. *J. Exp. Pharmacol. Ther.*, **283**, 265 (1977)
33. J.L.Collins, B.G.Shearer, J.A.Oplinger, S.L.Lee, E.P.Garvey, M.Salter, C.Duffy, T.C.Burnette, E.S.Furfine. *J. Med. Chem.*, **41**, 2858 (1998)
34. H.Q.Zhang, W.Fast, M.A.Marletta, P.Martasek, R.B.Silverman. *J. Med. Chem.*, **40**, 3869 (1997)
35. M.Dambrova, O.Kirjanova, L.Baumane, E.Liepinsh, L.Zvejniece, R.Muceniece, I.Kalvinsh, J.E.S.Wikberg. *J. Physiol. Pharmacol.*, **54**, 339 (2003)
36. S.Noguchi, S.Jianmongkol, A.T.Bender, Y.Kamada, D.R.Demady, Y.Osawa. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2376 (2000)
37. E.S.Furfine, M.F.Harmon, J.E.Paith, E.P.Garvey. *Biochemistry*, **32**, 8512 (1993)
38. D.W.Reif, S.A.McCreedy. *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 170 (1995)
39. J.L.Vuletich, E.R.Lowe, S.Jianmongkol, Y.Kamada, U.M.Kent, A.T.Bender, D.R.Demady, P.F.Hollenberg, Y.Osawa. *Mol. Pharmacol.*, **62**, 110 (2002)
40. P.L.Feldman, O.W.Griffith, H.Hong, D.J.Stuehr. *J. Med. Chem.*, **36**, 491 (1993)
41. N.M.Olken, M.A.Marletta. *Biochemistry*, **32**, 9677 (1993)
42. N.M.Olken, Y.Osawa, M.A.Marletta. *Biochemistry*, **33**, 14784 (1994)
43. A.J.Cardounel, J.L.Zweier. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33995 (2002)

