

Низкомолекулярные ингибиторы каспаз

С.М.Женодарова

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
142290 Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3, факс (496) 733–0553

Обзор посвящен низкомолекулярным ингибиторам каспаз — цистеиновых протеиназ, являющихся ключевыми участниками апоптоза (программируемой гибели клеток). Рассмотрены ингибиторы, включающие остаток аспарагиновой кислоты или разнообразные гетероциклические системы (как синтетические, так и природного происхождения). Обсуждены возможные механизмы их действия. Систематизированы данные по изучению корреляционных соотношений структура–активность ингибиторов. Рассмотрено взаимодействие непептидных фрагментов ингибитора с ферментом. Приведены примеры применения некоторых ингибиторов для подавления апоптоза.

Библиография — 60 ссылок.

Оглавление

I. Введение	135
II. Производные аспарагиновой кислоты	136
III. Ингибиторы непептидной природы	144
IV. Аллостерические ингибиторы	155
V. Ингибиторы на основе природных соединений	156

I. Введение

Каспазы — ферменты, образующие семейство высокомолекулярных цистеиновых протеиназ, — принимают непосредственное участие в апоптозе (программируемой гибели клеток).^{1–3} В соответствии с современной классификацией протеолитических ферментов, каспазы относятся к клану CD цистеиновых протеиназ, для которого характерно наличие каталитической диады His-Cys. Они отличаются строгой специфичностью по отношению к субстратам, содержащим остаток аспарагиновой кислоты в положении P1. В клетке каспазы экспрессируются как неактивные проферменты (зимогены) с молекулярной массой 30–50 кДа. Прокаспазы содержат N-концевой домен переменной длины и два домена консервативных последовательностей: большую субъединицу (~20 кДа) и малую C-концевую субъединицу (~10 кДа). При активации прокаспаз происходит их протеолитическое расщепление на соответствующие домены. Последующая сборка этих доменов приводит к тетрамерам, которые содержат по две копии большой и малой субъединиц, но в которых отсутствует N-концевой домен.

С.М.Женодарова. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ИТЭБ РАН. Телефон: (496) 773–9462, e-mail: golovanov@iteb.ru
Область научных интересов: ферменты, рибозимы, олигонуклеотидный синтез, применение корреляционных соотношений структура–свойство для оценки и прогнозирования активности биологически активных и лекарственных соединений.

Дата поступления 1 апреля 2009 г.

В соответствии с физиологической ролью каспазы делятся на две группы: ферменты одной группы (каспазы 1, 4, 5 и 13) участвуют в активации цитокинов и связаны с воспалением; ферменты другой группы (каспазы 2, 3, 6–10) играют ключевую роль в апоптозе. В рамках этой группы различают инициаторные каспазы (6, 8, 9 и 10) и эффекторные (или исполнительные) каспазы (2, 3 и 7).

В связи с тем что любые нарушения апоптоза служат причиной различных заболеваний, таких как нейродегенеративные болезни, атеросклероз, последствия ишемии, рак и др.,⁴ во многих исследовательских лабораториях и фармакологических фирмах активно занимаются конструированием лекарственных препаратов, способных влиять на апоптоз (блокировать или индуцировать его). Первоначальные представления о том, что апоптоз не может быть остановлен, если процесс уже инициирован, были опровергнуты исследованиями на клеточных культурах (*in vitro*) и животных (*in vivo*), показавшими, в частности, что ингибиторы каспазы 3 снижают апоптоз и уменьшают количество клеточных повреждений.^{5–7} Таким образом, если в качестве потенциальных терапевтических мишеней выступают каспазы, то фармакологическое вмешательство может минимизировать гибель клеток и повреждение тканей.⁴

Изучение структуры каспаз, их субстратной специфичности и, прежде всего, рентгеноструктурные исследования комплексов этих ферментов с низкомолекулярными ингибиторами позволили представить структуру активного центра каспаз, проанализировать ключевые взаимодействия, обеспечивающие связывание субстрата, и сформулировать основные требования к низкомолекулярному ингибитору (см. работу³ и ссылки в ней). Используя эти исследования низкомолекулярные ингибиторы представляли собой

пептиды — аналоги субстратов (см., например, работы ^{4–10}). Такие пептидные ингибиторы интенсивно используются для оценки роли каспаз во многих заболеваниях, однако они не отвечают фармакологическим требованиям вследствие их умеренной селективности, слабой метаболической устойчивости и недостаточной клеточной проницаемости, а следовательно, не могут служить основой для создания лекарственных средств. В связи с этим возникла необходимость изменения структуры пептидного ингибитора с целью удаления из нее тех элементов, с которыми связаны эти недостатки.¹¹ Поскольку все известные низкомолекулярные ингибиторы пептидной природы включают электрофильную группировку, взаимодействующую с остатком цистеина в активном центре каспаз,⁴ а субстратная специфичность каспаз требует присутствия остатка аспарагиновой кислоты в положении P1 субстрата, первоначально при создании низкомолекулярных ингибиторов каспаз акцент был сделан на синтез электрофильных производных аспарагиновой кислоты.

II. Производные аспарагиновой кислоты

В настоящем обзоре рассмотрены производные аспарагиновой кислоты, которые представляют интерес для создания непептидных ингибиторов.[†]

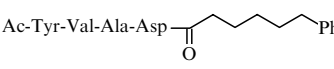
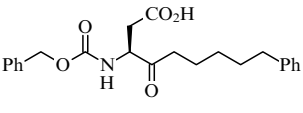
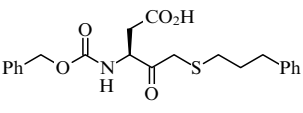
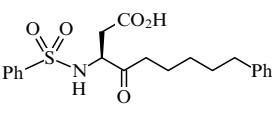
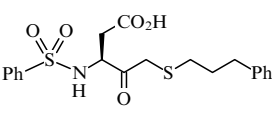
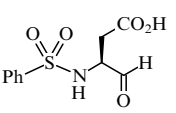
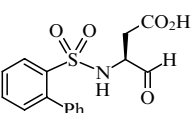
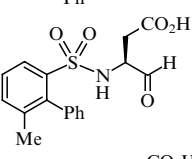
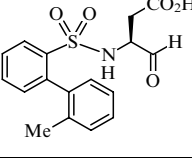
Первым идентифицированным членом семейства каспаз был фермент, конвертирующий β -интерлейкин, названный позднее каспазой 1. Естественно, что именно этот фермент стал объектом многочисленных исследований, включая работы по созданию ингибиторов.^{1–4}

Путем замены трипептидного фрагмента Ac-Tyr-Val-Ala в соединении **1** (табл. 1) — одном из наиболее известных и достаточно сильных пептидных ингибиторов каспазы 1 (см.¹²) — на бензилоксикарбонильную группу был получен¹³ непептидный ингибитор **2**. Соединение **2** проявляло значительно меньшую ингибирующую активность, чем пептидный ингибитор **1**. При замене β -метиленовой группы в С-концевом фрагменте ингибитора **2** на атом S (соединение **3**) ингибирующая активность увеличилась в 5 раз. Увеличение ингибирующей активности наблюдалось и при замене бензилоксикарбонильной группы в N-концевом фрагменте ингибитора **2** на фенилсульфонильную группу (соединение **4**), однако при комбинировании этих замен (соединение **5**) кооперативного эффекта не наблюдалось.

Результаты рентгеноструктурного анализа соединений **4** и **5** позволили предположить, что на их основе можно получить более активные непептидные ингибиторы каспазы 1, если в остатке аспарагиновой кислоты С-карбонильную функцию заменить на альдегидную (соединение **6**), а фенилсульфонильную группу у атома азота — на бифенил-2-илсульфонильную (соединение **7**). Такие замены должны обеспечить прочные ван-дер-ваальсовы контакты ингибитора с ферментом. Действительно, *N*-(бифенил-2-илсульфонил)аспарт-1-аль (**7**) оказался в 15 раз более сильным ингибитором, чем соединение **5**, и в 6 раз более сильным, чем соединение **6**. Введение метильных заместителей в бифенильный фрагмент соединения **7** не привело к увеличению ингибирующей активности (соединения **8**, **9** в табл. 1).

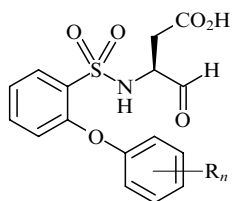
[†] Следует сразу же отметить, что пока не удалось найти среди производных аспарагиновой кислоты соединения, которые могли бы послужить основой для создания лекарственных препаратов.

Таблица 1. Ингибирование каспазы 1 производными аспарагиновой кислоты.¹³

Соединение	Структурная формула	K_i , мкмоль · л ⁻¹
1		0.011
2		119
3		25
4		24
5		24
6		9.4
7		1.6
8		1.9
9		6.8

Соединение **7** послужило основой для конструирования серии ингибиторов **10–25** (табл. 2). С этой целью бифенильная группа в сульфамидном фрагменте соединения **7** была заменена на различные феноксифенильные группы.¹⁴ Соединение **10** с феноксифенильной группой оказалось более слабым ингибитором, чем соединение **7**, однако введение алкильных заместителей в удаленное бензольное кольцо привело к увеличению ингибирующей активности.

Рентгеноструктурный анализ комплекса ингибитора **17** с каспазой 1 показал, что альдегидная группа в соединении **17** образует стандартную ковалентную связь с остатком Cys-285 активного центра фермента, а карбоксильная группа в боковой цепи аспарагиновой кислоты ориентирована в направлении электроположительного кармана, образованного остатками Arg-179, Gln-283 и Arg-341 фермента. Имеются также дополнительные полярные взаимодействия между сульфамидной группой ингибитора и ферментом. Изопропилфенильная группа располагается в гидрофобной области, образованной остатками Ile-176, Pro-177 и Ile-239. Последующие модификации, связанные с заменой изопропиловой группы в соединении **17** на *втор*-бутильную, 3-пентильную,

Таблица 2. Производные *N*-(2-(арилокси)фенилсульфонил)аспарагиновой кислоты — ингибиторы каспазы 1.¹⁴

Соединение	R	K_i , мкмоль · л ⁻¹
10	H	2.4
11	2-Me	3.0
12	3-Me	0.43
13	4-Me	1.1
14	2,3-Me ₂	1.0
15	3,4,5-Me ₃	0.45
16	3-Pr ⁱ	0.41
17	4-Pr ⁱ	0.62
18	3-Me,4-Pr ⁱ	0.11
19	4-Bu ^s	0.49
20	3-Me,4-Bu ^s	0.10
21	4-CH ₂ Et ₂	0.44
22	4-(cyclo-C ₅ H ₉)	0.88
23	4-(cyclo-C ₆ H ₁₁)	0.90
24	4-Ph	0.29
25	4-(C ₆ H ₄ CO ₂ H-4)	4.2

циклопентильную, циклогексильную или фенильную (соединения **19**, **21**–**24**) или с введением дополнительной метильной группы (соединения **18**, **20**) слабо влияли на ингибирующую активность.

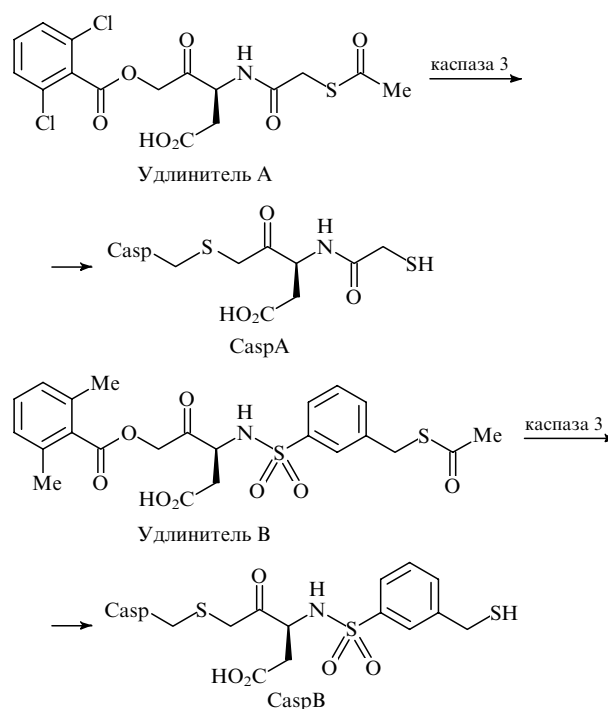
На примере метильных заместителей показано, что их положение влияет на ингибирующую активность (ср. активности соединений **11**–**13**). Включение полярной карбоксильной группы, которое, как полагали авторы,¹⁴ должно было благоприятно сказаться на взаимодействии ингибитора **25** с боковой цепью остатка His-248 или Glu-250, на самом деле привело к значительному снижению активности. Но во всех случаях ингибирующая активность *N*-(2-(арилокси)фенилсульфонилных) производных аспарагиновой кислоты лежала в микромолярном диапазоне.

Оригинальный подход к конструированию ингибиторов на основе производных аспарагиновой кислоты был предложен в работе¹⁵: для обнаружения низкомолекулярных лигандов (~250 Да), которые слабо связываются с белками-мишенями, использовали белки, содержащие нативный или введенный остаток цистеина. С использованием таких белков были протестированы ~1200 дисульфидных лигандов. Скрининг проводили в присутствии слабого восстановителя — 2-меркаптоэтанола. В этих условиях сайт-специфичные лиганды связывались с SH-группой с образованием ковалентной S—S-связи. Полученные в результате такого связывания комплексы белок–лиганд обладали достаточной стабильностью и легко идентифицировались с помощью масс-спектрометрии. Неспецифичные лиганды в этих условиях не образовывали комплексов с белком. Этот подход получил название «привязывание» («tethering»).

Следующим шагом в развитии этого подхода стало «привязывание с удлинением» («extended tethering»)¹⁶. Для этого цистеиновый остаток в активном центре фермента или вблизи от него сначала модифицируют «удлинителем» —

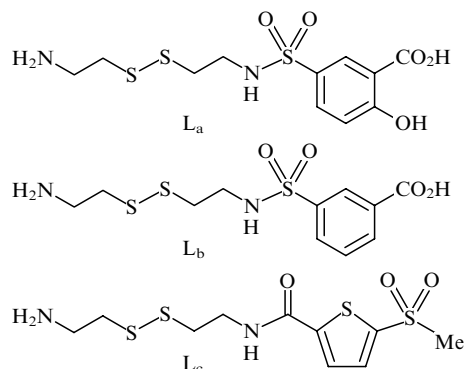
небольшой молекулой с некоторым внутренним сродством к белку, содержащей защищенную сульфгидрильную группу. Затем деблокируют SH-группу ковалентно связанного с остатком цистеина удлинителя, и модифицированный белок используют для скрининга библиотеки низкомолекулярных лигандов, содержащих дисульфидные группы. С немодифицированным белком лиганды связываются слабо, однако с белком, модифицированным удлинителем, они образуют достаточно прочные комплексы лиганд–белок за счет образования ковалентной связи S—S с SH-группой удлинителя. Дисульфидная связь стабилизирует комплекс белок–лиганд, что позволяет провести идентификацию лиганда с помощью масс-спектрометрии. Отобранные таким образом лиганды вводили в реакцию с удлинителем с целью получения ингибиторов белка-мишени. Затем проводили тестирование образовавшихся соединений на ингибирование белка. Этот подход был применен для конструирования ингибиторов каспазы 3, содержащих фрагмент аспарагиновой кислоты.

Поскольку активные центры всех каспаз содержат остаток цистеина, который необратимо реагирует с С-арилоксиметильными производными аспарагиновой кислоты,¹⁷ были сконструированы два удлинителя, специфичные для каспаз. Каждый из них содержал арилоксиметилкетонную группировку для модификации остатка цистеина в активном центре каспаз, остаток аспарагиновой кислоты для связывания с ферментом в участке S1 и заместитель на N-конце аспарагиновой кислоты, несущий защищенную SH-группу. Удлинители различались заместителем при атоме азота аспарагиновой кислоты и предназначались для улавливания различных дисульфидных лигандов.



Согласно масс-спектрометрическим и кристаллографическим данным, оба удлинителя модифицируют каспазу 3 по цистеиновому остатку, входящему в состав активного центра фермента. После образования комплекса фермент–удлинитель и удаления ацильной защиты с SH-группы модифицированные ферменты CaspA и CaspB использовали для скрининга библиотеки из ~7000 дисульфидсодержащих лигандов. Так, в частности, было установлено, что из набора

монозамещенных по атому азота бис(β-аминоэтил)дисульфидов — L_a , L_b , L_c — лиганд L_a , содержащий в качестве заместителя при атоме азота 4-гидрокси-3-карбоксибензилсульфонильную группу, взаимодействует с модифицированным ферментом CaspA, но не взаимодействует с ферментом CaspB, однако последний образует комплекс с лигандом L_c , содержащим при атоме азота 2-(5-метилсульфонил)тиеноильный заместитель. Таким образом разные удлинители располагают разные по структуре лиганды.



