

УДК 577.15.08+577.158

## Ингибиторы NO-синтаз: химический аспект проблемы

Ю. С. КОСЕНКОВА, М. П. ПОЛОВИНКА, Н. Ф. САЛАХУТДИНОВ

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения РАН,  
проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)**E-mail: anvar@nioch.nsc.ru*

(Поступила 19.02.10; после доработки 01.10.10)

### Аннотация

В обзоре рассмотрены различные классы соединений, проявляющих свойства ингибиторов NO-синтаз. Проанализированы и систематизированы литературные данные по природным и синтетическим агентам, опубликованные в период с 2003 по 2009 гг.

**Ключевые слова:** оксид азота, ингибиторы оксида азота, NO-синтазы, селективность

### Оглавление

Введение .....	669
Ингибиторы iNOS природного происхождения.....	671
Алкалоиды, изопреноиды, стероиды .....	672
Стильбены, бибензилы и бисбибензилы .....	673
Диарилгептаноиды и флавоноиды .....	675
Функционизированные природные агенты .....	679
Производные аминокислот .....	679
Халконы и кумарины .....	683
Тритерпеновые кислоты, фенольные соединения .....	683
Ингибиторы iNOS синтетического происхождения .....	684
Амидины .....	684
Азотсодержащие гетероциклические соединения .....	684
Наиболее известные ингибиторы iNOS.....	687
Выводы.....	689

### ВВЕДЕНИЕ

Открытие физиологической и патофизиологической роли оксида азота (NO) в 80-х годах прошлого века стало одним из самых выдающихся открытий в области биологических наук [1–3]. В исследованиях, касающихся роли NO в нейротрансмиссии [4, 5] и формировании реакций иммунной системы [6], было показано, что NO представляет собой уникальный по своей природе и механизмам действия мессенджер в большинстве клеток организма. Он участвует в регуляции многих физиологически важных процессов, таких как

вазодилатация, агрегация тромбоцитов, состояние памяти, а также некоторых патологических процессах [7, 8]. Широкий резонанс темы о важной биологической роли NO в организме и большое число публикаций в мировой научной литературе послужили основанием для того, чтобы в 1992 г. журнал Science объявил NO “Молекулой года” [9]. Американские ученые Р. Фуршготт, Ф. Мурад и Л. Игнарро получили в 1998 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие “оксида азота” как сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе. Предлагаемый обзор, посвященный поиску и синтезу веществ, об-



в течение более длительного периода времени. Сейчас очевидно, что все три изоформы могут быть индуцированы, хотя и разными стимуляторами, и все три могут постоянно присутствовать в некоторых клетках и тканях [24].

2. nNOS и eNOS являются кальмодулин-зависимыми, iNOS – независимой. Это касается, в первую очередь, iNOS человека и грызунов. Для iNOS морских свинок выявлена другая закономерность [25].

3. nNOS и iNOS локализованы исключительно в цитозоле, а eNOS обычно связана с клеточными мембранами. На сегодняшний день уже установлено, что все три изоформы могут находиться как в растворенном состоянии, так и в связанном [26].

Тем не менее, всем трем изоформам NOS для превращения L-аргинина в NO и L-цитруллин необходимы коферменты: восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), тетрагидробиоптерин ( $H_4B$ ), флавиномононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД) [27]. Механизм образования NO из L-аргинина у всех трех изоформ схож и представляет собой двухступенчатую окислительную реакцию. Электроны, отдаваемые НАДФН, передаются через ФАД и ФМН гемовой группе, что приводит на второй стадии к образованию L-цитруллина и выделению NO.

Механизм протекания процесса “второго окисления” долгое время уточнялся [28–30]. Так, авторы более поздних работ [31, 32] предполагают, что после разрыва связи N–H пероксожелезом гема образуется промежуточный катион-радикал, который способствует разрыву связи O–H с образованием иминоксид-радикала. Нуклеофильная атака пероксожелеза гема на иминоксид-радикал ведет к тетраэдрическому интермедиату, при распаде которого образуется NO и цитруллин (схема 2).

Три изоформы NOS вовлечены в различные патологические процессы, включая бо-

лезнь Альцгеймера и инсульт (NOS-1 или nNOS), септический шок, артрит и воспалительные процессы (NOS-2 или iNOS), образование отеков и эндотелиальных повреждений (NOS-3 или eNOS). Это определяет потребность в селективных ингибиторах различных изоформ NOS [33]. Кроме того, идеальный ингибитор NOS не должен необратимо ингибировать фермент, так как это может привести к нежелательным последствиям.

Следует отметить, что по механизму действия ингибиторы NOS разделяются на следующие группы:

1. Соединения, способные не допустить поступления L-аргинина к активному центру фермента.
2. Вещества, инактивирующие кофакторы, необходимые для катализируемого NOS-окисления L-аргинина.
3. Ингибиторы переноса электронов с участием НАДФН и флавинов, а также агенты, способные вмешиваться в функции гема.
4. Соединения, ингибирующие экспрессию NOS.
5. Соединения, снижающие концентрацию образующегося оксида азота [10].

По происхождению ингибиторы NO-синтазы можно разделить на природные, полусинтетические и синтетические. К настоящему времени поиск селективных ингибиторов NOS ведется по всем трем направлениям.

#### ИНГИБИТОРЫ NOS ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Растительное сырье – важнейший источник биологически активных соединений, поэтому одним из главных направлений поиска селективных ингибиторов NOS природного происхождения является тестирование растительных экстрактов или выделенных из них индивидуальных соединений. При выборе растительного сырья часто ориентируются на область применения этого растения в народ-

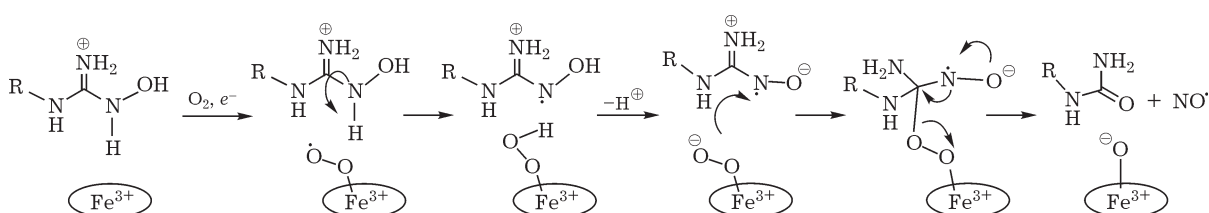


Схема 2. Механизм “второго окисления”.