44. N.M.Olken, M.A.Marletta. *J. Med. Chem.*, **35**, 1137 (1992)
45. C.Mitaka, Y.Hirata, K.Yokoyama, T.Imai. *J. Crit. Care*, **16**, 17 (2001)
46. D.Fishlock, B.Perdicakis, H.J.Montgomery, J.G.Guillemette, E.Jervis, G.A.Lajoie. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 869 (2003)
47. В.Г.Граник, Н.Б.Григорьев. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1286 (2002)
48. D.R.Demady, S.Jianmongkol, J.L.Vuletich, A.T.Bender, Y.Osawa. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 24 (2001)
49. R.B.Silverman, H.Huang, M.A.Marletta, P.Martasek. *J. Med. Chem.*, **40**, 2813 (1997)
50. H.Huang, P.Martasek, L.J.Roman, B.S.S.Masters, R.B.Silverman. *J. Med. Chem.*, **42**, 3147 (1999)
51. J.M.Hah, L.J.Roman, P.Martasek, R.B.Silverman. *J. Med. Chem.*, **44**, 2667 (2001)
52. J.M.Hah, P.Martasek, L.J.Roman, R.B.Silverman. *J. Med. Chem.*, **46**, 1661 (2003)
53. M.Cowart, E.A.Kowaluk, J.F.Daenen, K.L.Kohlhaas, K.M.Alexander, F.L.Wagenaar, J.F.Kerwin. *J. Med. Chem.*, **41**, 2636 (1998)
54. B.R.Babu, O.W.Griffith. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8882 (1998)
55. W.M.Moore, R.K.Webber, K.F.Fok, G.M.Jerome, J.R.Connor, P.T.Manning, P.S.Wyatt, T.P.Misko, F.S.Tjoeng, M.G.Currie. *J. Med. Chem.*, **39**, 669 (1996)
56. E.A.Hallinan, S.Tsymbalov, P.M.Finnegan, W.M.Moore, G.M.Jerome, M.G.Currie, B.S.Pitzele. *J. Med. Chem.*, **41**, 775 (1998)
57. R.J.Young, R.M.Beams, K.Carter, H.A.R.Clark, D.M.Coe, C.L.Chambers, P.I.Davies, J.Dawson, M.J.Drysdale, K.W.Franzman, C.French, S.T.Hodgson, H.F.Hodson, S.Kleanthous, P.Rider, D.Sanders, D.A.Sawyer, K.J.Scott, B.G.Shearer, R.Stocker, S.Smith, M.C.Tackley, R.G.Knowles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 597 (2000)
58. R.J.Young, W.K.Alderton, P.J.Beswick, D.Brown, C.L.Chambers, M.Chandler, C.L.Craig, J.Dawson, S.J.Faulkes, S.T.Hodgson, S.Kleanthous, R.Stocker, M.C.Tackley, R.G.Knowles. In *ASC Meeting (Abstracts of Reports)*. Chicago, IL, 2001. P. 53
59. E.A.Hallinan, S.W.Kramer, S.C.Houdek, W.M.Moore, G.M.Jerome, D.P.Spangler, A.M.Stevens, H.S.Shieh, P.T.Manning, B.S.Pitzele. *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 3527 (2003)
60. G.J.Southan, C.Szabo, M.P.Connor, A.L.Salzman, C.Thiemermann. *Eur. J. Pharmacol.*, **291**, 311 (1995)
61. E.P.Garvey, J.A.Oplinger, E.S.Furfine, R.J.Kiff, F.Laszlo, B.J.R.Whittle, R.G.Knowles. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4959 (1997)
62. C.S.Raman, H.Li, P.Martasek, G.Southan, B.S.Masters, T.L.Poulos. *Biochemistry*, **40**, 13448 (2001)
63. E.A.Hallinan, S.Tsymbalov, C.R.Dorn, B.S.Pitzele, D.W.Hansen, W.M.Moore, G.M.Jerome, J.R.Connor, L.F.Branson, D.L.Widomski, Y.Zhang, M.G.Currie, P.T.Manning. *J. Med. Chem.*, **45**, 1686 (2002)
64. C.Frey, K.Narayanan, K.Mcmillan, L.Spack, S.S.Gross, B.S.Masters, O.W.Griffith. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26083 (1994)
65. M.Nakane, V.Klinghofer, J.E.Kuk, J.L.Donnelly, G.P.Budzik, J.S.Pollock, F.Basha, G.W.Carter. *Mol. Pharmacol.*, **47**, 831 (1995)
66. E.P.Garvey, J.A.Oplinger, G.J.Tanoury, P.A.Sherman, M.Fowler, S.Marshall, M.F.Harmon, J.E.Paith, E.S.Furfine. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26669 (1994)
67. N.Kobayashi, T.Higuchi, Y.Urano, K.Kikuchi, M.Hirobe, T.Nagano. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 936 (1999)
68. N.Sennequier, D.J.Stuehr. *Biochemistry*, **35**, 5883 (1996)
69. H.Ruetten, C.Thiemermann. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 525 (1996)
70. D.Doherty, R.Shapiro, W.T.Burnett. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5667 (1957)
71. G.J.Southan, B.Zingarelli, M.O'Connor, A.L.Salzman, C.Szabo. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 619 (1996)
72. N.C.Stratman, G.J.Fici, V.H.Sethy. *Life Sci.*, **59**, 945 (1996)
73. B.G.Shearer, S.L.Lee, J.A.Oplinger, L.W.Frick, E.P.Garvey, E.S.Furfine. *J. Med. Chem.*, **40**, 1901 (1997)
74. C.L.Goodyer, E.C.Chinje, M.Jaffar, I.J.Stratford, M.D.Threadgill. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 4189 (2003)