Превращение «привязанных» фрагментов лигандов в низкомолекулярные ингибиторы осуществляли комбинированием их с фрагментами соответствующих удлинителей (табл. 3) и заменой дисульфидных связей более подходящими для лекарственных средств метиленовыми группами, а необратимых (кетонных) головок на С-конце аспарагиновой кислоты обратимыми альдегидными. Таким путем был получен, в частности, ингибитор **26**, в состав которого входят фрагменты удлинителя А и лиганда L_a . Ингибиторы **27** и **28**, которые отличаются от ингибитора **26** отсутствием одной (ОН) или обеих функциональных групп (ОН и CO_2H) в остатке салициловой кислоты, обладают значительно меньшей активностью. Замена в соединении **26** пентаметиленового линкера, отличающегося большой подвижностью, жестким бензильным линкером при сохранении для эффективного связывания с ферментом остатков аспарагиновой и салициловой кислот (соединение **29**) привела к 10-кратному увеличению ингибирующей активности. Кристаллографический анализ структур каспазы 3, модифицированной удлинителем А и лигандом L_a , и комплекса каспазы 3 с ингибитором **29**, в котором для облегчения связывания с ферментом альдегидная головка была вновь заменена на ароилокси-метилкетонную, показал, что структуры модифицированной каспазы 3 и ее комплекса с ингибитором аналогичны, т.е. связывание ингибитора **29** с каспазой 3 вызывает лишь небольшие структурные изменения в ферменте.

В ингибиторе **30**, сконструированном из фрагментов удлинителя В и лиганда L_c , дисульфидная связь была заменена сульфонильной группой, а необратимая кетонная головка — обратимой альдегидной. Этот ингибитор имел K_i 0.33 мкмоль · л⁻¹. При замене тиофенового кольца в соединении **30** на практически изостерное бензольное (соединение **31**) ингибирующая активность снижалась в 6 раз, что свидетельствует о необходимости тщательного подбора всех фрагментов, входящих в состав ингибитора.

Стратегия «привязывание с удлинением» позволила идентифицировать фрагмент ингибитора, который связывается с каспазой 3 в S4-участке. Им оказался остаток салициловой кислоты. Молекулярное моделирование и данные кристаллографического анализа показали, что непептидные ингиби-

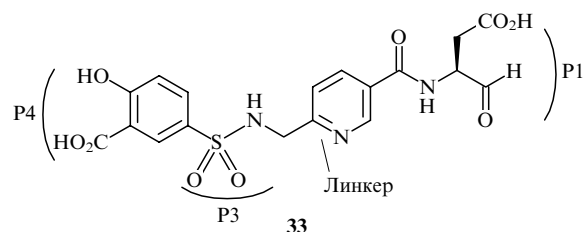
Таблица 3. Ингибиторы каспазы 3, сконструированные методом «привязывание с удлинением». ¹⁶

Соединение	Структурная формула	K_i (см. ^a)
26		2.8
27		15.3
28		> 100
29		0.2 (≥ 200) ^b
30		0.33
31		1.8
32		(~ 18) ^b

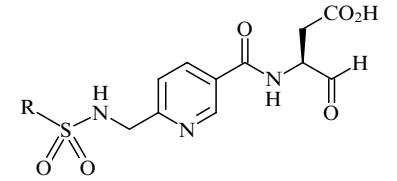
^a В мкмоль · л⁻¹. ^b В скобках приведено значение EC_{50} — концентрации ингибитора, обеспечивающей половину максимального ответа при ингибировании Fas-индуцированного апоптоза в клетках линии Jurkat.

торы типа **29** способны заменить пептидный ингибитор **1** благодаря сохранению многих ключевых взаимодействий, обусловленных Н-связыванием.

Для усиления взаимодействия непептидного ингибитора с ферментом бензильный линкер в соединении **29** был заменен на пиридинметильный, способный акцептировать дополнительную Н-связь.¹⁸ Полученный таким путем ингибитор **33** оказался в четыре раза активнее ингибитора **29** (табл. 4). Он был выбран как исходное соединение для проведения дальнейшей оптимизации.



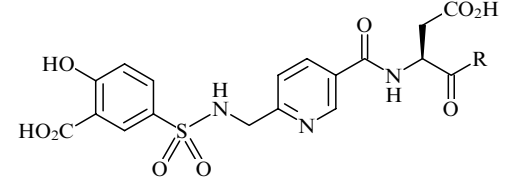
Модифицированию подвергались три фрагмента молекулы **33**: остаток салициловой кислоты (P4), альдегидная

Таблица 4. Ингибирование каспазы 3 соединениями, сконструированными из фрагментов удлинителя А и различных аренсульфонамидов, связанных пиридинметильным линкером.¹⁸


Соединение	R	K_i , мкмоль $\cdot$ л ⁻¹
33		0.05
34		1.7
35		2.3
36		0.16
37		1.7
38		1.9
39		1.3
40		1.4
41		0.47
42		0.44
43		0.40

головка (P1) и линкер. Одной из целей этих модификаций было удаление одного из двух зарядов (CO_2^-), что облегчало прохождение молекулы ингибитора через клеточную мембрану.

При удалении одной или обеих функциональных групп из остатка салициловой кислоты, т.е. при переходе от соединения 33 к соединениям 34–36 (см. табл. 4) активность ингибитора снижалась, как и при переходе от соединения 26 к соединениям 27 и 28 (см. табл. 3). Замена карбоксильной группы в соединении 36 на метилсульфонильную (37), метилсульфамидную (38, 39) или *N*-метилсульфониламидную (40) приводила к значительной потере активности, а ее замена на биоизостерные группы — ацетилсульфамидную (41), тетразольную (42) или 5-оксо-1,2,4-оксадиазольную (43) —

Таблица 5. Ингибирование каспазы 3 соединением 33 и его производными, в которых альдегидная головка заменена кетонной.¹⁸


Соединение	R	K_i , мкмоль $\cdot$ л ⁻¹
33	H	0.05
44	CH_2SMe	0.19
45		0.45
46		0.41
47		0.03

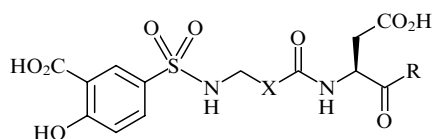
снижала активность не так значительно. Положение метилсульфамидной группы также влияло на активность (ср. активности соединений 38 и 39).

Замена альдегидной группы в ингибиторе 33 метилтиоацетильной (44, табл. 5), 5-(2,6-дихлорфенил)оксазол-2-илкарбонильной (45) или 7-метоксибензоксазол-2-илкарбонильной (46) приводила к 5- или 10-кратному снижению активности, а при замене ее на более липофильную 2-хлорбензилтиоацетильную (47) активность не менялась. Снижение ингибирующей активности у соединений 45 и 46 оказалось неожиданным, так как по некоторым патентным данным заместители R в молекулах этих соединений должны были бы участвовать в образовании дополнительных Н-связей с ферментом.

В работе¹⁸ детально исследовано влияние природы гетероциклического линкера на активность ингибиторов. В качестве исходных соединений авторы использовали ингибитор 33 с альдегидной головкой и ингибитор 47 с 2-хлорбензилтиоацетильной головкой. Оказалось, что ингибиторы 48a–56a (табл. 6), образующиеся при замене пиридинового линкера в соединении 33 на другие гетероциклы, обладают меньшей активностью, чем ингибитор 33 (за исключением соединения 48a). В случае каждого конкретного линкера ингибиторы с 2-хлорбензилтиоацетильной головкой (соединения 47, 48b–56b) были активнее ингибиторов с альдегидной головкой (соединения 33, 48a–56a). Это позволило авторам предположить, что ингибирующая активность соединений с гетероциклическими линкерами довольно чувствительна к остаткам аминокислот, занимающих S1- и S2-сайты фермента.

Активность пиримидинового производного 48b оказалась сравнимой с активностью ингибитора 47, тогда как активность пиазинового производного 49b была втрое меньше (см. табл. 6). Активность ингибиторов 50b–56b, образующихся при замене пиридинового линкера в соединении 47 на различные пятичленные гетероциклы, зависела как от природы гетероатома (ср., например, активности соедине-

Таблица 6. Ингибирование каспазы 3 производными аспарагиновой кислоты, связанными гетероциклическим линкером X с 4-гидрокси-3-карбоксибензолсульфамидным фрагментом.¹⁸



R = H (a), CH₂SCH₂C₆H₄Cl-2 (b).

– X –	Соединение	K_i , мкмоль · л ⁻¹
	33	0.05
	47	0.03
	48a	0.02
	48b	0.02
	49a	0.48
	49b	0.09
	50a	0.07
	50b	0.03
	51a	0.16
	51b	0.06
	52a	0.12
	52b	0.02
	53a	2.5
	53b	0.27
	54a	4.0
	54b	0.21
	55a	0.29
	55b	0.04
	56a	12.5
	56b	4.0

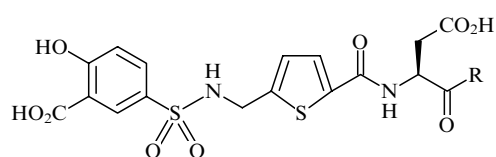
ний **52b** и **56b**), так и от характера связывания гетероцикла с фрагментами удлинителя А и лиганда L_a (ср. активности соединений **52b**, **53b** и **54b**).

Для дальнейших исследований соотношений структура–активность было выбрано соединение **52b** как достаточно эффективное и доступное. Кроме того, оно может быть модифицировано по положению 4 тиофенового кольца заместителями, способными связываться с аминокислотными остатками в S2-сайте фермента.

В частности, соединение **52b** было использовано при попытке найти эффективную головку (P1) для связывания с S1-сайтом фермента. Из приведенных в табл. 7 данных видно, что замена 2-хлорбензилтиометильной группы в соединении **52b** на арилалкильную (соединение **57**) или гетероарильные группы (соединения **58** и **59**) не привела к увеличению ингибирующей активности, и только замена ее на пиридин-3(4)-илметилтиометильные группы (соединения **60** и **61**) не вызвала снижения эффективности ингибирования.

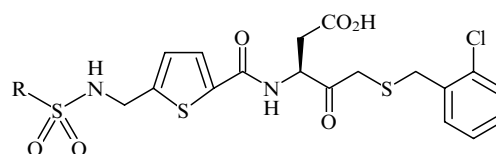
Модифицирование остатка салициловой кислоты (участок P4) в соединении **52b** (табл. 8) показало, что для проявления ингибирующей активности критично наличие

Таблица 7. Ингибирование каспазы 3 различными производными аспарагиновой кислоты, связанными тиофеновым линкером с 4-гидрокси-3-карбоксибензолсульфамидным остатком.¹⁸



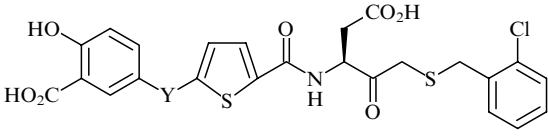
Соединение	R	K_i , мкмоль · л ⁻¹
52b		0.02
57		0.24
58		0.38
59		0.29
60		0.02
61		0.03

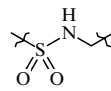
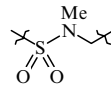
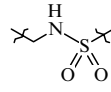
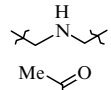
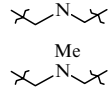
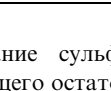
Таблица 8. Ингибирование каспазы 3 производными аспарагиновой кислоты, содержащими 2-хлорбензилтиометильный и арилсульфамидные заместители, а также тиофеновый линкер.¹⁸



Соединение	R	K_i , мкмоль · л ⁻¹
52b		0.02
62		2.1
63		2.4
64		0.40
65		0.31

карбоксильной группы (ср. активности соединений **52b** и **62–65**). Аналогичные выводы были сделаны и при изучении производных **33** (см. табл. 4).

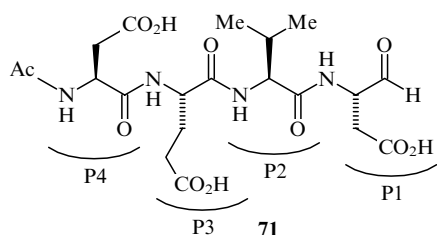
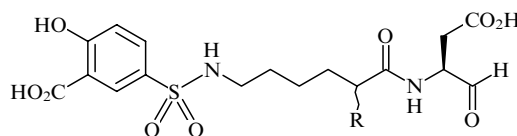
Таблица 9. Ингибирование каспазы 3 соединением **52b** и его производными, модифицированными по сульфамидной группе (P3).¹⁸


Соединение	– Y –	K_i , мкмоль · л ⁻¹
52b		0.02
66		0.14
67		1.9
68		0.80
69		0.14
70		0.09

Модифицирование сульфамидного фрагмента (участок P3), соединяющего остаток салициловой кислоты с тиофеновым линкером, которое позволило бы использовать более доступные строительные блоки при сохранении соответствующих Н-связей ингибитора с аминокислотными остатками активного центра S4-сайта фермента, также не дало желаемых результатов. Соединения **66–70** проявляли меньшую активность, чем исходное соединение **52b** (табл. 9).

Определение кристаллической структуры комплекса ингибитора **52b** с каспазой 3 подтвердило, что S1-участок фермента занят боковой цепью остатка аспарагиновой кислоты. Остаток салициловой кислоты участвует во многих специфических взаимодействиях с аминокислотными остатками активного центра S4-участка, а 2-хлорбензилтиометилкетонный фрагмент (P1') участвует во взаимодействиях с активными группами S1'-участка фермента. Таким образом, ингибитор **52b** каспазы 3 способен эффективно имитировать семь из восьми взаимодействий, наблюдаемых в комплексах каспазы 3 с пептидными ингибиторами.

Если в работе¹⁸ было детально исследовано влияние на активность непептидных ингибиторов на основе аспарагиновой кислоты разнообразных модификаций в P1-, P3- и P4-участках молекулы ингибитора, то в работе¹⁹ было изучено влияние изменений в структуре таких ингибиторов в P2-участке, находящемся по соседству с остатком аспарагиновой кислоты. Учитывая тот факт, что на ингибирующую активность стандартного тетрапептидного ингибитора Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (**71**) большое влияние оказывает

**Таблица 10.** Ингибирование каспазы 3 ингибитором **26** и его аналогами, содержащими различные заместители в α-положении к амидному карбонилу.¹⁹


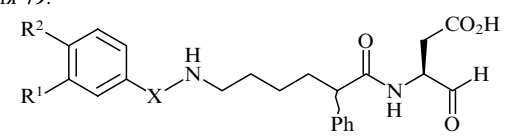
Соединение	R	K_i , мкмоль · л ⁻¹
26	H	4.0
72	Me	6.4
73	Et	1.8
74	Pr ⁿ	0.8
75	Pr ⁱ	0.7
76	Bu ⁱ	0.6
77	Bn	4.4
78	cyclo-C ₅ H ₉	1.3
79	Ph	0.1
80	2-FC ₆ H ₄	0.1
81	3-FC ₆ H ₄	0.2
82	4-FC ₆ H ₄	0.2
83	2-ClC ₆ H ₄	0.2
84	3-ClC ₆ H ₄	0.07
85	4-ClC ₆ H ₄	0.2
86	2-MeC ₆ H ₄	0.2
87	3-MeC ₆ H ₄	0.1
88	4-MeC ₆ H ₄	0.6
89		0.07
90		0.1

изопропильная группа у остатка валина (участок P2), авторы работы¹⁹ проверили, как влияет введение в α-положение к амидному карбонилу соединения **26** различных заместителей R (табл. 10).

Оказалось, что введение алкильных заместителей (за исключением Me, соединение **72**) приводило к увеличению ингибирующей активности (соединения **73–76**), при этом с увеличением размера алкильного заместителя активность по отношению к каспазе 3 увеличивалась (ср. активности соединений **72–74**). Введение заместителей Bn и cyclo-C₅H₉ (соединения **77, 78**) мало изменяло активность. Наибольшее увеличение активности происходило при введении ароматических и гетероароматических заместителей (соединения **79–90**). Наибольшую активность проявили ингибиторы **84** и **89**.

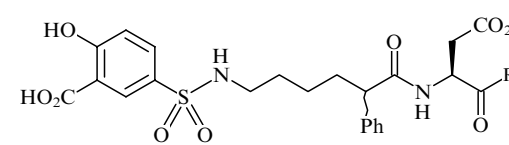
Следует отметить, что все соединения, представленные в табл. 10, были получены в виде смеси диастереомеров. На примере соединения **79** было показано, что диастереомеры различаются по активности в 5 раз, т.е. конфигурация асимметрического атома углерода во фрагменте P2 играет важную роль в ингибировании (абсолютная конфигурация диастереомеров в работе¹⁹ не определялась).