ной медицине и на возможность его сбора в природе или культивации. Первоначальный биологический скрининг растительных экстрактов, выделение из них действующих агентов, тестирование индивидуальных соединений и дальнейшая их модификация с целью повышения активности, улучшения растворимости, а в соответствии с этим и биодоступности, является стандартной схемой поиска потенциальных ингибиторов NOS. Ограничения такого подхода связаны с тем, что выделение природных соединений из растительного сырья в достаточных количествах не всегда возможно из-за малого содержания необходимого вещества в растении, трудоемкости процесса выделения, малодоступности самого растения. В связи с этим подобные фитохимические исследования редко осуществляются по полной схеме. Чаще всего исследователи ограничиваются выделением из растения мажорных биологически активных соединений.

### Алкалоиды, изопреноиды, стероиды

При тестировании 80 % водно-метанольного экстракта луковиц *Crinum yemense* (семейство Амариллисовых) было показано, что экстракт ингибирует выделение NO в LPS-активированной макрофагальной среде. Выделенные из этого экстракта алкалоиды – йеменин А **1**, (+)-кринамин **2**, (+)-6-гидрокси-кринамин **3** и (-)-ликорин **4** (рис. 1) проявили свойства ингибиторов iNOS [34]. По механизму действия эти соединения были отнесены авторами работы к агентам, подавляющим экспрессию iNOS.

Сесквитерпеновые лактоны **1–13** (см. рис. 1), выделенные из *Artemisia sylvatica* [35], проявили ингибирующую активность по отношению к LPS-индуцированной экспрессии NF-kB. NF-kB, ядерный фактор, белок группы k, впервые найденный в b-лимфоцитах, переведенный в активное состояние, напри-

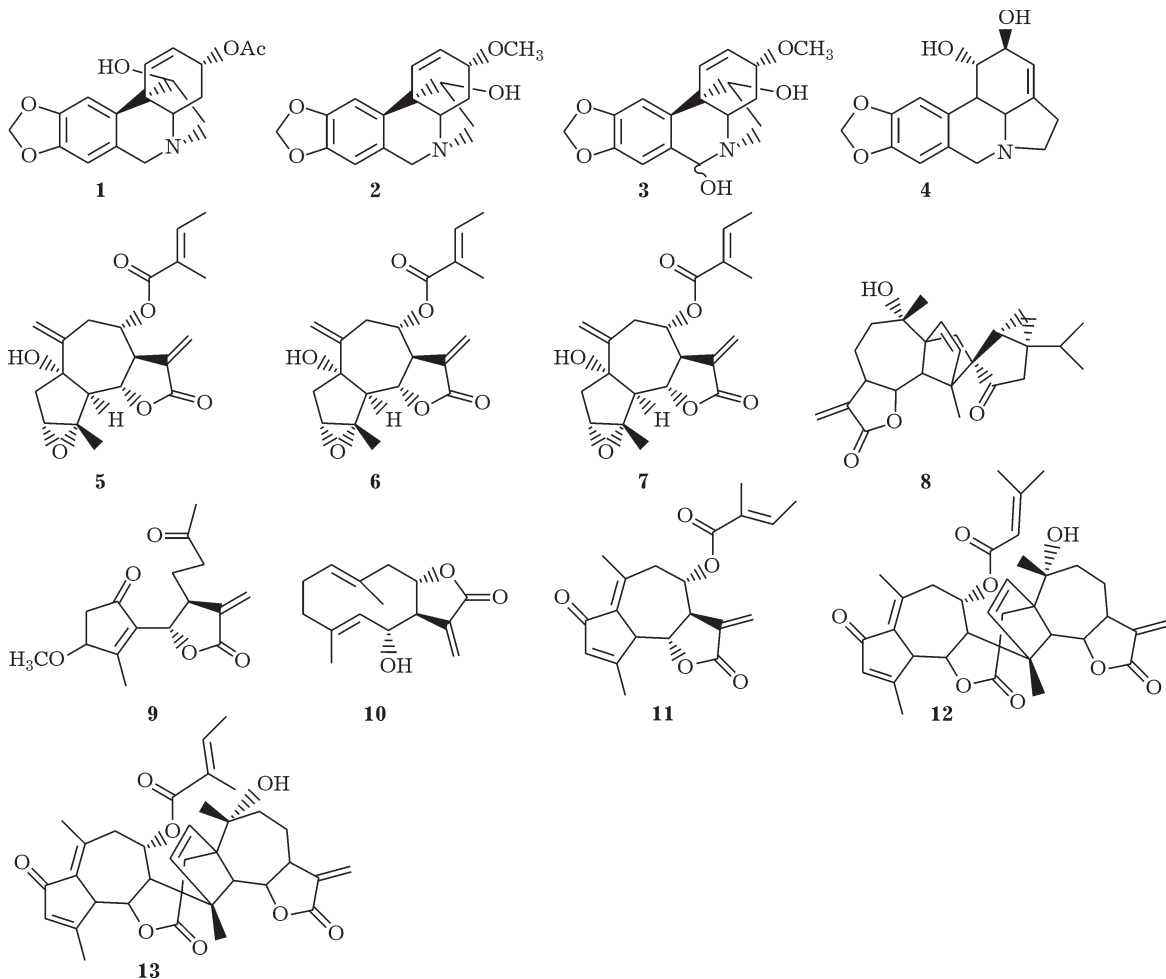


Рис. 1.