75. H.Y.Li, C.S.Raman, P.Martasek, V.Kral, B.S.S.Masters, T.L.Poulos. *J. Inorg. Biochem.*, **81**, 133 (2000)
76. Y.Osawa, E.R.Lowe, A.C.Everett, A.Y.Dunbar, S.S.Billecke. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 493 (2003)
77. G.J.Southan, D.Gauld, A.Lubeskie, B.Zingarelli, S.Cuzzocrea, A.L.Salzman, C.Szabo, D.J.Wolff. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 409 (1997)
78. Y.Lee, P.Martasek, L.J.Roman, R.B.Silverman. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2771 (2000)
79. T.J.Hagen, A.A.Bergmanis, S.W.Kramer, K.F.Fok, A.E.Schmelzer, B.S.Pitzele, L.Swanton, G.M.Jerome, C.M.Kornmeier, W.M.Moore, L.F.Branson, J.R.Connor, P.T.Manning, M.G.Currie, E.A.Hallinan. *J. Med. Chem.*, **41**, 3675 (1998)
80. S.Tsymbalov, T.J.Hagen, W.M.Moore, G.M.Jerome, J.R.Connor, P.T.Manning, B.S.Pitzele, E.A.Hallinan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3337 (2002)
81. M.Naka, T.Nanbu, K.Kobayashi, Y.Kamanaka, M.Komeno, R.Yanase, T.Fukutomi, S.Fujimura, H.G.Seo, N.Fujiwara, S.Ohuchida, K.Suzuki, K.Kondo, N.Taniguchi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 663 (2000)
82. A.E.Moormann, S.Metz, M.V.Toth, W.M.Moore, G.Jerome, C.Kornmeier, P.Manning, D.W.Hansen, B.S.Pitzele, R.K.Webber. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2651 (2001)
83. D.W.Hansen, K.B.Peterson, M.Trivedi, S.W.Kramer, R.K.Webber, F.S.Tjoeng, W.M.Moore, G.M.Jerome, C.M.Kornmeier, P.T.Manning, J.R.Connor, T.P.Misko, M.G.Currie, B.S.Pitzele. *J. Med. Chem.*, **41**, 1361 (1998)
84. Y.Kawanaka, K.Kobayashi, S.Kusuda, T.Tatsumi, M.Murota, T.Nishiyama, K.Hisaichi, A.Fujii, K.Hirai, M.Naka, M.Komeno, Y.Odagaki, H.Nakai, M.Toda. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 1723 (2003)
85. W.S.Faraci, A.A.Nagel, K.A.Verdries, L.A.Vincent, H.Xu, L.E.Nichols, J.M.Labasi, E.D.Salter, E.R.Pettipher. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 1101 (1996)
86. J.A.Lowe, W.M.Qian, R.A.Volkmann, S.Heck, J.Nowakowski, R.Nelson, C.Nolan, D.Liston, K.Ward, S.Zorn, C.Johnson, M.Vanase, W.S.Faraci, K.A.Verdries, J.Baxter, S.Doran, M.Sanders, M.Ashton, P.Whittle, M.Stefaniak. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2569 (1999)
87. W.K.Hagmann, C.G.Caldwell, P.Chen, P.L.Durette, C.K.Esser, T.J.Lanza, I.E.Kopka, R.Guthikonda, S.K.Shah, M.MacCoss, R.M.Chabin, D.Fletcher, S.K.Grant, B.G.Green, J.L.Humes, T.M.Kelly, S.Luell, R.Meurer, V.Moore, S.G.Pacholok, T.Pavia, H.R.Williams, K.K.Wong. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1975 (2000)
88. K.A.White, M.A.Marletta. *Biochemistry*, **31**, 6627 (1992)
89. R.L.S.Handy, P.K.Moore. *Life Sci.*, **60**, PL389 (1997)
90. R.L.S.Handy, H.P.Wallace, Z.A.Gaffen, K.J.Whitehead, P.K.Moore. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 2349 (1995)
91. S.Ulhaq, E.C.Chinje, M.A.Naylor, M.Jaffar, L.J.Stratford, M.D.Threadgill. *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 2139 (1998)
92. Y.Lee, P.Martasek, J.Roman, B.S.S.Masters, R.B.Silverman. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1941 (1999)
93. K.McMillan, M.Adler, D.S.Auld, J.J.Baldwin, E.Blasko, L.J.Browne, D.Chelsky, D.Davey, R.E.Dolle, K.A.Eagen, S.Erickson, R.I.Feldman, C.B.Glaser, C.Mallari, M.M.Morrissey, M.H.Ohlmeier, G.Pan, J.F.Parkinson, G.B.Phillips, M.A.Polokoff, N.H.Sigal, R.Vergona, M.Whitlow, T.A.Young, J.J.Devlin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1506 (2000)
94. D.J.Wolff, A.Lubeskie, S.Umansky. *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 360 (1994)
95. R.M.Chabin, E.McCauley, J.R.Calaycay, T.M.Kelly, K.L.MacNaul, C.Wolfe, N.I.Hutchinson, S.Madhusudanaraju, J.A.Schmidt, J.W.Kozarich, K.K.Wong. *Biochemistry*, **35**, 9567 (1996)
96. V.Berka, G.Palmer, P.F.Chen, A.L.Tsai. *Biochemistry*, **37**, 6136 (1998)
97. R.N.Atkinson, S.B.King. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2953 (1999)
98. D.J.Wolff, G.A.Datto, R.A.Samatovicz. *J. Biol. Chem.*, **268**, 9430 (1993)
99. N.Sennequier, D.Wolan, D.J.Stuer. *J. Biol. Chem.*, **274**, 930 (1999)