Соединение **79** было выбрано авторами работы¹⁹ в качестве исходного для дальнейших исследований соотношения структура–активность. Учитывая, что гидроксильная и карбоксильная группы салициловой кислоты участвуют в ключевых взаимодействиях с аминокислотными остатками сайта S4 каспазы 3 (см.^{17,18}), модифицированию в первую очередь был подвергнут именно этот фрагмент. Среди полученных в результате такой модификации производных **91–98**

Таблица 11. Влияние заместителей во фрагменте салициловой кислоты на ингибирующую активность аналогов соединения **79**.¹⁹


Соединение	R ¹	R ²	X	K _i , мкмоль · л ⁻¹
79	CO ₂ H	OH	SO ₂	0.1
91	H	H	SO ₂	5.8
92	H	OH	SO ₂	2.0
93	CO ₂ H	H	SO ₂	6.8
94		H	SO ₂	1.4
95		H	SO ₂	0.5
96		H	SO ₂	0.1
97		H	SO ₂	1.8

(табл. 11) только оксадиазолон **96** проявлял ингибирующую активность, сравнимую с активностью исходного ингибитора **79**. Более низкая активность *N*-метилоксадиазолон **97** указывает на важность присутствия в *N*-концевом фрагменте ингибитора кислого протона. Замена сульфамидной связи в соединении **79** на амидную (соединение **98**) привела к снижению активности. Аналогично, замена альдегидной группы на *C*-конце ингибитора на тиометилацетильную или оксазолилкарбонильную (соединения **99**–**102**, табл. 12), а также замена

Таблица 12. Влияние структуры участка P1' на ингибирующую активность аналогов соединения **79**.¹⁹


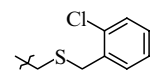
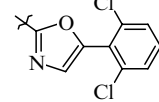
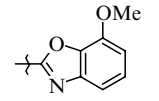
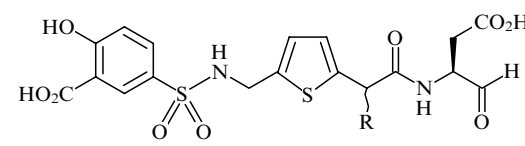
Соединение	R	K _i , мкмоль · л ⁻¹
79	H	0.1
99	CH ₂ SMe	0.6
100		0.3
101		3.3
102		1.0

Таблица 13. Влияние структуры линкера на ингибирующую активность аналогов соединений **26**, **74** и **79**.¹⁹


Соединение	R	K _i , мкмоль · л ⁻¹
103	H	4.0
104	Pr ⁿ	0.3
105	Ph	0.3

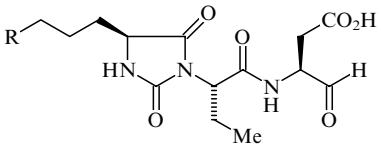
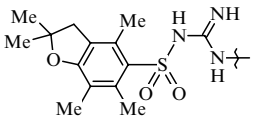
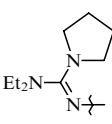
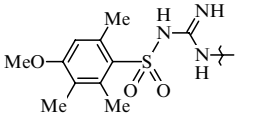
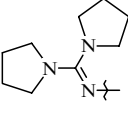
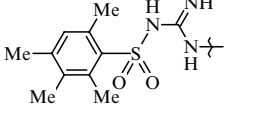
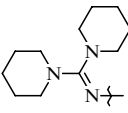
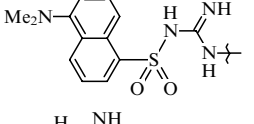
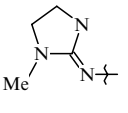
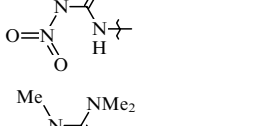
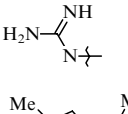
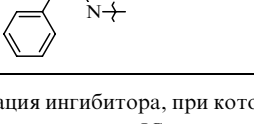
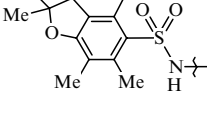
Примечание. Значения K_i для соединений **26**, **74** и **79** составляют 2.8, 0.8 и 0.1 мкмоль · л⁻¹ соответственно.

подвижного пентаметиленового линкера в соединении **79** более жестким 2,5-диметилтиофеновым (соединения **103**–**105**, табл. 13) не привели к увеличению ингибирующей активности (ср. активности соединений **26** и **103**, **74** и **104**, а также **79** и **105**).

Недавно авторами работы²⁰ была предпринята еще одна попытка сконструировать молекулы непептидных ингибиторов каспаз на основе аспарагиновой кислоты. В качестве одного из структурных элементов ингибитора они предложили использовать гидантоиновый цикл, соединенный остатком масляной кислоты с остатком аспарт-1-аля. Гидантоиновый цикл делает молекулу ингибитора более жесткой и обеспечивает взаимодействие ингибитора с S3-участком фермента. На первом этапе исследования наиболее эффективным оказался ингибитор **106**, содержащий на *N*-конце 2,2,4,6,7-пентаметил-2,3-дигидробензофуран-5-илсульфонильную группу (табл. 14). Соединение **106** было синтезировано с использованием двух разных методик. Одна из них приводила к смеси эпимеров по остатку 2-аминомасляной кислоты, а другая — исключительно к *L*-изомеру **106**. Было найдено, что *L*-изомер обладает на порядок большей ингибирующей активностью, чем смесь эпимеров, поэтому далее при синтезе соединений **107**–**117** (см. табл. 14) авторы применяли только второй метод. Установлено, что природа заместителей на *N*-конце оказывает весьма существенное влияние на ингибирующую активность, при этом электроноакцепторные заместители повышают ее. По мнению авторов работы²⁰, преимущество ингибиторов, содержащих гидантоиновый цикл, заключается в примерно одинаковых величинах IC₅₀, определенных в опытах с рекомбинантной каспазой 3 и каспазой 3 в составе клеточных экстрактов, что было установлено на примере четырех соединений — **106**, **108**, **110** и **117**. Однако следует отметить, что величины IC₅₀ у ингибиторов, приведенных в табл. 14, выше, чем у ингибиторов, рассмотренных в работах^{14, 18, 19} (см. выше).

Проверка ингибирующей активности соединений **26**, **29**, **30**, **33**, **47**, **48b**, **50b**, **52b**, **55b** и **70** по отношению к набору каспаз 1–8 показала,¹⁸ что эти соединения являются очень слабыми ингибиторами каспаз 1, 2, 4 и 5, но проявляют более высокую активность в отношении каспаз 3, 6 и 8. Соединение **26** с алкильным линкером имеет довольно умеренную активность в отношении каспазы 3, соединение **29** с бензильным линкером более активно, а ингибиторы **33**, **47**, **48b**, **50b**, **52b**, **55b** и **70** с гетероциклическими линкерами проявляют наибольшую активность относительно каспазы 3. Таким обра-

Таблица 14. Ингибирование каспазы 3 производными аспарагиновой кислоты, содержащими в составе линкера гидантоиновый цикл.²⁰

					
Соединение	R	IC_{50} , ^a мкмоль · л ⁻¹	Соединение	R	IC_{50} , ^a мкмоль · л ⁻¹
106	 смесь эпимеров L-изомер	41 3.9 (4.5) ^b	112		81
107		4.8	113		41
108		4.6 (2.5) ^b	114		79
109		3.6	115		29
110		5.9 (5.3) ^b	116		65
111		365	117		3.7 (5.2) ^b

^a IC_{50} — концентрация ингибитора, при которой активность фермента подавляется на 50%.^b В скобках приведены значения IC_{50} , определенные в опытах с клеточными экстрактами.

зом, используя некоторые тонкие модификации, можно создать ингибиторы с подходящей селективностью.

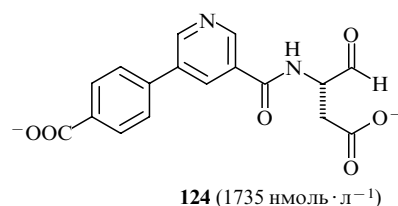
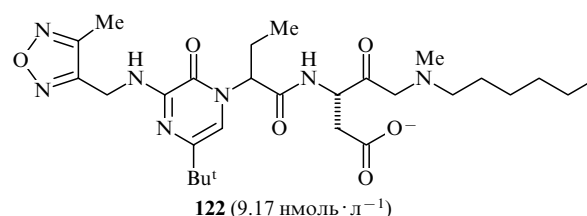
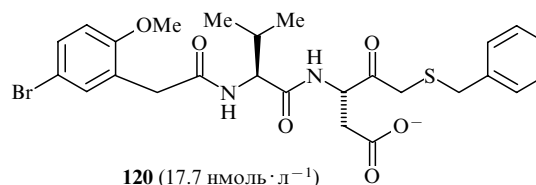
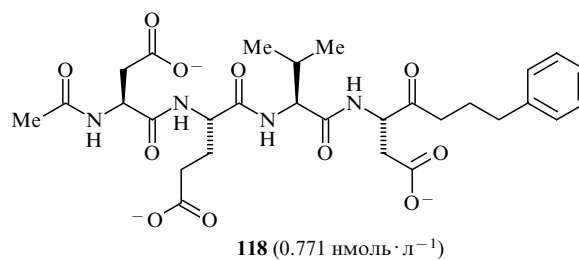
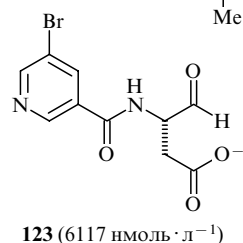
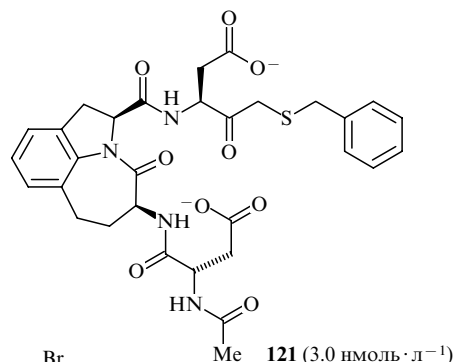
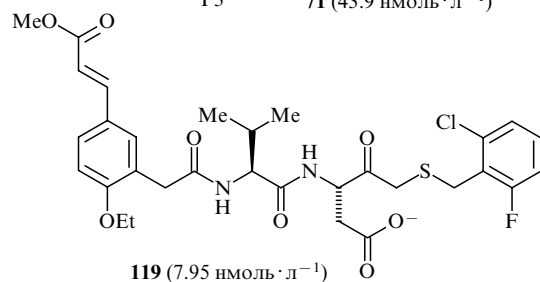
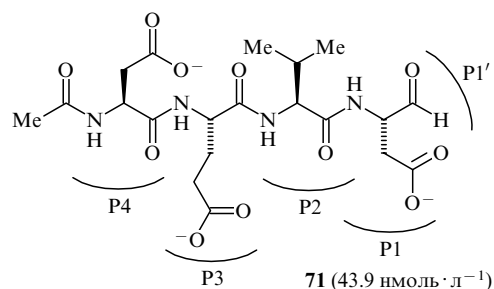
При изучении способности соединения **29** (см. табл. 3) ингибировать Fas-индуцированный апоптоз в клетках линии Jurkat было найдено, что оно имеет низкую клеточную активность ($EC_{50} \geq 200$ мкмоль · л⁻¹). Замена альдегидной головки в ингибиторе **29** на 2,3,5,6-тетрафторфеноксиметилкетонную (ингибитор **32**, см. табл. 3) привела к заметному увеличению ингибирующей активности.¹⁶

Изменяя с помощью различных модификаций структуру стандартного пептидного ингибитора Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (**71**), авторы работы¹¹ получили новый пептидный ингибитор **118** с 3-фенилпропилкарбонильной концевой группой, пептидные ингибиторы **119–121** с меньшим числом пептидных звеньев, а также непептидные ингибиторы **122–124**. Изменения в структуре ингибитора **71** проводились в трех ключевых участках связывания ингибитора — P1', P2–P3 и P4. Некоторые из полученных в результате таких замен ингибиторов обладали даже большей активностью (в скобках приведены значения IC_{50}), чем исходный пептидный ингибитор **71**. Так, замена альдегидной группы на

С-конце (участок P1') ингибитора **71** 3-фенилпропилкарбонильной группой привела к более чем 5-кратному увеличению активности за счет усиления гидрофобных взаимодействий ингибитора **118** с гидрофобным S1'-участком фермента, представляющим собой продолжение канавки связывания (S4–S1) субстрата в каспазе 3.

Исследованы кристаллические структуры комплексов каспазы 3 с этими ингибиторами.¹¹ Анализ комплексов каспазы 3 с ингибиторами **119–121**, содержащими на С-конце тиоэфирные группы, показал, что в этих комплексах в S1'-участке также преобладают гидрофобные взаимодействия, причем допускаются значительные вариации гидрофобных заместителей среднего размера.

При замене участка P2–P3 в пептидном ингибиторе **71** 5,6,7-конденсированной циклической системой (соединение **121**) или замещенным пиразином (соединение **122**) конформация исходного пептидного ингибитора не изменялась, при этом сохранялись все ключевые ван-дер-ваальсовы взаимодействия ингибитора с гидрофобной поверхностью участков S2–S3 каспазы 3.



Анализ комплексов каспазы 3 с непептидными ингибиторами **123** и **124**, в которых участки P2–P4 занимают производные никотиновой кислоты, показал, что эти ингибиторы, связываясь с ферментом, инициируют движение боковых цепей в аминокислотных остатках фермента, не наблюдавшееся в комплексах с пептидными ингибиторами. В частности, была обнаружена подвижность боковых цепей в S2-участке фермента, обеспечивающая связывание непептидного ингибитора с ферментом за счет конформационных изменений.

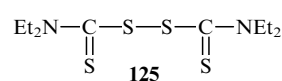
Данные рентгеноструктурного анализа комплексов каспазы 3 с пептидными ингибиторами позволили предположить, что открытая незаряженная структура участка S4 каспазы 3 позволяет заменить остаток аспарагиновой кислоты (участок P4) нейтральными структурами — остатками метилового эфира *n*-этоксикоричной кислоты (соединение **119**), *n*-бромметоксibenзола (соединение **120**) и 1,2,5-оксадиазола (соединение **122**). Такие замены оказались продуктивными, они обеспечили достаточно эффективное взаимодействие этих ингибиторов с S4-участком каспазы 3.

Таким образом, хотя попытки перейти от пептидных ингибиторов — аналогов природных субстратов — к про-

изводным аспарагиновой кислоты лишь в отдельных случаях привели к ингибиторам, равным им по активности (см. табл. 1–14), тем не менее проведенные исследования позволили прояснить механизм взаимодействия ингибитора с ферментом и показали, что достаточно эффективное взаимодействие низкомолекулярного ингибитора с каспазами возможно и в отсутствие пептидных элементов в структуре ингибитора.

III. Ингибиторы непептидной природы

В одной из первых работ по синтезу непептидных ингибиторов было показано,²¹ что сильным ингибитором каспаз 3 и 1 является тетраэтилтиурмдисульфид **125** (дисульфирам).



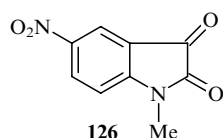
Было высказано предположение, что соединение **125** может быть ингибитором апоптоза во многих типах клеток. Однако более перспективными кандидатами для создания лекарственных препаратов считаются азотсодержащие гетеро-

циклические системы. Многие из них относятся к так называемым «привилегированным структурам»²² или «привилегированным фрагментам».^{23, 24} Сами по себе гетероциклические системы связываются с большим числом биомшеней; их специфическое взаимодействие с конкретной (определенной) биомшенью обеспечивается другими участками молекул.

1. Производные изатина

Первыми непептидными ингибиторами каспаз, представляющими интерес в качестве потенциальных соединений-лидеров для создания лекарственных препаратов, были производные изатина.²⁵ В связи с тем что каспаза 3 экспрессируется почти во всех тканях (причем на относительно высоком уровне по сравнению с другими каспазами), имеет высокую каталитическую активность среди исполнительных каспаз и играет ключевую роль в апоптозе при различных заболеваниях, она является очень важной терапевтической мишенью.²⁶ В этой связи неудивительно, что большинство работ по поиску и конструированию непептидных ингибиторов связано именно с ингибированием каспазы 3.

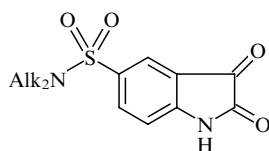
В результате скрининга большого набора соединений, ингибирующих каспазу 3, был выбран 1-метил-5-нитроизатин (**126**) с $IC_{50} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (см.²⁷).