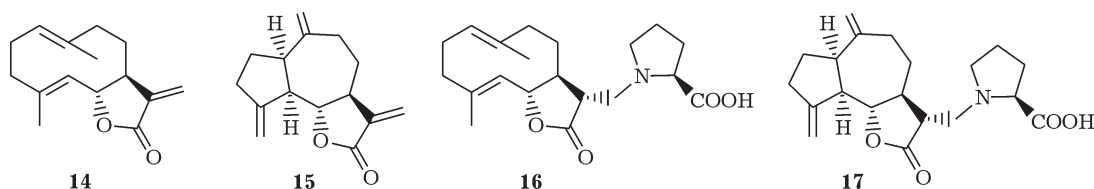


Рис. 2.

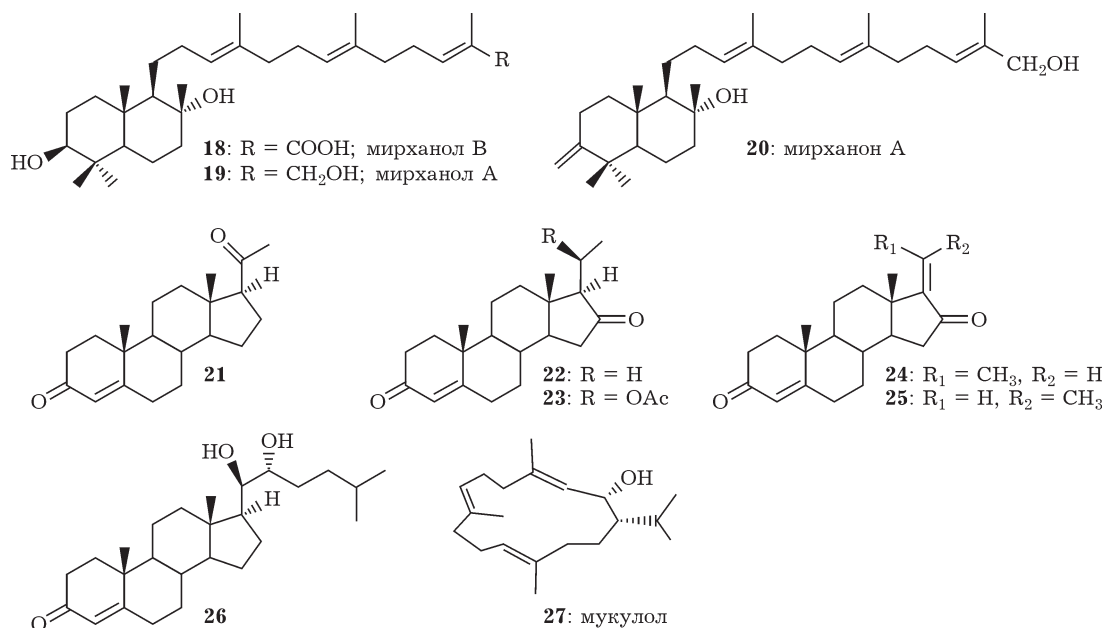


Рис. 3.

мер, действием липополисахаридов, запускает транскрипцию с образованием соответствующих *m*-РНК. Последние далее выходят в цитоплазму, и на рибосомах запускается синтез соответствующих белков, в том числе iNOS. Механизм действия вышеуказанных сесквитерпеновых лактонов на ингибирование LPS-индуцированной экспрессии ядерного фактора NF-κB авторами работы не выяснен, однако вследствие этого процесса ингибируется экспрессия iNOS. В этой связи авторы подчеркивают важность использования в медицине компонентов экстракта при лечении воспалений различной этиологии.

Сходными свойствами обладают мажорные компоненты метанольного экстракта корней *Saussurea lappa* Clarke – лактоны **14**, **15** (рис. 2) и конъюгаты этих лактонов с аминокислотами **16**, **17**, описанные в работе [36]. Они снижают продукцию NO в LPS-активированных перитонеальных макрофагах мыши, подавляя экспрессию ядерного фактора NF-κB.

В работе [37] было исследовано лекарственное растение *Balsamodendron mukul* Hook., произрастающее в Индии, Шри-Ланке и на севере Африки. Водно-метанольный экстракт смолы этого растения также ингибировал выделение NO в LPS-активированных перитонеальных макрофагах мыши. Выделенные из экстракта соединения различного строения – дитерпеноиды, тритерпеноиды, стероиды **18–27** (рис. 3) – проявили ингибирующую активность без какого-либо цитостатического эффекта. В частности, наиболее активные вещества **19**, **27** проявили себя как селективные дозозависимые ингибиторы экспрессии iNOS. Возможно, именно наличие этих компонентов определяет лечебный эффект этого растения.

#### Стильбены, бибензилы и бисбибензилы

В работе [38] показано, что птеростильбен **28** (рис. 4) – *транс*-3,5-диметокси-4'-гид-

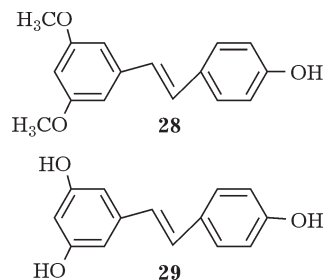
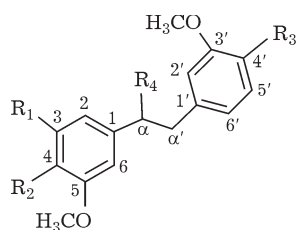


Рис. 4.



- 30:  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$  нобилин D  
 31:  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 32:  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 33:  $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 34:  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
 35:  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = R_4 = \text{OH}$

Рис. 5.

рокстильбен – диметильный аналог резвератрола **29**, выделенный из *Vaccinium ashei*, *Vaccinium stamineum*, обладает сходной с соединением **29** противовоспалительной активностью и вызывает апоптоз различных типов раковых клеток. С помощью анализа ПЦР было показано, что птеростильбен **28** блокирует синтез белка и мРНК iNOS и циклооксигеназы-2 (COX-2) в LPS-индуцированных макрофагах.