100. H.-J.Habisch, A.C.F.Gorren, H.Liang, R.C.Venema, J.F.Parkinson, K.Schmidt, B.Mayer. *Mol. Pharm.*, **63**, 682 (2003)
101. M.Ohtsuka, F.Konno, H.Honda, T.Oikawa, M.Ishikawa, N.Iwase, K.Isomae, F.Ishii, H.Hemmi, S.Sato. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 52 (2002)
102. P.A.Bland-Ward, P.K.Moore. *Life Sci.*, **57**, PL131 (1995)
103. D.J.Wolff, B.J.Gribin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 300 (1994)
104. R.C.Babbedge, P.A.Blandward, S.L.Hart, P.K.Moore. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 225 (1993)
105. А.Г.Тарасенко, Э.Я.Граевский, М.М.Константинова, А.А.Мандругин, И.В.Некрасова, В.М.Федосеев. *Докл. АН СССР*, **187**, 203 (1969)
106. Г.В.Донцова, М.М.Константинова, А.А.Мандругин, О.Н.Рахманина, В.М.Федосеев, Ю.В.Шлыков. *Хим.-фарм. журн.*, (3), 306 (1986)
107. S.Ulhaq, E.C.Chinje, M.A.Naylor, M.Jaffar, I.J.Stratford, M.D.Threadgill. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1787 (1999)
108. Y.Kita, M.Muramoto, A.Fujikawa, T.Yamazaki, Y.Notsu, S.Nishimura. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1141 (2002)
109. K.Shankaran, K.L.Donnelly, S.K.Shah, J.L.Humes, S.G.Pacholok, S.K.Grant, B.G.Gree, M.Maccoss. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2887 (1997)
110. A.Palumbo, M.d'Ischia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 793 (2001)
111. A.Palumbo, M.d'Ischia, F.A.Cioffi. *FEBS Lett.*, **485**, 109 (2000)
112. A.Palumbo, G.Astarita, M.d'Ischia. *Biochem J.*, **356**, 105 (2001)
113. P.Hamley, A.C.Tinker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 1573 (1995)
114. A.C.Tinker, H.G.Beaton, N.Boughton-Smith, T.R.Cook, S.L.Cooper, L.Fraser-Rae, K.Hallam, P.Hamley, T.McInally, D.J.Nicholls, A.D.Pimm, A.V.Wallace. *J. Med. Chem.*, **46**, 913 (2003)
115. С.Я.Проскуряков, А.Г.Коноплянников, В.Г.Скворцов, А.А.Мандругин, В.М.Федосеев. *Биохимия*, **70**, 82 (2005)

NO-SYNTHASE INHIBITORS CONTAINING A CARBOXAMIDINE GROUP OR ITS ISOSTERES

S.Ya.Proskuryakov, A.G.Konoplyannikov, V.G.Skvortzov, A.A.Mandrugin, V.M.Fedoseev

Medical Radiological Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences

4, Ul. Koroleva, 249036 Obninsk, Russian Federation, Fax +7(095)956-1440

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov State University

1, Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-3187

The review presents the structure, the activity and the selectivity of NO-synthase (NOS) inhibitors that refer to various classes of chemical compounds. Linear, cyclic and heterocyclic structures containing guanidine, amidine and/or isothiurea fragments are considered. The correlation between the structure and activity of these inhibitors are analysed in comparison with their action on the inducible NOS isoform. This analysis can provide grounds for the production of new, more effective compounds.

Bibliography — 115 references.

Received 15th March 2004