При замене нитрогруппы в соединении **126** на атомы I, H или на CO_2H -, CO_2Me - и CN -группы было установлено, что существует корреляция между ингибирующей активностью и электроноакцепторными свойствами заместителя.²⁷

Заместитель в положении 5	NO_2	CO_2^-	CO_2Me	CN	I	H
σ_m	0.71	-0.1	0.36	0.56	0.35	0
IC_{50} , $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$	1	> 50	15	0.6	7	> 50

Из анализа величин констант заместителей (σ_m) большого количества функциональных групп был сделан вывод, что введение сульфонильного фрагмента в молекулу изатина может привести к возникновению новой или модификации существующей биологической активности. В частности, было показано, что 5-*N,N*-диалкилсульфамонильные производные изатина могут оказаться потенциальными ингибиторами каспазы 3.²⁷

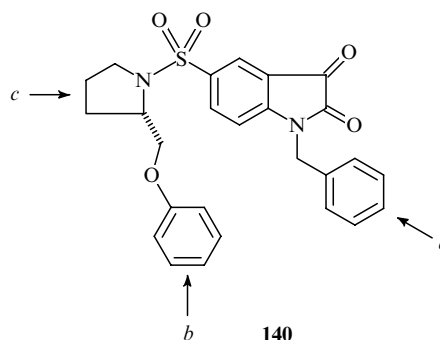


Действительно введение фармакофорного сульфамидного фрагмента, варьирование в нем заместителей и изучение ингибирующей активности разнообразных производных сульфамидов изатина позволили создать весьма эффективный ингибитор каспазы 3 — соединение **127** (табл. 15). Стереизомер производного **127** — соединение **128** — оказался существенно менее активен. О важности стереоконфигурации

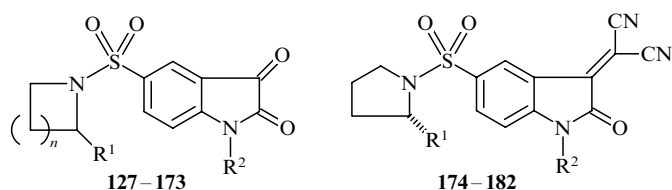
молекулы ингибитора свидетельствуют также данные по активности *S*- и *R*-изомеров анилинометильного производного изатина, из которых следует, что *S*-изомер значительно активнее *R*-изомера (соединения **129**, **130**, см. табл. 15). В дальнейшем синтезировали только *S*-изомеры. Введение *трет*-бутоксикарбонильной группы в положение 2 пирролидинового цикла (соединение **131**) приводит к большему усилению ингибирующей активности по сравнению с введением метоксикарбонильной (соединение **132**) или диметиламидной (соединение **133**) группы, что, вероятно, связано с гидрофобным взаимодействием *трет*-бутильной группы с соответствующим участком фермента. Наиболее активными в ряду соединений **127**–**136** оказались соединения **129**, **134** и **135**, содержащие фенильные группы в составе заместителя R^1 . Замена NH -группы в заместителе R^1 в соединении **129** на атом кислорода (соединение **134**) или серу (соединение **135**) практически не влияет на активность.

Введение алкильных заместителей к атому азота изатинового цикла оказывает разное действие на ингибирующую активность: введение метильной группы незначительно увеличивает активность (ср. активности соединений **134** и **137**), но введение объемных гидрофобных групп (аллильной, циклогексильной или бензильной) приводит уже к ~ 10 -кратному увеличению активности (соединения **138**–**140**, табл. 15), что свидетельствует о важности гидрофобных взаимодействий. Такой же вывод можно сделать, сравнивая ингибирующую активность соединений **141** и **142**. Введение полярных функциональных групп (при условии, что они «правильно» расположены) может привести к увеличению активности (соединение **143**).

Выбрав в качестве лидера соединение **140** и учитывая результаты, полученные в работах^{25, 27}, авторы работы²⁸ изучили влияние различных модификаций *N*-бензильного (*a*), феноксильного (*b*) и сульфамидного (*c*) фрагментов в этом соединении на соотношение структура–активность. В частности, ими исследовано влияние на активность заместителей, находящихся в *пара*-положении бензольного кольца в *N*-бензильном заместителе (*a*); замены бензольного кольца в феноксиметильном заместителе на пиридиновое (*b*) и размера гетероцикла в сульфамидном заместителе (*c*).

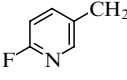
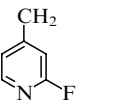
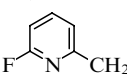


Оказалось, что введение заместителей в *пара*-положение бензольного кольца *N*-бензильной группы практически не влияет на ингибирующую активность (ср. активности соединений **140** и **144**–**148**, табл. 15), как и замена бензильного остатка фторпиридилметильным (ср. активности соединений **140** и **149**–**151**, табл. 15). При замене бензольного кольца в 2-феноксиметильном заместителе в сульфамидном фрагменте молекулы ингибитора пиридиновым приводит к увеличению ингибирующей активности (ср. активности соединений **137**, **140**, **144**–**146**, **148**, **152** и соединений **155**–**161**).

Таблица 15. Сульфамидные производные изатина — ингибиторы каспазы 3 и каспазы 7.^{27–31}

Соединение	<i>n</i>	R ¹	R ²	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹		Ссылки
				каспаза 3	каспаза 7	
127	2	(S)-MeOCH ₂	H	120.0	3400.0	27
				44.0	—	28
				85.0	1290.0	29
128	2	(R)-MeOCH ₂	H	18000.0	—	27
129	2	(S)-PhNHCH ₂	H	31.0	94.0	27
130	2	(R)-PhNHCH ₂	H	5500.0	—	27
131	2	(S)-Bu ^t O ₂ C	H	70.0	—	27
132	2	(S)-MeO ₂ C	H	170.0	—	27
133	2	(S)-Me ₂ NC(O)	H	410.0	—	27
134	2	(S)-PhOCH ₂	H	44.0	84.0	27
				17.0	294.0	29
				44.0	—	27
135	2	(S)-PhSCH ₂	H	2800.0	6000.0	27
136	2	H	H	30.0	—	27
137	2	(S)-PhOCH ₂	Me	119.2	310.0	28
				114.0	190.0	29
				4.6	—	27
138	2	(S)-PhOCH ₂	All	5.2	—	27
139	2	(S)-PhOCH ₂	cyclo-C ₆ H ₁₁ CH ₂	2.5	12.0	27
140	2	(S)-PhOCH ₂	Bn	12.2	28.0	28
				41.8	29.0	31
				3.1	—	27
141	2	(S)-PhOCH ₂	Bu ^t O ₂ CCH ₂	170.0	—	27
142	2	(S)-PhOCH ₂	HO ₂ CCH ₂	—	—	27
143	2	(S)-PhOCH ₂		4.2	—	27
144	2	(S)-PhOCH ₂	4-MeOC ₆ H ₄ CH ₂	14.5	21.8	28
				9.7	31.2	29
145	2	(S)-PhOCH ₂	4-FC ₆ H ₄ CH ₂	12.1	23	28
				50.5	19.8	31
146	2	(S)-PhOCH ₂	4-MeSC ₆ H ₄ CH ₂	12.4	41.0	28
147	2	(S)-PhOCH ₂	4-AcOC ₆ H ₄ CH ₂	12.0	34.8	28
148	2	(S)-PhOCH ₂	4-HOC ₆ H ₄ CH ₂	13.5	44.0	28
				8.2	52.7	29
149	2	(S)-PhOCH ₂		10.3	14.5	28
150	2	(S)-PhOCH ₂		21.3	58.0	28
151	2	(S)-PhOCH ₂		9.1	22.2	28
152	2	(S)-PhOCH ₂	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	9.85	34.8	30
153	2	(S)-PhOCH ₂	4-(FCH ₂ CH ₂ O)C ₆ H ₄ CH ₂	0.3	22.4	29
				9.7	23.5	30
154	2	(S)-PhOCH ₂	4-(¹⁸ FCH ₂ CH ₂ O)C ₆ H ₄ CH ₂	2.4	18.6	29
155	2	(S)-3-PyOCH ₂	Me	23.3	94.9	28
156	2	(S)-3-PyOCH ₂	Bn	5.2	14.1	28
157	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-MeOC ₆ H ₄ CH ₂	3.9	15.1	28

Таблица 15 (окончание).

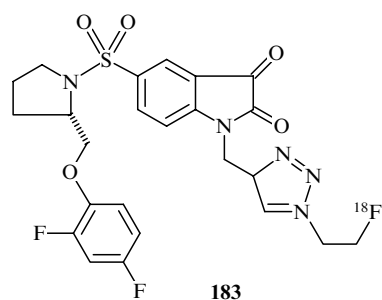
Соединение	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹		Ссылки
				каспаза 3	каспаза 7	
158	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-MeSC ₆ H ₄ CH ₂	4.4	23.3	28
159	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-FC ₆ H ₄ CH ₂	8.4	15.1	28
160	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-HOC ₆ H ₄ CH ₂	3.9	11.7	30
161	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	3.6	6.6	30
162	3	H	H	2200.0	—	27
163	4	H	H	1900.0	—	27
164	1	H	H	170.0		27
				286.7	1350.0	28
165	1	H	Me	91.7	362.5	28
166	1	H	Bn	9.7	29.5	28
167	1	H	4-MeOC ₆ H ₄ CH ₂	8.4	23.2	28
168	1	H	4-MeSC ₆ H ₄ CH ₂	11.3	26.7	28
169	1	H	4-FC ₆ H ₄ CH ₂	8.8	21.0	28
170	1	H	2-FC ₆ H ₄ CH ₂	9.4	26.0	28
171	1	H		10.9	17.0	28
172	1	H		29.2	135.0	28
173	1	(S)-PhOCH ₂		5.8	22.7	28
174	2	(S)-PhOCH ₂	H	272.0	1585.0	30
175	2	(S)-PhOCH ₂	Me	119.3	785.0	30
176	2	(S)-PhOCH ₂	Bn	27.8	51.7	30
177	2	(S)-PhOCH ₂	4-HOC ₆ H ₄ CH ₂	31.8	126.0	30
178	2	(S)-PhOCH ₂	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	20.1	92.2	30
179	2	(S)-3-PyOCH ₂	Bn	7.6	32.8	30
180	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-HOC ₆ H ₄ CH ₂	7.8	28.3	30
181	2	(S)-3-PyOCH ₂	4-MeOC ₆ H ₄ CH ₂	7.8	29.6	30
182	2	(S)-4-PyOCH ₂	4-BrC ₆ H ₄ CH ₂	5.1	26.3	30

Переход от 5-членного гетероцикла в сульфамидном заместителе к 6- и 7-членному мало влияло на активность (ср. активности соединений **136** и **162**, **163**), но уменьшение размера цикла до 4-членного давало ~10-кратное увеличение активности (соединение **164**).²⁷

Хотя авторы работы²⁷ наблюдали заметное различие в ингибирующей активности соединений **136** и **164**, не содержащих заместителей в гетероцикле сульфамидного фрагмента, однако активности феноксиметилзамещенных пирролидиновых (**137**, **140**, **144–146**, **149–151**) и азетидиновых (**165–173**) аналогов оказались близкими. Проведенный в работе²⁸ докинг-анализ показал небольшое различие в относительной ориентации феноксиметильной группы и изатинного каркаса в этих двух группах соединений, что и объясняет полученные результаты.

Авторы работы²⁹, синтезировавшие небольшую группу производных пирролидин-5-илсульфонизатина (соединения **127**, **134**, **137**, **144**, **148**, **153** и **154**), предложили использовать эти соединения для неинвазивной радиологической диагностики. Для этого они вводили в синтезированные ими ингибиторы радиоактивную метку — ¹²⁵I (соединение **154**) или ¹⁸F (соединение **153**). Для визуализации механизма апоптоза были использованы соединения **153** (см.³⁰) и 5-[2-(2,4-дифторфеноксиметил)пирролидиносульфонил]изатин

с [1-(2-фторэтил)-1,2,3-триазол-4-ил]метильным заместителем у атома азота изатина (**183**) (см.³¹), меченные изотопом ¹⁸F.



183

В работе³⁰ описан синтез серии производных сульфамидов изатина, модифицированных в пиррольном кольце изатина по β-карбонильной группе, которую превратили в группу C=C(CN)₂ (акцептор Михаэля) (соединения **174–182**, табл. 15). Оценена активность этих соединений *in vitro*. Изучение ингибирующей активности соединений **174–182** по отношению к каспазам 1, 3, 6, 7 и 8 показало, что замена C=O-группы на C=C(CN)₂ не приводит к кардинальному изменению активности (ср. активности со-

единений **136**, **137**, **140**, **148**, **152** и соединений **174–178**). Соотношения структура – активность для этих серий ингибиторов совпадали. Соединения **174–182** оказались достаточно сильными ингибиторами каспаз 3 и 7, но слабо ингибировали остальные каспазы. Преимуществом ингибиторов, содержащих акцептор Михаэля, перед немодифицированными по β -карбонильной группе изатинами является более низкая величина $\lg P$, свидетельствующая о более высокой способности этих соединений проникать в клетку *in vivo*.

Изучение профилей ингибирования каспазы 3 соединениями **126**, **127** и **157** в присутствии пептидного субстрата Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (AMC — 7-амино-4-метилкумарин) показало, что ингибирование протекает как обратимый конкурентный процесс, т.е. производные изатина связываются с каталитическим центром фермента.^{27, 28} На примере соединения **178** было показано, что ингибиторы, содержащие акцептор Михаэля, также действуют обратимо и активность каспаз может быть восстановлена, если комплекс фермент – ингибитор подвергнуть гель-фильтрации.³⁰

На основании данных рентгеноструктурного анализа каспазы 3 (см. работу³²) и других цистеиновых протеиназ (см. работу³³) было высказано предположение,²⁵ что при связывании ингибитора с каспазой 3 образуется тетраэдрический интермедиат, включающий остаток цистеина из каталитического центра фермента и карбонильную группу ингибитора, при этом способ связывания ингибитора с ферментом обеспечивает доступ заместителей, находящихся в положении 5 изатина, к S2–S4-участкам фермента.²⁵ Рентгеноструктурное исследование комплекса каспазы 3 с ингибитором **137** (см.²⁵) показало сходство структуры этого комплекса (по конформациям боковых цепей аминокислотных остатков белка) со структурой комплекса каспазы 3 с тетрапептидным ингибитором (см.³²) и подтвердило образование тетраэдрического интермедиата с участием SH-группы цистеина активного центра (Cys-285) и β -карбонила изатина. Установлено также образование ковалентной связи C–S между атомом C(3) изатина и атомом S_γ остатка Cys-285. Образование комплекса фермент – ингибитор протекает быстро и обратимо.²⁵

Остатки уникальных для каспаз 3 и 7 гидрофобных аминокислот Tyr-338, Trp-340 и Phe-381, располагающихся в S2-участке фермента, участвуют в формировании гидрофобных контактов с пирролидинилсульфонильным заместителем ингибитора. Предполагают, что именно с этими взаимодействиями связана селективность изатиновых ингибиторов, содержащих пирролидинилсульфонильный заместитель в положении 5, по отношению к каспазам 3 и 7. Соединение **126**, содержащее в положении 5 нитрогруппу, проявляет лишь умеренную селективность по отношению к этим каспазам.

Участок S1 фермента связан только с молекулой воды, а взаимодействие ингибитора с участками S3 и S4 фермента минимально. Различие в ингибирующей активности сульфамидных производных изатина, содержащих пиридинил-оксиметильный заместитель в положении 2 пирролидинового цикла (соединения **156–159**), и соответствующих производных, содержащих феноксиметильный заместитель (соединения **140**, **144–146**), позволило предположить, что существует взаимодействие между заместителем, находящимся в положении 2 пирролидинового цикла молекулы ингибитора, и боковыми группами аминокислотных остатков, располагающихся в S3-участке каспазы 3.²⁸ Так, атом азота пиридинового кольца в соединениях **156–159** может участвовать в образовании водородной связи с гидроксиль-

ной группой остатка Ser-339. Кроме того, замена бензольного кольца пиридиновым в этой части молекулы ингибитора снижает общую липофильность этих соединений, повышая их способность ингибировать, в частности, каспазу 3, связанную с интактной клеточной мембраной.

Авторы работы³⁴ использовали трехмерный подход (3D-QSAR) к исследованию количественного соотношения структура – активность для оценки ингибирующей активности производных изатина, описанных в работе²⁷. Методами сравнительного анализа молекулярного поля (CoMFA) и молекулярного сходства (CoMSIA) в молекулах исследованных ингибиторов были определены участки, пространственно и электростатически благоприятные (или неблагоприятные) для связывания с каспазой 3. Проведенные исследования подтвердили выводы, сделанные ранее в работах^{25, 27, 28}.

С использованием корреляционного соотношения структура – свойство, основанного на фрагментном описании молекулярной структуры, было получено большое число простых моделей, позволяющих с высокой точностью рассчитывать ингибирующую активность производных изатина.³⁵ Проведенный анализ позволил выявить роль отдельных фрагментов в молекуле ингибитора во взаимодействии с ферментом, в частности гидрофобных заместителей у атома азота изатина, что важно для прогнозирования активности ингибиторов каспазы 3.