Выделенные из *Dendrobium nobile* дигидростильбены (бибензилы) **30–35** (рис. 5) также проявляют iNOS-ингибирующую активность [39] (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Значения  $IC_{50}$  для бибензилы **30–35** и резвератрола **29**

Соединение	$IC_{50}$ , мкмоль
<b>30</b>	15.3
<b>31</b>	Цитотоксичность*
<b>32</b>	48.2
<b>33</b>	Цитотоксичность*
<b>34</b>	36.8
<b>35</b>	32.9
<b>29</b>	23.5

\* Значение  $IC_{50}$  находится в интервале цитостатических концентраций.

Соединения **30**, **32**, **34**, **35** ингибируют продукцию NO без цитостатического эффекта, в то время как для соединений **31**, **33** значения  $IC_{50}$  находятся в интервале цитостатических концентраций. Следует отметить, что нобилин D **30** демонстрирует большую NO-ингибирующую активность относительно препарата сравнения резвератрола **29** и вдвое превосходит по активности дигидростильбен **34**. Последний факт, по-видимому, объясняется тем, что в нобилине D **30** присутствует гидроксильная группы в  $\alpha$ -положении ( $R_4$ ), что отличает его от бибензилы **31–35**.

Биогенетически связаны с дигидростильбенами макроциклические димерные бибензилы – бисбибензилы **36–54** (рис. 6), природным источником которых являются мхи-печеночники [40]. В работе оценивается ингибирующая способность 19 бисбибензилы (табл. 2). Видно, что наиболее сильный ингибитор – это марчантин A **36** ( $IC_{50} = 1.44$  мкмоль), причем введение в положение C-12 гидроксильной группы (как это видно на примере марчантина B **37**) несколько уменьшает ингибирующую способность бисбибензила **37** ( $IC_{50} = 4.1$  мкмоль). Дополнительная гидроксильная группа в положении C-7' в семь раз уменьшает активность соединения **39** ( $IC_{50} = 10.18$  мкмоль), а при ее метилировании (как в случае соединения **40**) активность падает в 40 раз ( $IC_{50} = 62.16$  мкмоль) по сравнению с марчантином A **36**. Перротетин F **48** проявляет невысокую ингибирующую активность ( $IC_{50} = 7.4$  мкмоль), при этом заместители в кольцах A и C аналогичны имеющимся заместителям в марчантине A **36**. Значения  $IC_{50}$  для метилированных по гидроксильным группам марчантинов A и B – соединений **53**, **54** – составляют 42.5 и 42.45 мкмоль соответственно, что свидетельствует о существенной роли в ингибировании NO-незамещенных гидроксильных групп. Тем не менее, риккардины A и F **49**, **51**, имеющие одну метоксигруппу в 11-м и 1'-положении, демонстрируют высокую ингибирующую активность (2.5 и 5 мкмоль соответственно). Возможно, это объясняется совокупностью структурных особенностей риккардинов: свободной гидроксильной группой в положении C-13', C14–C12'-бифенильной связью и метоксигруппой в положении C-11 или C-1'.



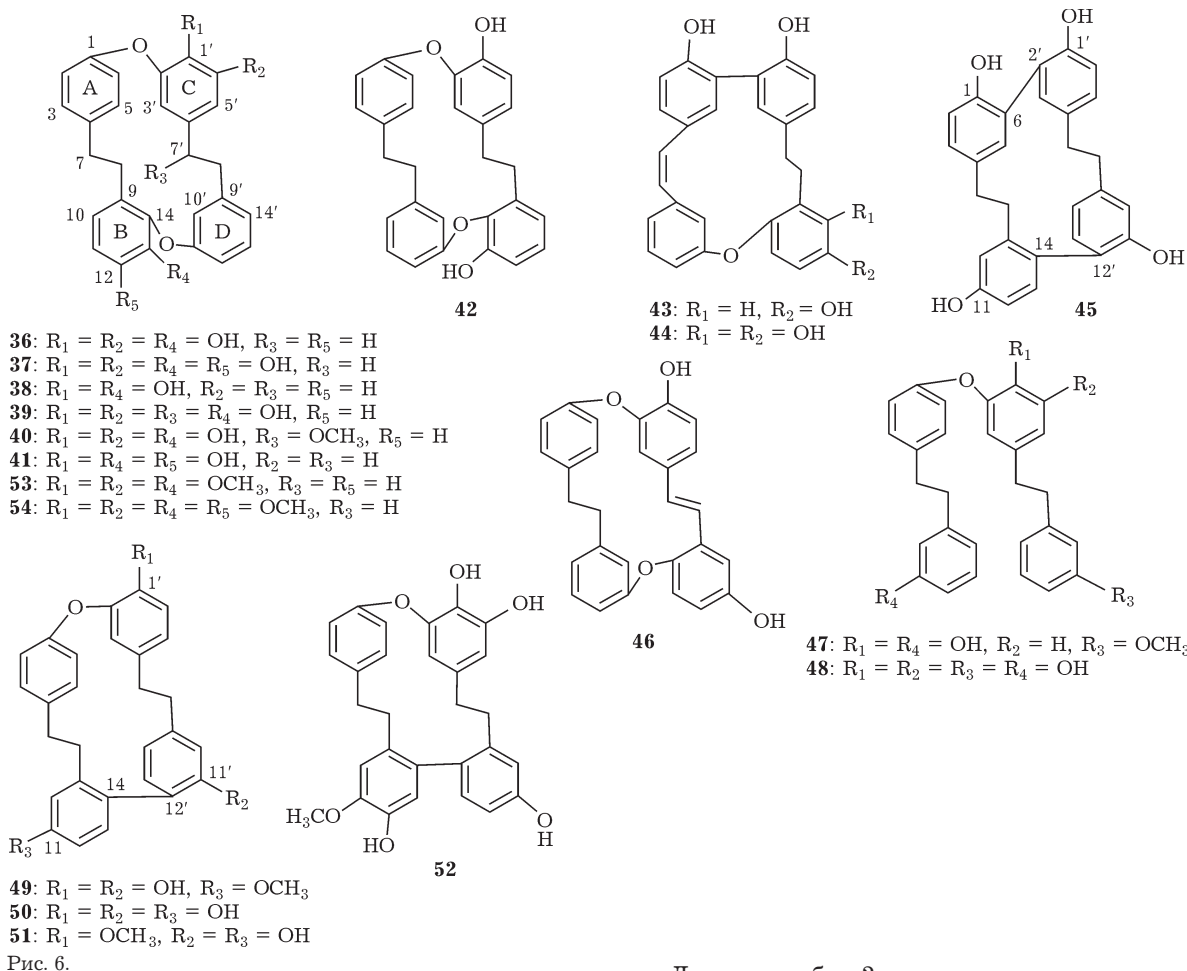


ТАБЛИЦА 2

Значения  $IC_{50}$  для соединений **36–54**, мкмоль

Соединение	Название	$IC_{50}$
<b>36</b>	Марчантин А	1.44
<b>37</b>	Марчантин В	41
<b>38</b>	Марчантин С	13.28
<b>39</b>	Марчантин D	10.18
<b>40</b>	Марчантин E	62.16
<b>41</b>	Марчантин H	15.34
<b>42</b>	Изомарчантин С	>100
<b>43</b>	Изоплагиочин А	>100
<b>44</b>	Изоплагиочин В	>100
<b>45</b>	Изоплагиочин D	14.32
<b>46</b>	Птичантол А	>100
<b>47</b>	11'-Метилловый эфир перрогетина E	49.85
<b>48</b>	Перрогетин F	7.42
<b>49</b>	Риккардин А	25
<b>50</b>	Риккардин С	>100
<b>51</b>	Риккардин F	5
<b>52</b>	Плагиочин А	9.07
<b>53</b>	Триметилловый эфир марчантина А	42.5
<b>54</b>	Тетраметилловый эфир марчантина В	42.45

Данные табл. 2 подтверждают правильность этих рассуждений на примере слабой ингибирующей активности риккардина **С 50**, значение  $IC_{50}$  для которого превышает 100 мкмоль. Следует отметить, что ингибирующая активность изоплагиочина **D 45** в три раза меньше активности риккардина **F 51**, хотя кольца В и D у них замещены одинаково. Возможно, причина этого кроется в бифенильной связи С6–С2' и гидроксильных группах в кольцах А и С, которые обуславливают жесткую конформацию соединения **45**.

#### Диарилгептаноиды и флавоноиды

Из 80 %-го водно-ацетонового экстракта *Alpinia officinarum*, китайского лекарственного растения, были выделены вещества **55–60**. Среди них способность к ингибированию iNOS проявляют соединения **57–59** [41] (рис. 7). Значения  $IC_{50}$  для этих соединений составили 33, 62 и 55 мкмоль соответственно. Пинобаксин **60** проявил низкую активность –