Один из наиболее сильных ингибиторов каспаз 3 и 7 в классе производных изатина — ингибитор **140** — был в ~1000 раз более селективен в отношении этих ферментов, чем в отношении каспаз 1, 2, 4, 6 и 8, и в ≥ 20 раз более селективен, чем в отношении каспазы 9. Поскольку сульфамиды изатина проявляют свою избирательность к каспазам за счет связывания в S2-участке фермента, селективные ингибиторы для каспаз 3 и 7 следует разрабатывать, тщательно подбирая заместители в сульфамидном фрагменте, с тем чтобы они связывались с ферментом в участках S3 и S4. В этих участках наблюдается наибольшее расхождение в структуре различных каспаз, поэтому такие взаимодействия могли бы усилить сродство ингибитора к конкретной каспазе. Однако следует иметь в виду, что «двойная» селективность ингибитора (селективность ингибитора одновременно к двум ферментам) рассматривается и как его преимущество, поскольку известно, что эти два фермента, имея сходную субстратную специфичность и ингибиторные профили, часто активируются в сходных временных точках каскада передачи апоптотического сигнала.²⁷

Эффективность сульфамидов изатина в ингибировании апоптоза была проверена на трех клеточных моделях: Т-клетках человека линии Jurkat, хондроцитах человека и нейтрофилах костного мозга мышей.²⁷ В качестве ингибиторов использовали соединения **127**,[‡] **129**, **134**, **137** и **138**, проявляющие довольно высокую ингибирующую активность по отношению к изолированным каспазам 3 и 7 (соединение **140** не использовали из-за его ограниченной растворимости). Во всех случаях происходило блокирование апоптоза, причем наблюдалась хорошая корреляция между ингибированием этими соединениями клеточных культур и ингибированием ферментов *in vitro*.

‡ В более ранней работе³⁶ на изолированном сердце кролика и кардиомиоцитах было показано, что ингибитор **127** проявляет также кардиопротекторную и антиапоптотическую активность.

Было показано, что 1) ингибирование каспаз 3 и 7 производными изатина приводит к блокированию апоптоза, 2) использование в качестве мишени этих двух каспаз достаточно для блокирования апоптоза и 3) ингибирование этих двух ферментов можно рассматривать как новый подход для лечения болезней, характеризующихся избыточным апоптозом.

2. Анилинохиназолонны

Вслед за работами^{25,27}, посвященными применению производных изатина для ингибирования каспаз 3 и 7, появилась работа²⁶, в которой в качестве ингибиторов каспазы 3 было предложено использовать производные анилинохиназолонов **184–189** (табл. 16). Константы ингибирования этих соединений меняются от 88 до 793 нмоль · л⁻¹ в зависимости от структуры ингибитора. Наиболее эффективным ингибитором оказался 4-фторанилинохиназолон **184**. Замена атома F на Cl и введение еще одного атома Cl в бензольное кольцо анилинового заместителя привели к снижению ингибирующей активности в ~6 раз (ср. активности соединений **184** и **185**). Замена арильного фрагмента в заместителе R³ в соединении **185** на аллильный (соединение **186**) приводила к увеличению ингибирующей активности, а замена его на бензильный фрагмент (соединение **187**) — к уменьшению активности. Еще к большему увеличению активности (в 3.5 раза) приводила замена арильного фрагмента на сульфамидный (соединение **188**). Принимая во внимание эти результаты, можно предположить, что анилинохиназолон с R¹ = H, R² = F и R³ = 4-(C₅H₁₀NSO₂)C₆H₄NHC(O) будет обладать более высокой ингибирующей активностью, чем изученные соединения **184–188**.

Таблица 16. Анилинохиназолонны — ингибиторы каспаз 3 и 6.²⁶

Соединение	R ¹	R ²	R ³	K _i , нмоль · л ⁻¹	
				кас-па-за 3	кас-па-за 6
184	H	F	C(O)NHC ₆ H ₄ F-4	88	199
185	Cl	Cl	C(O)NHC ₆ H ₄ F-4	560	567
186	Cl	Cl	C(O)NHCH ₂ CH=CH ₂	247	> 10000
187	Cl	Cl	C(O)NHCH ₂ C ₆ H ₄ CF ₃ -3	793	> 10000
188	Cl	Cl	C(O)NHC ₆ H ₄ (SO ₂ N ₂ CH ₂) ₄	154	3710
189	Cl	Cl	CH=CHC ₆ H ₄ (SO ₂ N ₂ CH ₂) ₄	260	> 10000

Анилинохиназолонны проявляют селективность, ингибируя только каспазу 3 (и в меньшей степени каспазу 6) и не ингибируя каспазы 1, 7 и 8. Тот факт, что они не ингибируют каспазу 7,⁸ которая наиболее близка по строению к каспазе 3, представляет значительный интерес. Таким образом, анили-

нохиназолонны могут быть полезны для выяснения роли каспаз 3 и 7 в апоптозе.

Хотя анилинохиназолонны сильно отличаются по структуре от производных изатина, однако они имеют один общий признак — электрофильный карбонил, который может быть местом атаки тиольной группы цистеина, входящего в активный центр каспазы 3. Это обстоятельство, а также результаты молекулярного моделирования дали авторам работы²⁶ повод предположить, что анилинохиназолонны взаимодействуют с каспазой 3 по тому же механизму, что и производные изатина, хотя в этом случае S4-участок фермента, вероятно, не участвует во взаимодействии с ингибитором.

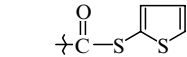
Эффективность анилинохиназолоннов в ингибировании апоптоза была показана на моделях апоптоза, индуцированного стауроспорином (линия клеток SH-SY5Y) или удалением фактора роста нервной ткани из дифференцированных клеток линии PC12.

Довольно низкая ингибирующая активность производных анилинохиназолоннов в отношении изолированного фермента не дает оснований считать эти соединения перспективными для медицинской химии, хотя они могут быть полезны при оценке роли каспазы 3 в различных клеточных моделях апоптоза.

3. Производные 1,4-бензодиоксана

Использование подхода, сочетающего методы ЯМР-скрининга и компьютерного докинга, к тестированию сотен тысяч коммерчески доступных соединений привело к открытию нового класса непептидных ингибиторов — тиазолилзамещенных производных 1,4-бензодиоксана (2,3-дигидро[1,4]диоксина).³⁷ В результате такого скрининга было

Таблица 17. Производные 3-(тиазол-2-ил)-1,4-бензодиоксана, ингибирующие каспазы 3, 7 и 8.³⁷

Соединение	R ¹	R ²	IC ₅₀ , мкмоль · л ⁻¹		
			кас-па-за 3	кас-па-за 7	кас-па-за 8
190	CO ₂ H	H	> 200	170	75
191	CO ₂ Et	H	40	46	30 (K _i)
192	CO ₂ Ph	H	40	> 200	60
193	CO ₂ C ₆ H ₄ Cl-4	H	74	> 200	> 200
194		H	55	> 200	62
195	C(O)NMe ₂	H	129	> 200	> 200
196	C(O)NHCH ₂ 	H	133	> 200	60
197	C(O)N 	H	150	> 200	> 200
198	C ₆ H ₄ CF ₃ -4	H	4.3 (K _i)	6.2 (K _i)	2.7 (K _i)
199	Me	CO ₂ Me	82	> 200	> 200
200	Me	CO ₂ H	128	> 200	> 200

§ Выше было показано, что сульфамиды изатина ингибируют каспазу 7 наряду с каспазой 3, хотя и менее эффективно (см. раздел III.1).

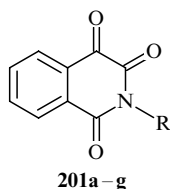
выявлено производное 3-(тиазол-2-ил)-1,4-бензодиоксана (**190**), которое в микромолярной концентрации ингибировало расщепление стандартного пептидного субстрата каспазой 8 и проявляло ингибирующую активность по отношению к каспазам 3 и 7 (табл. 17). Анализ по методу Лайнуивера–Берка показал, что ингибирование является обратимым и носит конкурентный характер.

Бензодиоксанный остов считается привлекательным для конструирования ингибиторов каспаз благодаря своей доступности, конформационной подвижности и, как оказалось, хорошему соответствию участку связывания остатка аспарагиновой кислоты субстрата (S1), консервативному для большинства каспаз. Богатая электронами π -система бензодиоксанового кольца способна точно встраиваться в каталитическую полость и взаимодействовать с положительно заряженными аргининовыми остатками, которые располагаются в этом участке. Конформационная подвижность диоксанового кольца, играющая, по мнению авторов работы³⁷, решающую роль в точной локализации бензодиоксановой части ингибитора, может способствовать взаимодействию заместителей в положении 2 со смежными участками активного центра фермента, которые не столь консервативны, как участок S1, и могут быть использованы для улучшения сродства и селективности ингибиторов.

Авторы работы³⁷ предположили, что, подбирая заместители в тиазольном цикле, можно улучшить сродство и селективность исследуемых ингибиторов по отношению к каспазам 3, 7 и 8. Они выбрали соединения **190–200** и исследовали их ингибирующую активность (см. табл. 17). Практически все соединения этой группы в той или иной степени ингибировали каспазу 3, половина из них была активна также и по отношению к каспазе 8, но только три из них ингибировали каспазу 7. Наиболее активным среди них оказалось производное **198**, однако и для него значение K_i лежало в микромолярном диапазоне. Попытка повысить ингибирующую активность заменой бензодиоксанового кольца кумариновым не имела успеха. По-видимому, результаты, приведенные в работе³⁷, пока следует рассматривать только как предварительные. Для создания лекарственных препаратов на основе производных 1,4-бензодиоксана необходима дальнейшая работа по поиску структур с большей активностью.

4. Производные тетрагидроизохинолин-1,3,4-триона

В результате высокопроизводительного скрининга библиотеки из 8000 разнообразных низкомолекулярных органических соединений с использованием каспазы 3 был выбран тетрагидроизохинолин-1,3,4-трион (**201a**),



R = H (**a**), Me (**b**), CH₂CH=CH₂ (**c**), Bn (**d**), CH₂CH₂Ph (**e**), CH₂C₆H₄OMe-4 (**f**), CH₂C₆H₄F-4 (**g**).

который ингибировал каспазу 3 с $IC_{50} = 149$ нмоль·л^{–1} (см.³⁸). Для улучшения ингибирующих свойств соединения **201** было осуществлено его модифицирование по различным участкам молекулы. Замена атома водорода в имидной

группе алкильной, аллильной, бензильной или замещенными бензильными (*n*-метоксибензильной и *n*-фторбензильной) группами привела к снижению ингибирующей активности по сравнению с исходным соединением **201a**, поэтому был сделан вывод о нецелесообразности модифицирования соединения **201** по атому азота.

Соединение 201	a	b	c	d	e	f	g
IC_{50} , нмоль·л ^{–1}	149	255	261	331	544	4630	630

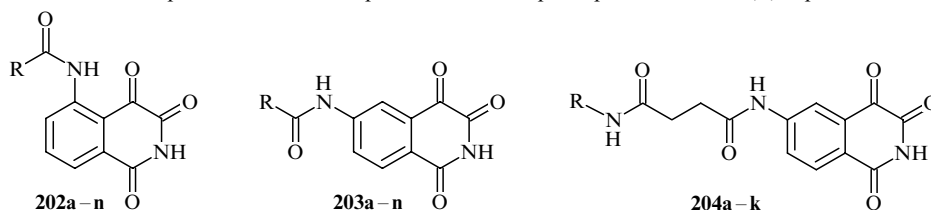
Все последующие модификации проводились в бензольном кольце. Первые опыты по модифицированию бензольного кольца — введение в положение 5, 6 или 7 остатков бензамида или его *o*-метокси-, *n*-нитро- и *o*-хлор-производных — показали, что каспаза 3 чувствительна к положению заместителя в бензольном кольце, причем ингибирующая активность была выше у соединений, имеющих заместитель в положении 5 или 6. Поэтому в дальнейшем влияние положения и структуры заместителей на ингибирующую активность изучали на сериях 5- и 6-замещенных производных тетрагидроизохинолин-1,3,4-триона — соединениях **202–204**. В качестве заместителей были исследованы алифатические и ароматические ациламиногруппы (табл. 18).

Анализ данных, представленных в табл. 18, не позволяет сделать однозначного выбора между положениями 5 и 6 (ср. активности соединений **202c** и **203c**, **202g** и **203d**, **202h** и **203e**, **202i** и **203g**, **202j** и **203h**, **202n** и **203i**). Самым активным из серий соединений **202** и **203** оказалось соединение **202f**. Замена фенильной группы в соединениях **202c** и **203c** на алкильные (соединения **202a** и **203a**) или циклоалкильные (соединения **202b**, **203b**) не увеличивала ингибирующую активность, но замена концевой атома Н в алкильной группе электроноакцепторным заместителем существенно повышала ее, причем этот эффект зависел от расстояния электроноакцепторного заместителя до бензольного кольца тетрагидроизохинолинового цикла (ср. активности соединений **203j–l**, **203m** и **203n**, **202j** и **202l**, **202k** и **202m**).

Соединение **203m** в связи с достаточно высокой активностью и присутствием в нем свободной карбоксильной группы было выбрано для дальнейшей модификации с целью повышения ингибирующей активности и гидрофобности соединений, что облегчало бы их прохождение через клеточные мембраны. Для модификации использовали реакцию амидирования карбоксила коммерчески доступными аминами. Была получена серия производных **204a–k**, среди которых наиболее активным оказался амид **204c**. Достаточно высокую активность проявили также производные алифатических аминов (соединения **204a,b**), бензиламина (**204d**), 3-этокси- (**204i**) и 3-*n*-пропоксианилина (**204j**), тогда как соединения **204f–h** с остатками *o*-, *m*- и *n*-метоксианилина, имели меньшую активность. Удивительно, что соединения **203h** и **204i**, содержащие в положении 6 заместители, которые существенно различаются как размером, так и структурой, проявили одинаковую активность, в то время как соединения **204a** и **204b** с заместителями, отличающимися на два атома Н, различались по активности.

К сожалению, в работе³⁸ не исследовался и не обсуждался возможный механизм действия предлагаемых ингибиторов, только вскользь отмечалось, что по некоторым предварительным данным речь идет о неконкурентном ингибировании.

Изучение активности соединений **201a**, **202f**, **203k,m**, **204c,f** и аналога соединения **203d**, содержащего в

Таблица 18. Ингибирование каспазы 3 производными тетрагидроизохинолин-1,3,4-триона.³⁸

Соединение 202	R	IC_{50} , нмоль · л ⁻¹	Соединение 203	R	IC_{50} , нмоль · л ⁻¹	Соединение 204	R	IC_{50} , нмоль · л ⁻¹
a	Me	191	a	Et	164	a	Pr ⁿ	59
b	cyclo-Pr	193	b	cyclo-C ₆ H ₁₁	272	b	All	44
c	Ph	110	c	Ph	176	c	См. ^a	25
d	Bn	139	d	C ₆ H ₄ OMe-2	54	d	Bn	70
e	OBn	763	e	C ₆ H ₄ Cl-2	78	e	Ph	201
f	CH(OAc)Ph	40	f	C ₆ H ₄ NO ₂ -2	62	f	C ₆ H ₄ OMe-2	113
g	C ₆ H ₄ OMe-2	96	g	C ₆ H ₄ NO ₂ -3	118	g	C ₆ H ₄ OMe-3	148
h	C ₆ H ₄ Cl-2	150	h	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	54	h	C ₆ H ₄ OMe-4	158
i	C ₆ H ₄ NO ₂ -3	53	i	C ₆ H ₃ CO ₂ Me-5-NO ₂ -3	66	i	C ₆ H ₄ OEt-3	55
j	C ₆ H ₄ NO ₂ -4	124	j	(CH ₂) ₃ Cl	140	j	C ₆ H ₄ OPr ⁿ -3	71
k	C ₆ H ₄ F-4	99	k	(CH ₂) ₂ Cl	83	k	C ₆ H ₄ F-4	145
l	CH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂ -4	356	l	CH ₂ Cl	92			
m	CH ₂ C ₆ H ₄ F-4	199	m	(CH ₂) ₃ CO ₂ H	79			
n	C ₆ H ₃ CO ₂ Me-5-NO ₂ -3	104	n	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	68			

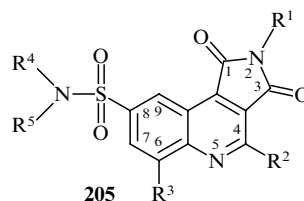
^a Здесь фрагмент RNHC(O) представляет собой пиперидинокарбонил.

положении 7 заместитель 2-MeOC₆H₄C(O)NH (IC_{50} = 1380 нмоль · л⁻¹), в отношении пяти цистеиновых или сериновых протеаз показало, что ингибиторы на основе тетрагидроизохинолин-1,3,4-триона, не являясь обычными протеазными ингибиторами, селективно воздействуют на каспазы. По отношению к различным членам семейства каспаз они проявляют некоторую избирательность, с большим предпочтением ингибируя каспазы 3 и 7 по сравнению с каспазами 2, 6 и 8. Однако их все же следует рассматривать как ингибиторы каспаз широкого спектра.

Соединения **201a** и **202f** ингибировали апоптоз, индуцированный камптотецином в Т-клетках человека (линия Jurkat), а соединения **202f**, **202i**, **204c,f,i** могли бы оказаться эффективными при лечении ишемии мозга (исследовалась модель инсульта при временной закупорке средней мозговой артерии у животных), тогда как соединение **201a** в тех же условиях было неэффективным. Производное **204f**, выбранное для более детальных исследований благодаря легкости его получения и хорошей растворимости, вызывало зависимость от дозы уменьшение объема инфаркта.