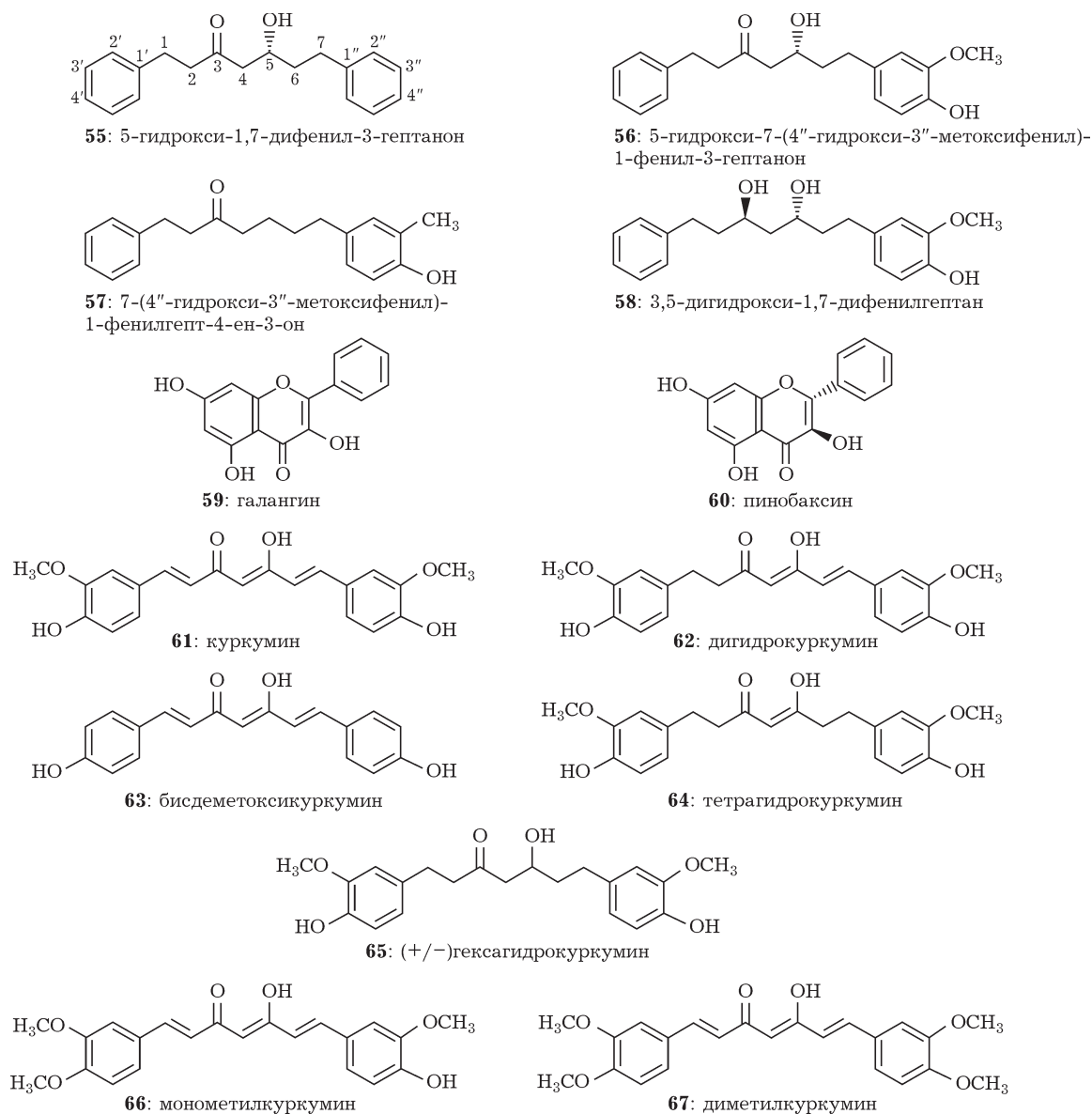


Рис. 7.

при концентрации 100 мкмоль он ингибировал 43,3 % продукции NO. Для оценки влияния остова соединения **57** на его NO-ингибирующую активность были проведены испытания с похожими соединениям **61–67**, в том числе с куркумином **61** и бисдеметоксикуркумином **63**, выделенными из *Curcuma zedoaria*. В результате исследований было показано, что ингибирование продукции оксида азота соединениями **55** (без гидрокси- и метоксизаместителей в ароматических кольцах), **56** (с одним замещенным кольцом) и **65** (где оба ароматических кольца имеют замес-

тители) мало отличаются друг от друга. Они ингибируют 31, 32 и 26 % продукции оксида азота соответственно.

Значения  $IC_{50}$  для соединений **61**, **63** различаются несущественно – 11 и 14 мкмоль соответственно. Это позволяет сделать вывод о том, что 3',3'-метокси- и 4',4''-гидроксизамещение в ароматических кольцах не имеет решающего значения для проявления соединениями такого типа NO-ингибирующей активности. Тем не менее, метилирование 4',4''-гидрокси групп приводит к незначительному снижению активности. Величина  $IC_{50}$  для со-



единений **61**, **66** и **67** составляет 11, 14 и 18 мкмоль соответственно. Из анализа строения диарилгептаноидов (см. рис. 7) можно сделать вывод о влиянии на ингибирующую активность соединений подобного типа количества двойных связей в алифатическом фрагменте, соединяющем ароматические кольца. Так, при уменьшении количества двойных связей при переходе от куркумина **61** к соединениям **62**, **64** и **65** снижается их ингибирующая способность:  $IC_{50}$  составляет 11, 25, 90 и более 100 мкмоль соответственно. Авторы предполагают, что по механизму действия эти соединения блокируют активацию NF- $\kappa$ B.

Как показано в работе [42], спиртовой экстракт листьев *Argimonia pilosa* Ledeb., содержащий большое количество полифенольных соединений, ингибировал продукцию NO в LPS-индуцированных макрофагах. Авторами были выделены пять соединений (**68–72**, рис. 8), в том числе три флавоноида (**68**, **71** и **72**) в свободной и гликолизированной формах. Как показали эксперименты, все выделенные вещества подавляют продукцию NO и в тестируемых концентрациях не проявляют цитотоксичности. Неоднократно ссылаясь на признанный факт, что фенольные соединения являются хорошими ловушками радикалов, а потому проявляют антиоксидантные свойства, авторы работы [42] для выяснения механизма действия соединений **68–72** проводили эксперименты как на LPS-индуцированных макрофагальных клетках, так и в присутствии донора NO – 4-этил-2-гидроксиамино-5-нитро-3-гексенамида (NOR3). Во всех экс-

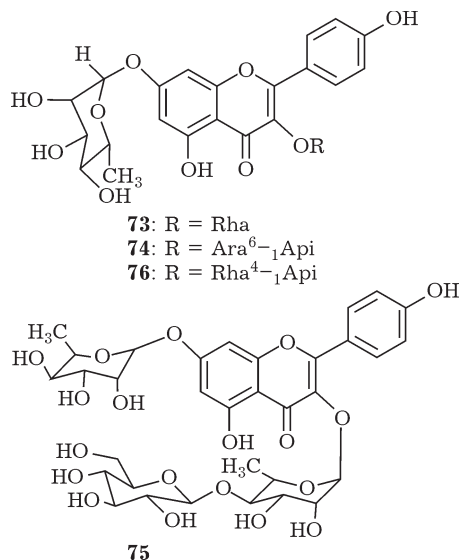


Рис. 9.

периментах наблюдалось снижение концентрации оксида азота. На основании последних фактов авторы предполагают, что соединения **68–72** могут выступать и как ингибиторы iNOS, и как “ловушки” образующегося NO.

В работе [43] из метанольного экстракта листьев дерева *Cinnamomum osmorphloeum* Kaneh, эндемика Тайваня, были выделены четыре гликозида флавонола кемпферола – соединения **73–76** (рис. 9). Они показали дозозависимое ингибирование NO, в LPS- и IFN- $\gamma$ -активированных макрофагальных клетках. Среди протестированных соединений наиболее сильным ингибитором оказалось соединение **74** – кемпферол-3-О- $\beta$ -D-апиофуранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-арабинофуранозил-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид. Для сравнения, при одной

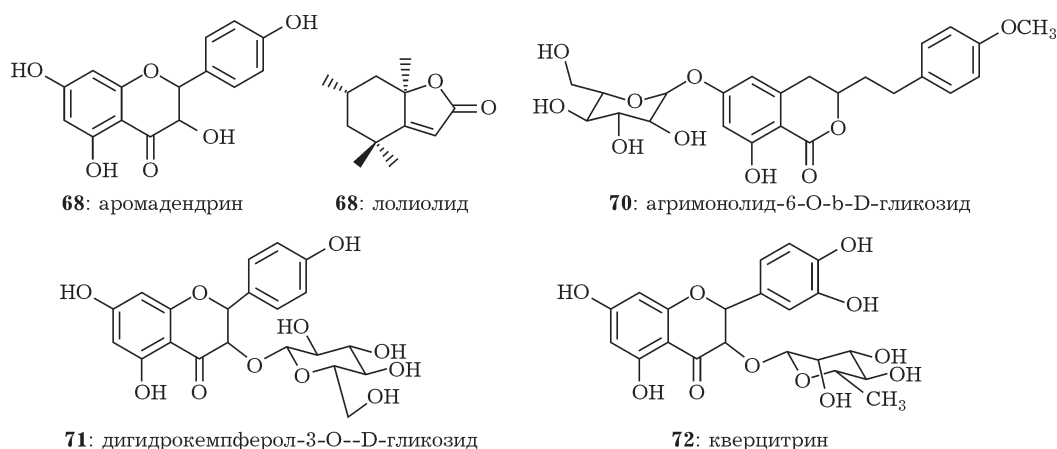


Рис. 8.

и той же концентрации (20 мкмоль) соединения **74** ингибирует продукцию NO на 69 %, в то время как соединение **75** – лишь на 9 %. Величина IC<sub>50</sub> для составила 40, 15 и 20 мкмоль для соединений **73**, **74** и **76** соответственно. Согласно проведенным исследованиям, выделенные гликозиды можно проранжировать в порядке уменьшения ингибирующей способности продукции NO следующим образом: **74** > **76** > **73** > **75**. Авторы статьи не обсуждают корреляцию “структура – свойство”. Однако при сравнении строения соединений **73–76**, отличающихся друг от друга строением гликозидного остатка R в 3-м положении, можно отметить, что самое активное соединение **74** содержит в остатке два фуранозных цикла, соединение **76** – один фуранозный цикл (апифуранозил, как и в соединении **74**), а наименее активные в этом ряду соединения **73**, **75** содержат в радикале только пиранозные остатки.

Из экстрактов *Angelica furcijuga*, известного лекарственного растения, широко применяемого в народной медицине Японии в качестве гепатопротекторного, противовоспалительного, противоаллергического и гипотензивного средства, выделено более 50 соединений, часть метаболитов с кумариновым остовом (**77–84**) и диацетиленовые производные **85**, **86** (рис. 10) прошли испытания на iNOS-ингибирующую активность в LPS-активированных макрофагах [44].

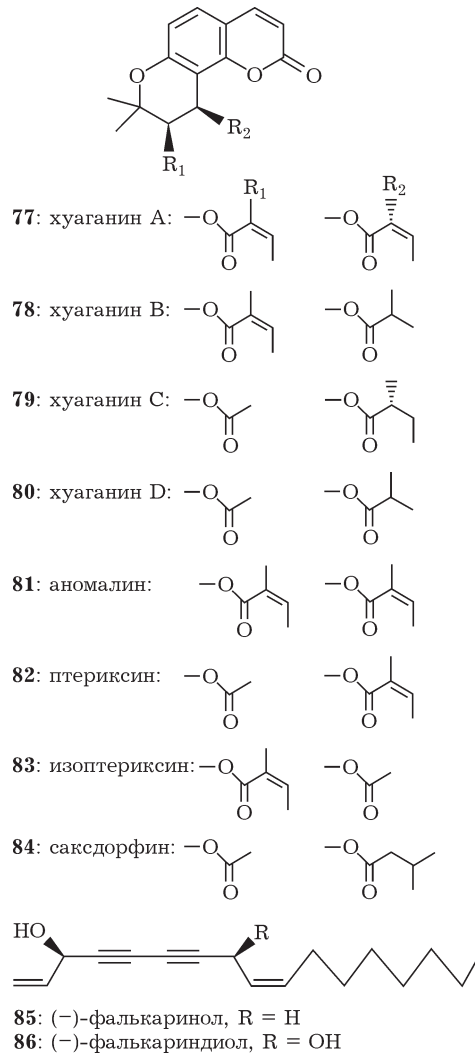


Рис. 10.

ТАБЛИЦА 3

NO-ингибирующий эффект компонентов метанольного экстракта корней *Angelica furcijuga* **77–86** относительно L-NMMA

Соединение	Ингибирование, %			IC <sub>50</sub> , мкмоль
	1 мкмоль	10 мкмоль	30 мкмоль	
<b>77</b>	25.7±3.1	62.6±3.5	78.4±0.3	5.1
<b>78</b>	3.7±3.9	47.4±2.5	85.2±1.8	8.8
<b>79</b>	32.4±3.1	43.3±2.4	74.4±1.5	8.2
<b>80</b>	35.2±5.3	54.1±2.6	68.9±4.3	4.2
<b>81</b>	23.0±5.2	62.7±3.4	96.8±1.6	3.4
<b>82</b>	14.0±2.2	32.9±6.4	59.0±1.2	20
<b>83</b>	20.4±2.1	47.8±3.4	75.5±2.2	8.8
<b>84</b>	1.9±6.5	50.4±3.3	71.7±3.5	11
<b>85</b>	29.4±6.2	70.0±7.4	96.1±0.8	4.8
<b>86</b>	24.4±4.5	65.4±2.6	102.9±0.2	4.4
L-NMMA	4.4±2.0	17.7±2.8	52.3±1.5	28

Ингибирующая активность соединений **77–81, 83** достаточно высока:  $IC_{50} < 10$  мкмоль без цитотоксического эффекта (табл. 3). Исключения составляют птериксин **82** и саксдорфин **84**, для которых значения  $IC_{50}$  составляют 20 и 11 мкмоль соответственно. В качестве препарата сравнения использовался L-N<sup>G</sup>-мометиларгинин (L-NMMA), проявивший более низкую NO-ингибирующую активность.