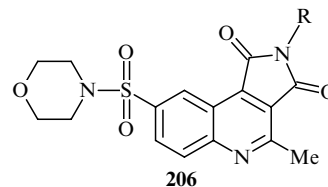
5. 2,3-Дигидро-1H-пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионы

Используя синтезированные комбинаторные библиотеки азотсодержащих гетероциклических соединений, методы компьютерного анализа и результаты испытаний *in vitro* на активность по отношению к каспазе 3, Кравченко и сотр.³⁹ выбрали для разработки ингибиторов каспаз 2,3-дигидро-1H-пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионы **205** (далее пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионы).³⁹



С целью изучения соотношения структура–свойство и выявления наиболее эффективных ингибиторов каспазы 3 структурной модификации последовательно подвергались заместители в положениях 2, 4, 6 и 8.

Влияние заместителей в положении 2 на ингибирующую активность изучали, взяв в качестве «родоначальника» серии 4-метил-8-морфолиносульфонилпирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дион (**206**).⁴⁰



Морфолиносульфонильный заместитель в положении 8 был выбран с учетом известной фармакофорности морфолина, «привилегированности» сульфонильного фрагмента и простоты получения промежуточных соединений. Всего было синтезировано 63 соединения, из которых 16 производных (**206a–n**, табл. 19) содержали в положении 2 алкильные заместители; 9 производных (**206aa–206ai**, табл. 20) — остатки алкиловых эфиров карбоновых кислот; 13 производных — арильные заместители (**206ba–206bm**, табл. 21); 21 производное — гетарильные заместители (**206ca–206cu**, табл. 22) и

Таблица 19. Ингибирование каспазы 3 производными 4-метил-8-морфолиносультонпирроло[3,4-с]хинолин-1,3-диона, содержащими в положении 2 алкильные заместители.⁴⁰

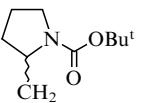
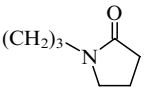
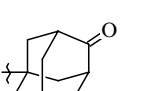
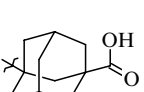
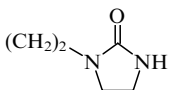
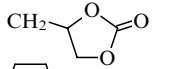
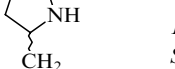
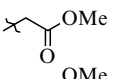
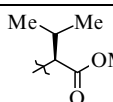
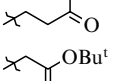
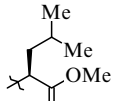
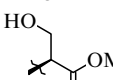
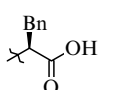
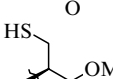
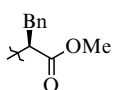
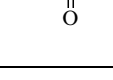
Соединение	R	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹	Соединение	R	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹
206a	H	75	206k		R 56 S 55
206b	Me	44	206l		24
206c	(CH ₂) ₂ OH	54	206m		152
206d	(CH ₂) ₃ OH	53	206n		196
206e	(CH ₂) ₂ OAc	23			
206f	(CH ₂) ₂ OC(O)-N	41			
206g	(CH ₂) ₂ NMe ₂	5500			
206h		20			
206i		32			
206j		R 97 S 58			

Таблица 20. Ингибирование каспазы 3 производными **206**, содержащими в положении 2 остатки эфиров карбоновых кислот.⁴⁰

Соединение	R	IC ₅₀ (см. ^a)	Соединение	R	IC ₅₀ (см. ^a)
206aa		16	206af		11
206ab		37	206ag		11
206ac		30	206ah		661
206ad		21	206ai		73
206ae		85			

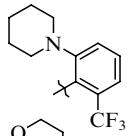
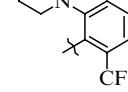
^a В нмоль · л⁻¹.

4 соединения — окси- и аминзаместители (**206da**–**206dd**, табл. 23).

Природа заместителя в положении 2 4-метил-8-морфолиносультонпирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов **206** сильно влияет на их ингибирующую активность. Среди алкилзамещенных производных (см. табл. 19) ингибирующая активность меняется от 20 нмоль · л⁻¹ у 2-(2-оксоимидазолидин-1-ил)этильного производного **206h** до 5500 нмоль · л⁻¹ у 2-диметиламиноэтильного производного **206g**. Соединения **206** с пространственно затрудненными алкильными (адамантильными) заместителями менее активны, чем производные с линейными заместителями. Хиральность заместителя в положении 2 не оказывает заметного влияния на активность (в отличие от производных изатина, см. раздел III.1).

Наиболее активными среди соединений **206aa**–**206ai**, полученных с использованием эфиров α-аминокислот, оказа-

Таблица 21. 2-Арилзамещенные производные 4-метил-8-морфолиносультонпирроло[3,4-с]хинолин-1,3-диона, ингибирующие каспазу 3.

Соединение	R	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹
206ba	Ph	19
206bb	C ₆ H ₄ Me-2	15
206bc	C ₆ H ₄ CF ₃ -2	24
206bd	C ₆ H ₄ OH-2	2300
206be	C ₆ H ₄ OH-3	24
206bf	C ₆ H ₄ OH-4	8
206bg	C ₆ H ₄ CH ₂ OH-4	22
206bh	C ₆ H ₄ CO ₂ Me-4	20
206bi	C ₆ H ₃ F ₂ -2,6	10
206bj	C ₆ H ₃ Me-2-F-5	9
206bk	C ₆ H ₃ (cyclo-Pr) ₂ -2,6	22
206bl		406
206bm		20

лись производные на основе метиловых эфиров валина (соединение **206af**) и лейцина (соединение **206ag**, табл. 20). Деблокирование карбоксильной группы снижало активность ингибиторов почти в 10 раз (ср. активности соединений **206ah** и **206aj**).

Весьма сильными ингибиторами каспазы 3 оказались соединения **206** с различными арильными заместителями в положении 2: величины IC₅₀ для этих соединений лежат в диапазоне от 9 до 24 нмоль · л⁻¹ (см. табл. 21). Исключением являются соединения **206bd** и **206bl** с IC₅₀ = 2300 и 406 нмоль · л⁻¹ соответственно. Наиболее активными в этой группе соединений были 4-гидроксибензил- (**206bf**), 5-фтор-2-метилфенил- (**206bj**) и 2,6-дифторпроизводные (**206bi**), которые ингибировали каспазу 3 с IC₅₀, равной 8, 9 и

Таблица 22. 2-Гетарилзамещенные производные 4-метил-8-морфолиносульфонилпирроло[3,4-*c*]хинолин-1,3-диона (**206**), ингибирующие каспазу 3.⁴⁰

Соединение	R	IC ₅₀ (см. ^a)	Соединение	R	IC ₅₀ (см. ^a)
206ca		35	206cl		5
206cb		17	206cm		5
206cc		13	206cn		14
206cd		14	206co		11
206ce		8	206cp		12
206cf		9	206cq		18
206cg		3	206cr		14
206ch		4	206cs		13
206ci		4	206ct		3
206cj		6	206cu		82
206ck		6			

^a В нмоль · л⁻¹.**Таблица 23.** 2-Окси- и 2-амино-4-метил-8-морфолиносульфонилпирроло[3,4-*c*]хинолин-1,3-дионы, ингибирующие каспазу 3.⁴⁰

Соединение	R	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹
206da	OBu ^t	15
206db	OPh	404
206dc		18
206dd		2980

10 нмоль · л⁻¹ соответственно. Интересно, что производное **206bm**, содержащее в положении 2 *N*-арильного заместителя остаток морфолина, оказалось в 20 раз более сильным ингибитором, чем его структурный аналог **206bl** с пиперидиновым остатком.

Самыми сильными ингибиторами каспазы 3 среди 2-замещенных пирроло[3,4-*c*]хинолин-1,3-дионов оказались 2-гетарилпроизводные **206ca**–**206cu**, для которых величины IC₅₀ колеблются в диапазоне от 3 до 18 нмоль · л⁻¹ (см. табл. 22). Наиболее активными в этой серии соединений были производные, содержащие у атома азота 4- (соединения **206cg**–**206ci**) и 5-пиразолильные (соединения **206cj**–**206cm**) заместители, а также 4-пиридильное производное **206ct**: для них значения IC₅₀ ≤ 6 нмоль · л⁻¹. Авторы отмечают, что полярные функциональные группы в гетероциклических заместителях могут обеспечивать дополнительные нековалентные взаимодействия с ферментом.

Активность четырех соединений, содержащих OR и NR₂ заместители в положении 2 (см. табл. 23), различается более, чем на 2 порядка, что, по мнению авторов, связано не с природой гетероатома (O или N), связывающего этот заместитель с имидным азотом пиррольного кольца, а с природой заместителя R.

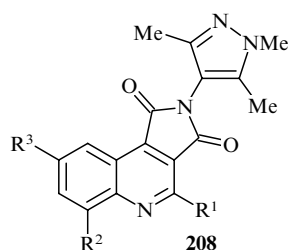
Влияние заместителей в положении 4 изучали на примере 4-замещенных 2-(2-ацетоксиэтил)-8-морфолиносульфонилпирроло[3,4-*c*]хинолин-1,3-дионов **207** (табл. 24).⁴¹ «Родо-

Таблица 24. 4-Замещенные производные 2-(2-ацетоксиэтил)-8-морфолиносульфонилпирроло[3,4-*c*]хинолин-1,3-диона (**207**) — ингибиторы каспазы 3.⁴¹

Соединение	R	IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹
206e	Me	23
207a	Pr ⁱ	40
207b	Ph	27
207c		36
207d	CH=CHC ₆ H ₄ CF ₃ -4	33
207e	OH	10900
207f	Cl	294
207g		255
207h	SCH ₂ CO ₂ Me	1290
207i	SOCH ₂ CO ₂ Me	352
207j	SO ₂ CH ₂ CO ₂ Me	362
207k		15350
207l	NHCH(CO ₂ Et)CH ₂ CO ₂ Et	5190
207m	NHC ₆ H ₃ F-4-Cl-3	27900
207n	C ₆ H ₄ (C(O)NMe ₂)-4	58
207o	C ₆ H ₃ F-4-Cl-3	33
207p		33

начальником» этой серии соединений, по существу, является соединение **206e** (см. табл. 19). Были синтезированы еще 16 соединений (**207a–p**), значения IC_{50} для которых представлены в табл. 24. Все они оказались менее активными, чем соединение **206e**. Наибольшей активностью обладают соединения с алкильными, арильными и гетарильными заместителями, для которых величина IC_{50} изменяется в диапазоне 27–58 нмоль $\cdot$ л $^{-1}$. Существенно менее активны 4-гидроксидные (соединения **207h–j**). Наименее активны соединения с алкил- и ариламиносодержащими заместителями в положении 4.

Принимая во внимание, что наиболее сильными ингибиторами каспазы 3 оказались соединения, имеющие в положении 2 гетарильные заместители (в частности, 4-пиразолильные), Кравченко и сотр.³⁹ синтезировали ряд 2-(1,3,5-триметилпиразол-4-ил)пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов (**208a–m**) с различными заместителями в положениях 4, 6, 8 (табл. 25).³⁹



Родоначалником этой серии соединений явилось производное **206ch** (см. табл. 22), проявившее высокую ингибирующую активность по отношению к каспазе 3. Введение атома хлора в положение 6 несколько уменьшает активность (ср. активности соединений **206ch** и **208a**), которая еще больше снижается, если морфолиносulfonyльную группу заменить сульфоамидной (соединение **208b**), хотя при ее замене на свободную сульфогруппу активность практически не

Таблица 25. 2-(1,3,5-Триметилпиразол-4-ил)пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионы (**208**) — ингибиторы каспазы 3.³⁹

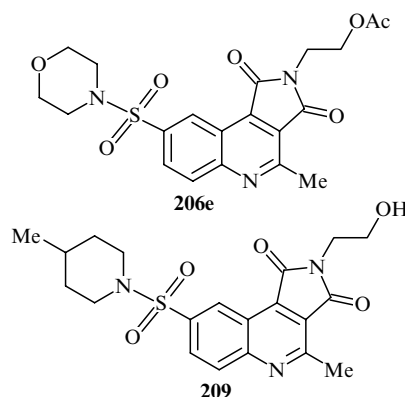
Соединение	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (см. ⁴¹)
206ch	Me	H	SO ₂ —N ₂ O	4
208a	Me	Cl	SO ₂ —N ₂ O	7
208b	Me	Cl	SO ₂ NH ₂	33
208c	Me	Cl	SO ₃ H	5
208d	Me	H	SO ₃ H	90
208e	Me	H	SO ₃ [−] Na ⁺	137
208f	Me	H	SO ₃ [−] NH ⁺ —C ₆ H ₅	100
208g	Me	CF ₃	H	1400
208h	Me	CO ₂ H	H	14
208i	Me	CH ₂ CH ₂ Pr ⁱ —C(O)NHCCO ₂ Me-(R)	H	500
208j	Me	H	Br	359
208k	Me	H	CN	16
208l	Ph	H	SO ₂ CH ₂ CO ₂ Me	65
208m	Ph	H	SO ₂ CH ₂ C(O)—N ₂ O	5

^a В нмоль $\cdot$ л $^{-1}$.

меняется (ср. активности соединений **208c** и **208a**). Однако, если в соединении **208c** заменить атом Cl на H (соединение **208d**), то активность существенно уменьшится. Активность еще больше снижается при переходе к заряженным производным **208e,f**. Достаточно перспективным является введение в положение 6 производных **208** карбоксильной группы (соединение **208h**), а в положение 8 — цианогруппы (соединение **208k**).

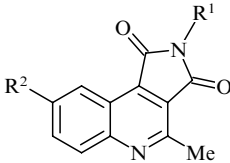
Установлено, что существует прямая зависимость между электронным эффектом заместителя в положении 8 хинолинового остова пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов и их ингибирующей активностью.^{39,42} Полученные данные свидетельствуют также о сильном влиянии электрофильности карбонильных групп пиррольного кольца на ингибирующую активность. Предполагается, что ингибирование каспазы 3 происходит по механизму, включающему присоединение цистеинового остатка фермента, не входящего в активный центр каспазы 3,⁴³ к одному из двух карбониллов — потенциальных сайтов для нуклеофильной атаки SH-группой цистеина.⁴² По-видимому, происходит аллостерическая инактивация фермента.

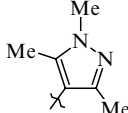
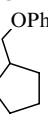
На примере соединений **206e** (см.⁴¹) и **209** (см.⁴³) было показано, что пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионы являются обратимыми неконкурентными ингибиторами каспазы 3. При изучении фармакокинетики этих потенциальных антиапоптотических лекарственных средств было установлено, что диссоциация комплексов каспазы 3 с этими ингибиторами происходит медленно ($\tau \approx 50$ мин). Это сохраняет каспазу в ингибированном состоянии, даже если лекарство быстро выводится из крови.



Изучение ингибирующей активности соединения **209** с использованием каспаз 1–9 показало, что оно не является селективным ингибитором каспазы 3, хотя и проявляет наибольшую активность в отношении этого фермента.⁴³ Антиапоптотическую активность соединения **209** изучали на нескольких клеточных линиях человека (Jurkat, NIH-3T3, SH-SY5Y) и на рыбах *Danio rerio*. В клеточных линиях апоптоз индуцировали стауроспорином, а у рыб — ретиноевой кислотой. Соединение **209** эффективно предотвращало индуцированные стауроспорином изменения клеточной морфологии и гибель клеток в клеточных линиях и эффективно блокировало апоптоз нервных клеток рыб, индуцированный ретиноевой кислотой.

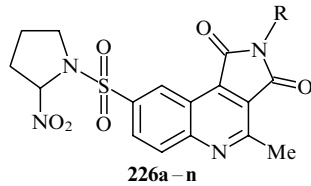
Для рационального конструирования ингибиторов каспазы 3 с остовом пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов было проведено QSAR-исследование⁴⁴ некоторых производных пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов — соединений **206**, **208**, **210–225** (табл. 26).⁴⁵ Основываясь на анализе корреляции структура–активность, авторы работы⁴⁴ сконструировали новую серию соединений этого класса — соединения **226a–n**

Таблица 26. QSAR-Анализ ингибиторной активности некоторых пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов.⁴⁴


R ¹	R ²	Соединение	IC ₅₀ (см. ^a)	
			эксперимент	расчет
H	F	210	62.80	9.12
	Br	211	37.10	12.40
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206a	0.21	0.14
Me	H	212	6.36	9.82
	Br	213	1.58	4.34
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206b	0.044	0.047
CH ₂ CO ₂ Me	H	214	4.65	5.58
	F	215	2.50	1.84
	Br	216	0.46	2.48
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206aa	0.016	0.03
CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	H	217	23.3	11.0
	F	218	5.5	4.0
	Br	219	1.08	5.5
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206ab	0.037	0.07
	H	220	8.11	4.80
	Br	221	2.54	2.14
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206bb	0.015	0.02
	Br	208j	0.36	0.28
	SO ₂ NH ₂	208b	0.033	0.025
	SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ OH	222	0.020	0.009
	SO ₂ NHCH ₂ CH ₂ OMe	223	0.021	0.009
	SO ₂ NHCHBnCO ₂ Me	224	0.023	0.046
	SO ₂ -N ₂ O ₂	225	0.055	0.019
	SO ₂ -N ₂ O ₂	206ch	0.004	0.03
	CN	208e	0.016	0.073

^a В мкмоль · л⁻¹.

(табл. 27), которые в соответствии с расчетами должны быть значительно более активными. Предсказываемые величины IC₅₀ для этих соединений меняются в диапазоне 0.036–1.13 нмоль · л⁻¹, тогда как значения IC₅₀ соединений-лидеров **206cg** и **206ct** (см. табл. 22), выявленных среди 117 синтезированных производных пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионов, составляют 3 нмоль · л⁻¹. К сожалению, пока в литературе отсутствуют сообщения о синтезе какого-либо из прогнозируемых соединений **226**.

Таблица 27. Ингибиторы каспазы 3, сконструированные на основе QSAR-анализа.⁴⁴


Соединение	R	Предсказываемая величина IC ₅₀ , нмоль · л ⁻¹
226a	NH ₂	0.90
226b	NHPh	0.074
226c	NHC ₆ H ₄ OH-2	0.171
226d	NHC ₆ H ₄ OH-4	0.074
226e	NHC ₆ H ₃ (OH) ₂ -2,6	0.091
226f	NHC ₆ H ₂ (OH) ₃ -2,4,6	0.095
226g	NHC ₆ H ₂ (NH ₂) ₂ -3,5-OH-4	0.123
226h	C ₆ H ₂ (OH) ₃ -2,4,6	0.121
226i	C ₆ H ₃ (OH) ₂ -2,6	0.12
226j	C(O)C(O)Cl	0.036
226k	C(O)CH ₂ Cl	0.338
226l	C ₆ H ₄ CO ₂ H-4	1.04
226m	Pr ⁱ	1.07
226n		1.13

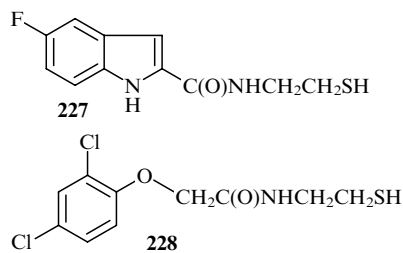
IV. Аллостерические ингибиторы

Аллостерическая регуляция, основанная на наличии у ферментов специфических регуляторных участков, которые пространственно удалены от каталитического центра, занимает важное место в регуляции процессов метаболизма в живых организмах.⁴⁶ Для активации или ингибирования фермента используют низкомолекулярные регуляторы активности, которые по своей структуре отличаются от субстрата и называются аллостерическими эффекторами. Для улавливания низкомолекулярных регуляторов используют образование обратимой дисульфидной связи.⁴⁷

Кравченко и сотр.,⁴³ подтвердившие неконкурентную природу ингибирования каспазы 3 2,3-дигидро-1*H*-пирроло[3,4-с]хинолин-1,3-дионами, показали, что ингибиторы этого класса могут взаимодействовать с SH-группой цистеина, не входящего в активный центр, обеспечивая аллостерическую инактивацию фермента. Подобные соображения высказывались и в отношении дисульфидрама (**125**), ингибирующего каспазы 1 и 3, вероятно, по аллостерическому механизму.²¹ В этой связи представляет интерес рассмотреть работы, в которых предлагаются подходы, обеспечивающие ингибирование каспаз без затрагивания каталитического центра.

Скрининг библиотеки из 10 000 тиолсодержащих соединений с использованием каспаз 3 и 7 выявил два типа соединений — 2-меркаптоэтилаид 5-фтор-1*H*-индол-2-карбоновой кислоты (**227**) и *N*-(2-меркаптоэтил)-2-(2,4-дихлорфенокси)-ацетамид (**228**), — которые, связываясь с не входящим в активный центр цистеином,[¶] ингибируют оба фермента.⁴⁷

¶ Каспазы 3 и 7 помимо остатка цистеина, входящего в состав каталитического центра, имеют еще пять цистеиновых остатков, экспонированных на поверхности фермента.



Было найдено, что оба соединения связываются с единственным цистеиновым остатком в малой субъединице димеров каспазы 3 (Cys-264) и каспазы 7 (Cys-290) и количественно ингибируют эти ферменты. Связывание соединений **227** и **228** с ферментами не приводит к диссоциации димера, но препятствует связыванию тетрапептида Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO, имитирующего субстрат, что подтверждает наличие у каспаз 3 и 7 аллостерического сайта, пространственно удаленного от активного центра и связанного с ним функционально.

Рентгеноструктурный анализ комплексов каспазы 7 с соединениями **227** и **228** показал, что цистеиновый остаток, участвующий в связывании с этими соединениями, располагается в глубокой полости на поверхности димера на расстоянии 14 Å от активного центра. Соединения **227** и **228** при связывании фиксируют конформацию фермента, подобную конформации прокаспазы 7, что и делает фермент неактивным. Из данных рентгеноструктурного анализа следует, что соединения **227** и **228** по-разному располагаются в центральной впадине, но структура каспазы 7 в обоих случаях идентична. Таким образом, несмотря на то что молекулы **227** и **228** связываются в аллостерическом центре каспазы 7 неодинаково, они фиксируют одну и ту же неактивную конформацию фермента.

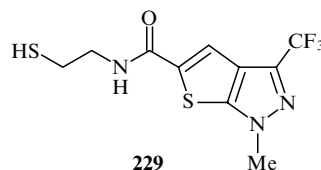
При сравнении структур каспазы 7, ингибированной соединением **227** и связанной с имитатором субстрата, было установлено, что соединение **227** при взаимодействии с ферментом так искажает его активный центр, что он становится неспособным связывать субстрат и осуществлять катализ. Поскольку аллостерически ингибированная структура фермента наиболее сходна со структурой зимогена, можно полагать, что аллостерические ингибиторы работают, индуцируя нативное состояние белка-зимогена.

Концепция сохранения зимогена в неактивном состоянии за счет конформационных перестроек (движений в активном центре) высказывалась и для других ферментов (см., например, работу⁴⁸). Интересно то, что небольшие молекулы, подобные молекулам **227** и **228**, способны индуцировать естественный переход фермента в зимогенподобное состояние в протеолитически обработанной активной протеазе.

Аналогичный аллостерический сайт был обнаружен и у каспазы 1, относящейся к группе каспаз, связанных с воспалительными процессами.⁴⁹ Структура каспазы 1 только на 20–30% сходна с первичной структурой каспазы 7. В каспазе 1 цистеиновым остатком, эквивалентным по функции остатку Cys-290 в каспазе 7, оказался остаток Cys-331. При скрининге библиотеки из ~8000 тиолсодержащих соединений было идентифицировано 14 соединений, которые связывались с SH-группой Cys-331 и ингибировали активность каспазы 1.[†] Одним из этих соединений был *N*-(2-меркаптоэтил)амид

[†] Процессы связывания и ингибирования полностью обратимы в присутствии высоких концентраций 2-меркаптоэтанола (восстанавливающего агента).

1-метил-3-трифторметилтиено[2,3-*c*]пирозол-5-карбоновой кислоты (**229**).



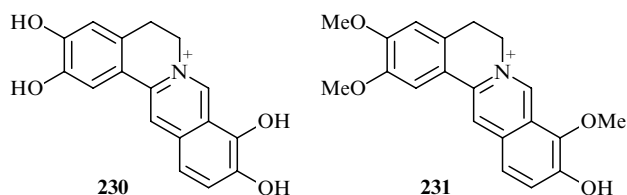
Рентгеноструктурный анализ комплекса каспазы 1 с соединением **229** показал, что две молекулы соединения **229** связываются с каспазой 1 симметрично на границе димера, при этом каждая молекула присоединяется к остатку Cys-331 в одной субъединице, а большую часть своих нековалентных контактов осуществляет с аминокислотными остатками другой субъединицы. Установлено, что и в этом случае аллостерический ингибитор **229** индуцировал переход фермента в неактивную конформацию, соответствующую конформации зимогена. Эти результаты позволили предположить, что все каспазы имеют общий регуляторный сайт для аллостерического контроля воспаления и апоптоза.

Аллостерические сайты в ферментах представляют интерес при создании лекарственных препаратов, поскольку в этом случае функциональные группы соединения, ответственные за его связывание с мишенью, отличаются от групп, участвующих в связывании с активным центром, что открывает дополнительные возможности для увеличения селективности.

V. Ингибиторы на основе природных соединений

Среди низкомолекулярных непептидных ингибиторов, влияющих на апоптоз, особое место занимают ингибиторы природного происхождения, обнаруженные среди алкалоидов, ретиноидов и катехинов, а также соединения, синтезированные на их основе.

В результате высокопроизводительного скрининга соединений из корейского химического банка были выбраны соединения **230** и **231** — производные берберина — алкалоида, содержащего изохинолиновое кольцо.



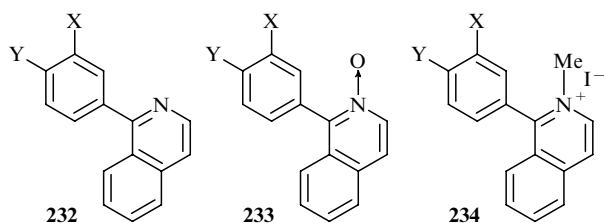
Эти соединения, взятые в концентрации 20 мкмоль · л⁻¹, ингибировали каспазу 3. По данным компьютерного анализа, они связывались с активным центром каспазы 3 посредством Н-связей и гидрофобных контактов.⁵⁰ Используя данные молекулярного докинга, авторы модифицировали структуру соединения **230** следующим образом: 1) удалили атомы углерода, соединяющие изохинолиновое и пирокатехиновое кольца, чтобы сделать жесткий скелет молекулы **230** более подвижным; 2) окислили атом азота, что должно было привести к усилению ионного взаимодействия сконструированного ингибитора с остатком Arg-207 активного центра; 3) переместили пирокатехиновый заместитель из положения 3 в положение 1 изохинолина для дополнительного гидрофобного взаимодействия с остатками Trp-206 и

Таблица 28. Ингибиторы каспазы 3 на основе 1-фенилизохинолина.⁵⁰

X	Y	Нейтральная форма		N-Оксид		N-Метилиодид	
		соединение	ингибирование, %	соединение	ингибирование, %	соединение	ингибирование, %
H	H	232a	7	233a	31	234a	46
OMe	OMe	232b	—	233b	19	234b	22
H	OMe	232c	53	233c	51	234c	53
OMe	H	232d	69	233d	60	234d	29
Me	H	232e	40	233e	57	234e	40
Cl	H	232f	24	233f	43	234f	31
CN	H	232g	34	233g	44	234g	41
CH(OH)Bu ⁿ	H	232h	41	233h	37	234h	34
OH	OH			233i	13	234i	42
H	OH			233j	23	234j	44
OH	H			233k	59	234k	62
H	H	235a	31	236a	51	237a	51
OMe	OMe	235b	57	236b	48	237b	51
OMe	H	235c	63	236c	40	237c	44
Cl	H	235d	7	236d	54		
NO ₂	H	235e	56				
OH	OH	235f	48	236f	32		

Phe-256 в гидрофобном S2-кармане каспазы 3; 4) удалили гидроксигруппы в изохинолиновом фрагменте молекулы.

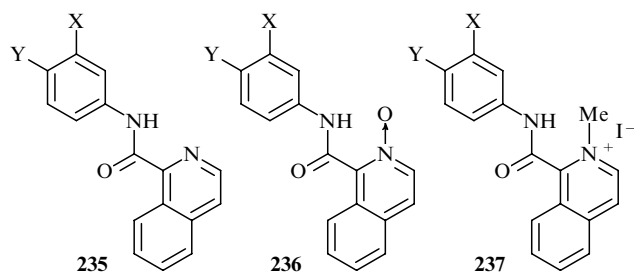
В результате такого модифицирования была сконструирована структура **232**, остовом которой является 1-фенилизохинолин. В табл. 28 приведены разнообразные производные 1-фенилизохинолина (**232**), его *N*-оксида (**233**) и *N*-метилиодида (**234**).



Здесь же приведены данные по их ингибированию каспазы 3. Способность соединений **232**–**234** ингибировать каспазу 3 при концентрации 20 мкмоль·л^{−1} лишь в немногих случаях превышала 55% (см.[‡]). Более низкие активности незамещенного фенильного производного **232a** и его *N*-оксида **233a**, чем их метоксифенильных аналогов **232c,d**, **233c,d** указывают на то, что метоксигруппа может участвовать во взаимодействии с ферментом. Относительное расположение метоксигруппы в соединениях **232** и **233** практически не оказывает влияния на активность, хотя в случае *N*-метилиодидов различие в активности *мета*- и *пара*-замещенных метоксипроизводных весьма велико (см. табл. 28). Монометоксипроизводные оказались более активными, чем соответствующие дизамещенные соединения.

Введение амидной связи между изохинолиновым циклом и бензольным кольцом (соединения **235**–**237**) позволило в некоторых случаях повысить ингибирующую активность, например, в случае незамещенных производных (ср. актив-

ности соединений **232a** и **235a**, **233a** и **236a**, **234a** и **237a**) и 2,4-диметоксизамещенных производных (ср. активности соединений **233b** и **236b**, **234b** и **237b**). Замена амидной связи простой эфирной связью оказалась неудачной: ингибирующая активность полученных производных была ниже 5%.



Таким образом, использование берберинового остова для конструирования ингибиторов каспазы 3 большого успеха не имело, хотя следует отметить, что синтезированные позднее ингибиторы на основе тетрагидроизохинолин-1,3,4-триона³⁸ обладали уже более высокими активностями (см. раздел III.4 и табл. 18).

Известно, что ретиноиды (нативные и синтетические), структурно связанные с витамином А, участвуют в различных биохимических процессах: в росте, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток (см., например, работу⁵¹ и ссылки в ней). Так, в частности, 14-гидрокси-4,14-*ретро*-ретинол (**238**, табл. 29) участвует в клеточной пролиферации, поддерживая рост клеток,⁵² а ангидро-*ретро*-ретинол (**239**) действует как природный антагонист, задерживая клеточный рост.⁵³ Такое соотношение биологической активности *ретро*-ретиноидов **238** и **239**, когда одно соединение может аннулировать эффект другого при фармакологических дозах, представляет несомненный интерес и может быть использовано для терапевтического контроля различных заболеваний.⁵⁴

В работе⁵¹ описан синтез ряда производных ретиноидов (соединений **240**–**243**, см. табл. 29), а ретиноидов (**244**, **245**) и терфенилов (**246**). Наиболее эффективными оказались терфенильные производные, которые значительно повышали про-

[‡] Для сравнения, соединения **126** (см. табл. 15) и *N*-бензил-5-нитроизатин ингибировали каспазу 3 в аналогичных условиях на 82 и 95% соответственно.

Таблица 29. Влияние ретиноидов, *ретро*-ретиноидов, аротиноидов и терфенилов на апоптоз.⁵¹

Соединение	Структура	Ингибирование апоптоза, %	Соединение	Структура	Ингибирование апоптоза, %
238		34	244		36
239		—	245		43
240		37	246		36
241		41		<i>цис</i> -изомер	42
242		30		<i>транс</i> -изомер	
243		40		<i>пара</i> -изомер	18
				<i>мета</i> -изомер	17
				<i>орто</i> -изомер	22

Таблица 30. Ингибирование каспазы 3 производными катехинов чая.⁵⁵

Соединение	Структура	IC_{50} , мкмоль · л ⁻¹	Соединение	Структура	IC_{50} , мкмоль · л ⁻¹
247		0.01	251		1
248		0.1	252		См. ^a
249		0.1	253		См. ^a
250		1	254		См. ^a

^a Не ингибирует при концентрации 100 мкмоль · л⁻¹.

должительность жизни клеток в различных экспериментальных моделях апоптоза. Так как в работе⁵¹ оценивалась лишь способность полученных соединений поддерживать рост клеток и ингибировать апоптоз (эти характеристики оценивали на культуре клеток HL-60 при концентрации исследуемых веществ $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$), но не была определена их ингибирующая активность *in vitro* на соответствующих ферментных препаратах, то результаты исследования, по мнению самих авторов, оказались довольно скромными. Пока нет достаточных оснований считать производные ретиноидов ингибиторами каспаз. Работу⁵¹ следует рассматривать как первый этап будущих исследований по поиску соединений этого класса с более высокой антиапоптотической активностью, непосредственно связанной с ингибированием каспаз.

Флавоноиды — еще один класс природных соединений, структуру которых попытались использовать в качестве остова для построения ингибиторов каспаз, а следовательно апоптоза. В работе⁵⁵ было показано, что некоторые производные катехинов чая ингибируют каспазы 3, 2 и 7 и предотвращают апоптоз. Наиболее сильным ингибитором оказался главный компонент зеленого чая — эпигаллокатехин-3-галлат (**247**, табл. 30) с $IC_{50} = 10 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Эфиры катехинов и галловой кислоты оказались более активными, чем катехины со свободной гидроксигруппой в положении 3 (ср. активности соединений **247–249** и **250–252**), при этом эфиры эпигаллокатехина **247** на порядок активнее соответствующего эфира катехина (**248**), но активности эпигаллокатехина (**250**) и эпикатехина (**251**) оказались одинаковыми. Важной характеристикой является конфигурация заместителя в положении 3 хроманового цикла: так, эписмер **248** на порядок активнее своего диастереомера **249**, а эпикатехин (**251**) ингибирует каспазу при $IC_{50} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, тогда как катехин (**252**) и галлокатехин (**253**) неактивны даже при концентрации $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Изучение кинетики ингибирования каспазы 3 соединениями **247–250** показало, что в данном случае имеет место аллостерическое ингибирование, т.е. место связывания катехинов не совпадает с местом связывания субстрата. В случае ингибирования каспаз 2 и 7 соединением **247** наблюдали неконкурентное ингибирование.

Эффективность производных катехина, в частности соединения **247**, в ингибировании апоптоза была продемонстрирована на культуре клеток HeLa и гепатоцитах крысы. Полученные в работе⁵⁵ данные об ингибирующей активности катехинов чая *in vitro* и *in vivo* противоречат имеющимся в литературе сведениям (см. работы^{56,57}) о применении этих соединений для предупреждения и лечения онкологических заболеваний. Авторы работы⁵⁵ считают, что это противоречие можно объяснить использованием в работах^{56,57} значительно более высоких концентраций катехинов ($10^{-3}–10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$), которые уже не являются физиологическими, а потому токсичны.

* * *

Рассмотренный в обзоре материал показывает, что ингибирование каспаз важно для блокирования апоптоза. Ингибирование каспаз является перспективным подходом для лечения заболеваний, характеризующихся избыточным апоптозом. Выбор остова при конструировании ингибитора должен определяться доступностью исходных соединений, их конформационной подвижностью и достаточным соответствием строения остова участку связывания остатка аспарагиновой кислоты субстрата, консервативного для

большинства каспаз. Конформационная подвижность необходима для точной локализации отдельных элементов структуры ингибитора и должна способствовать взаимодействиям его фрагментов со смежными участками активного центра.

Открытие в каспазах аллостерического центра открывает дополнительные возможности для создания новых низкомолекулярных ингибиторов каспаз, неослабевающий интерес к которым связан не только с потребностями в соответствующих терапевтических препаратах, блокирующих апоптоз, но и с обнаружением у этих ферментов неапоптотических функций.^{58–60}

Литература

1. N.Thornberry, Y.Lasebnik. *Science*, **281**, 1312 (1998)
2. J.-B.Denault, G.S.Salvesen. *Chem. Rev.*, **102**, 4489 (2002)
3. P.Fuentes-Prior, G.S.Salvesen. *Biochem. J.*, **384**, 201 (2004)
4. R.V.Talanian, K.D.Brady, V.L.Cryns. *J. Med. Chem.*, **43**, 3351 (2000)
5. M.Garcia-Calvo, E.P.Peterson, B.Leiting, R.Ruel, D.W.Nicholson, N.A.Thornberry. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32608 (1998)
6. R.S.Hotchiss, K.S.Chang, P.E.Swanson, K.W.Tinsley, J.J.Hui, P.Klender, S.Xanthoudakis, S.Roy, C.Black, E.Grimm, R.Aspiotis, Y.Han, D.W.Nicholson, I.E.Karl. *Nature Immunol.*, **1**, 496 (2000)
7. B.H.Han, D.Xu, J.Choi, Y.Han, S.Xanthoudakis, S.Roy, J.Tam, J.Vaillancourt, J.Colucci, R.Siman, A.Giroux, G.S.Robertson, R.Zamboni, D.W.Nicholson, D.M.Holtzman. *J. Biol. Chem.*, **277**, 30128 (2002)
8. S.D.Linton, D.S.Karnewsky, R.J.Ternansky, J.S.Wu, B.Pham, L.Kodandapani, R.Smidt, J.-L.Diaz, L.C.Fritz, K.J.Tomaselli. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2969 (2002)
9. S.D.Linton, D.S.Karnewsky, R.J.Ternansky, N.Chem, X.Guo, K.G.Jahangiri, V.J.Kalish, S.P.Meduna, E.D.Robison, B.R.Ullman, J.C.Wu, B.Pham, L.Kodandapani, R.Smidt, J.-L.Diaz, L.C.Fritz, U.von Krosigk, S.Roggo, A.Schmitz, K.J.Tomaselli. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 2973 (2002)
10. Y.Han, A.Giroux, E.L.Grimm, R.Aspiotis, S.Francoeur, C.I.Bayly, D.J.McKay, S.Roy, S.Xanthoudakis, J.P.Vaillancourt, D.M.Rasper, J.Tam, P.Tawa, N.A.Thornberry, E.P.Peterson, M.Garcia-Calvo, J.W.Becker, J.Rotonda, D.W.Nicholson, R.J.Zamboni. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 805 (2004)
11. J.W.Becker, J.Rotonda, S.M.Soisson, R.Aspiotis, C.Bayly, S.Francoeur, M.Gallant, M.Garcia-Calvo, A.Giroux, E.Grimm, Y.Han, D.McKay, D.W.Nicholson, E.Peterson, J.Renaud, S.Roy, N.Thornberry, R.Zamboni. *J. Med. Chem.*, **47**, 2466 (2004)
12. A.M.M.Mjalli, K.T.Chapman, M.MacCoss, N.A.Thornberry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2689 (1993)
13. A.B.Shahripour, M.S.Plummer, E.A.Lunney, H.P.Albrecht, Sh.J.Hays, C.R.Kostlan, T.K.Sawyer, N.P.C.Walker, K.D.Brady, H.J.Allen, R.V.Talanian, W.W.Wong, Ch.Humblett. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 31 (2002)
14. A.B.Shahripour, M.S.Plummer, E.A.Lunney, T.K.Sawyer, Ch.J.Stankovic, M.K.Connolly, J.R.Rubin, N.P.C.Walker, K.D.Brady, H.J.Allen, R.V.Talanian, W.W.Wong, Ch.Humblett. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2779 (2001)
15. D.A.Erlanson, A.C.Braisted, D.R.Raphael, M.Randal, R.M.Stroud, E.M.Gordon, J.A.Wells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9367 (2000)
16. D.A.Erlanson, J.W.Lam, Chr.Wiesmann, T.N.Luong, P.L.Simmons, W.L.DeLano, I.C.Choong, M.T.Burdett, W.M.Flanagan, D.Lee, E.M.Gordon, T.O'Brien. *Nature Biotechnol.*, **21**, 308 (2003)
17. R.E.Dolle, D.Hoyer, C.V.C.Prasad, S.J.Schmidt, C.T.Helaszek, R.E.Miller, M.A.Ator. *J. Med. Chem.*, **37**, 563 (1994)

18. I.C.Choong, W.Lew, D.Lee, Ph.Pham, M.T.Burdett, J.W.Lam, Ch.Wiesman, T.N.Luong, B.Fahr, W.I.DeLano, R.S.McDowell, D.A.Allen, D.A.Erlanson, E.M.Gordon, T.O'Brien. *J. Med. Chem.*, **45**, 5005 (2002)
19. D.A.Allen, Ph.Pham, I.C.Choong, B.Fahr, M.T.Burdett, W.Lew, W.L.DeLano, E.M.Gordon, J.W.Lam, T.O'Brien. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3651 (2003)
20. J.Vazquez, A.Garcia-Jareno, L.Mondragon, J.Rubio-Martinez, E.Perez-Paya, F.Albericio. *ChemMedChem.*, **3**, 979 (2008)
21. C.St.I.Nobel, M.Kimland, S.W.Nicholson, S.Orrenius, A.F.G.Slater. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1319 (1997)
22. B.E.Evans, R.E.Rittle, M.G.Bock, R.M.DiPardo, R.M.Freidinger, W.L.Whitter, G.F.Lundell, D.F.Veber, P.S.Anderson, R.S.L.Chang, V.J.Lotti, D.J.Cerino, T.B.Chen, P.J.Kling, K.A.Kunkel, J.P.Springer, J.Hirshfield. *J. Med. Chem.*, **31**, 2235 (1988)
23. J.S.Mason, I.Morize, P.R.Menard, D.L.Cheney, Ch.Hulme, R.F.Labaudiniere. *J. Med. Chem.*, **42**, 3251 (1999)
24. D.A.Horton, G.T.Bourne, M.L.Smith. *Chem. Rev.*, **103**, 893 (2003)
25. D.Lee, S.A.Long, J.L.Adams, G.Chan, K.S.Vaidya, T.A.Francis, K.Kikly, J.D.Winkler, Ch.-M.Sung, C.Debouck, S.Richardson, M.A.Levy, W.E.DeWolf Jr., P.M.Keller, T.Tomaszek, M.S.Head, M.D.Ryan, R.C.Haltiwanger, P.-H.Liang, Ch.A.Janson, P.J.McDevitt, K.Johanson, N.P.Concha, W.Chan, Sh.S.Abdel-Meguid, A.M.Badger, M.W.Lark, D.P.Nadeau, L.J.Suva, M.Gowen, M.E.Nuttall. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16007 (2000)
26. C.W.Scott, C.Soboltra-Briner, D.E.Wilkins, R.T.Jacobs, J.J.Folmer, W.J.Fraze, R.V.Bhat, S.V.Ghanekar, D.Aharony. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **304**, 433 (2003)
27. D.Lee, S.A.Long, J.H.Murray, J.L.Adams, M.E.Nuttall, D.P.Nadeau, K.Kikly, J.D.Winkler, Ch.-M.Sung, M.D.Ryan, M.A.Levy, P.M.Keller, W.E.DeWolf. *J. Med. Chem.*, **44**, 2015 (2001)
28. W.Chu, J.Zhang, Ch.Zeng, J.Rothfuss, Zh.Tu, Y.Chu, D.E.Reichert, M.J.Welch, R.H.Mach. *J. Med. Chem.*, **48**, 7637 (2005)
29. K.Kopka, A.Faust, P.Keul, S.Vagner, H.-J.Breyholz, C.Höltke, O.Schober, M.Schäfers, B.Levkau. *J. Med. Chem.*, **49**, 6704 (2006)
30. W.Chu, J.Rothfuss, A.d'Avignon, Ch.Zeng, D.Zhou, R.S.Hotchkiss, R.H.Mach. *J. Med. Chem.*, **50**, 3751 (2007)
31. G.Smith, M.Glaser, M.Perumal, Q.-D.Nguyen, B.Shan, E.Arstad, E.O.Aboagye. *J. Med. Chem.*, **51**, 8057 (2008)
32. J.Rotonda, D.W.Nicholson, K.M.Fazil, M.Gallant, Y.Gareau, M.Labelle, E.P.Peterson, D.M.Rasper, R.Ruel, J.P.Vaillancourt, N.A.Thornberry, J.W.Becker. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **3**, 619 (1996)
33. S.E.Webber, J.Tikhe, S.T.Worland, S.A.Fuhrman, T.F.Hendrickson, D.A.Matthews, R.A.Love, A.K.Patrick, J.W.Meador, R.A.Ferre, E.L.Brown, D.M.DeLisle, C.E.Ford, S.L.Binford. *J. Med. Chem.*, **39**, 5072 (1996)
34. D.Y.Lee, K.H.Hyun, H.Y.Park, K.A.Lee, B.-S.Lee, Ch.K.Kim. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **27**, 273 (2006)
35. И.Г.Цыганкова, С.М.Женодарова. *Журн. общ. химии*, **79**, 498 (2009)
36. J.G.Chapman, W.P.Magce, H.A.Stukenbrok, G.E.Beckius, A.J.Milia, W.R.Tracey. *Eur. J. Pharmacol.*, **456**, 59 (2002)
37. R.Fattorusso, D.Jung, K.J.Crowell, M.Forino, M.Pellecchia. *J. Med. Chem.*, **48**, 1649 (2005)
38. Y.-H.Chen, Y.-H.Zhang, H.-J.Zhang, D.-Z.Liu, M.Gu, J.-Y.Li, F.Wu, X.-Z.Zhu, J.Li, F.-J.Nan. *J. Med. Chem.*, **49**, 1613 (2006)
39. Д.В.Кравченко. Автореф. дис. д-ра хим. наук. РУДН, Москва, 2006
40. D.V.Kravchenko, V.M.Kysil, S.E.Tkachenko, S.Maliarchouk, I.M.Okun, A.V.Ivachtchenko. *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 1377 (2005)
41. D.V.Kravchenko, Yu.A.Kusovkova, V.M.Kysil, S.E.Tkachenko, S.Maliarchouk, I.M.Okun, K.V.Balakin, A.V.Ivachtchenko. *J. Med. Chem.*, **48**, 3680 (2005)
42. Д.В.Кравченко, Я.А.Иваненков, К.В.Балакин, В.М.Кисиль, С.Е.Ткаченко, И.М.Окунь, А.В.Ивашенко. *Хим.-фарм. журн.*, **40** (3), 14 (2006)
43. I.Okun, S.Malarchuk, E.Dubrovskaya, A.Khvart, S.Tkachenko, V.Kysil, A.Ilyin, D.Kravchenko, E.R.Prossnitz, L.Sclar, A.Ivachtchenko. *J. Biomol. Screen.*, **11**, 277 (2006)
44. S.Sharma, K.Sahu, P.Jain, V.K.Mourya, R.K.Agrawal. *Med. Chem. Res.*, **17**, 399 (2008)
45. D.V.Kravchenko, V.V.Kysil, A.P.Ilyn, S.E.Tkachenko, S.Maliarchouk, I.M.Okun, A.V.Ivachtchenko. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1841 (2005)
46. Б.И.Курганов. *Аллотерические ферменты*. Наука, Москва, 1978
47. J.A.Hardy, J.Lam, J.T.Nguyen, T.O'Brien, J.A.Wells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12461 (2004)
48. M.S.Dennis, C.Eigenbrot, N.J.Skelton, M.H.Ultsch, L.Suntell, M.A.Dwyer, M.P.O'Connell, R.A.Lazarus. *Nature (London)*, **404**, 465 (2000)
49. J.M.Scheer, M.J.Romanowski, J.A.Wells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7595 (2006)
50. E.-s.Kim, S.-e.Yoo, K.Y.Yi, S.Lee, J.-s.Noh, Y.-S.Jung, E.Kim, N.Jeong. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 1003 (2002)
51. D.Simoni, G.Giannini, M.Roberti, R.Rondanin, R.Baruchello, M.Rossi, G.Grisolia, F.P.Invidiata, S.Aiello, S.Marino, S.Cavallini, A.Siniscalchi, N.Gebbia, L.Crosta, S.Grimaudo, V.Abbadessa, A.Di Cristina, M.Tolomeo. *J. Med. Chem.*, **48**, 4293 (2005)
52. F.Derguini, K.Nakanishi, U.Hämmerling, J.Buck. *Biochemistry*, **33**, 623 (1994)
53. Y.Chen, J.Buck, F.Derguini. *Cancer Res.*, **59**, 3985 (1999)
54. M.J.O'Connell, R.Chua, B.Hoyos, J.Buck. *J. Exp. Med.*, **184**, 549 (1996)
55. N.Katunuma, A.Ohachi, E.Sano, N.Ishimaru, Y.Hayashi, E.Murata. *FEBS Lett.*, **580**, 741 (2006)
56. S.Okabe, Y.Ochiai, M.Aida, K.Park, S.J.Kim, T.Nomura, M.Suganuma, H.Fujiki. *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 733 (1999)
57. M.Suganuma, E.Sucoka, S.Okabe, S.Fujiki. *Biofactors*, **13**, 67 (2000)
58. Н.В.Гуляева. *Биохимия*, **68**, 1459 (2003)
59. В.В.Юрасов, М.А.Грудень, З.И.Сторожева, Н.Е.Яковлева, Е.В.Маркина, В.И.Шаров, В.В.Шерстнев. *Нейрохимия*, **24**, 304 (2007)
60. D.Graf, J.C.Bode, D.Häussinger. *Arch. Biochem. Biophys.*, **462**, 162 (2007)

SMALL MOLECULE INHIBITORS OF CASPASES**S.M.Zhenodarova***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences**3, Ul. Institutskaya, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, Fax +7(496)733-0553*

The review is devoted to small molecule inhibitors of caspases, a family of cysteine proteases, playing a key role in apoptosis (programmed cell death). Inhibitors comprising an aspartic acid fragment or heterocyclic systems (synthetic and of natural origin) are considered and possible mechanisms of their action are discussed. The available data on the SAR of the inhibitors are systematically analyzed. The interactions of fragments of non-peptide inhibitors with the enzyme are concerned. Examples on the application of the apoptosis inhibitors are presented.

Bibliography — 60 references.

Received 1st April 2009