#### ФУНКЦИОЛИЗОВАННЫЕ ПРИРОДНЫЕ АГЕНТЫ

Синтетические трансформации природных метаболитов являются ведущим мировым направлением создания новых лекарственных агентов и биологически активных веществ. На-

правленная модификация природного соединения, как правило, изменяет его нативные свойства и повышает биологическую активность. В контексте поиска селективных ингибиторов iNOS подобными примерами могут служить трансформации аминокислот, флавоноидов, тритерпеновых кислот.

#### Производные аминокислот

Использование в качестве ингибиторов различных форм NOS-соединений, структурно подобных аргинину, представляется весьма логичным, так как близкое сходство с аргинином (субстратом) определяет конкурентный механизм ингибирования между субстра-

ТАБЛИЦА 4

Аминокислотные ингибиторы различных форм NOS **87–99**

Соединение	<i>n</i>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Название
<b>87</b>	3	NH	NH <sub>2</sub>	L-N <sup>G</sup> -аргинин (субстрат)
<b>88</b>	3	NOH	NH <sub>2</sub>	L-N <sup>G</sup> -гидроксиаргинин (интермедиат)
<b>89</b>	3	NH	NHCH <sub>3</sub>	L-N <sup>G</sup> -мометиларгинин (L-NMMA)
<b>90</b>	3	NH	NHNO <sub>2</sub>	L-N <sup>G</sup> -нитроаргинин (L-NNA)
<b>91</b>	3	NH	NHNH <sub>2</sub>	L-N <sup>G</sup> -аминоаргинин
<b>92</b>	3	NH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	L-N <sup>G</sup> -этиларгинин
<b>93</b>	3	NH	NHCH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	L-N <sup>G</sup> -аллиларгинин
<b>94</b>	3	NH	NHOCH <sub>3</sub>	L-N <sup>G</sup> -метоксиаргинин
<b>95</b>	3	O	NH <sub>2</sub>	L-цитруллин (продукт)
<b>96</b>	3	NH	CH <sub>3</sub>	L-иминоэтилорнитин (L-NIO) [45]
<b>97</b>	3	NH	SCH <sub>3</sub>	S-метил-L-тиоцитруллин
<b>98</b>	3	NH	SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S-этил-L-тиоцитруллин
<b>99</b>	4	NH	CH <sub>3</sub>	L-иминоэтиллизин (L-NIL) [46, 47]

ТАБЛИЦА 5

$IC_{50}$  и  $K_i$  (константа ингибирования) для аминокислотных ингибиторов **89–99**

Соединение	$IC_{50}$ , мкмоль			$K_i$ , ммоль		
	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS	nNOS	eNOS
<b>89</b>	14	10	59	2.5	7.5	
<b>90</b>	7.6	0.52	0.5	8.7	0.2	
<b>91</b>				1.7	1.2	
<b>92</b>				~81	~66	
<b>93</b>				8.5	0.85	
<b>94</b>				20.5	6.0	
<b>95</b>	2.2	3.9				
<b>96</b>				34	1.2	11
<b>97</b>				17	0.5	24
<b>98</b>	5	61	138			
<b>99</b>	12	150	8420			

том и ингибитором за активный центр фермента. Сам L-аргинин в концентрации свыше 100 мкмоль является ингибитором конститутивной eNOS [10]. Многие его замещенные аналоги проявляют большую ингибирующую способность и в меньших концентрациях (табл. 4).

В целом, замещенные по азоту производные аргинина мало селективны в отношении изоформ NOS, и при введении в изолированные ткани и органы или *in vivo* оказывают блокирующий эффект и на конститутивные NOS, и на iNOS (табл. 5).

В табл. 5 приведены значения  $IC_{50}$  и/или  $K_i$  для ингибиторов трех или двух изоформ NOS, полученные авторами [48]. В соответствии с этими значениями получен ряд потенциальных ингибиторов iNOS: L-N<sup>G</sup>-аминоаргинин **91** > L-N<sup>G</sup>-метиларгинин (L-NMMA) **89** > L-N<sup>G</sup>-гидроксиаргинин > L-N<sup>G</sup>-аллиларгинин **93** = L-N<sup>G</sup>-нитроаргинин (L-NNA) **90** >> L-N<sup>G</sup>-метоксиаргинин **94** > L-N<sup>G</sup>-этиларгинин **92**. В то время как для nNOS ряд выглядит следующим образом: L-N<sup>G</sup>-нитроаргинин (L-NNA) **90** > L-N<sup>G</sup>-метиларгинин (L-NMA) **89** > L-N<sup>G</sup>-аллиларгинин **93** > L-N<sup>G</sup>-аминоаргинин **91** > L-N<sup>G</sup>-метоксиаргинин **94** >> L-N<sup>G</sup>-гидроксиаргинин **88** > L-N<sup>G</sup>-этиларгинин **92** [48]. Это наглядным образом демонстрирует проблему селективности ингибиторов различных форм NOS.

Различную NOS-ингибирующую активность могут проявлять различные стереоизомеры одного и того же вещества. Например, в работе [49] был синтезирован аналог соеди-

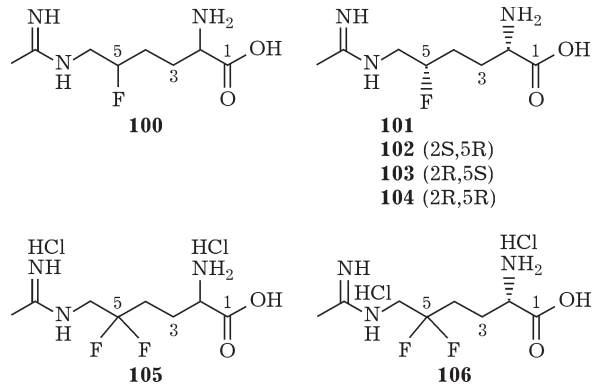


Рис. 11.

нения **99** – 6-(иминоэтил)-5-фтор-D,L-лизин **100** (рис. 11).

Из табл. 6 видно, что ингибирование iNOS соединением **99** и рацемической смесью соединений **100** сопоставимо. В то же время результаты испытаний индивидуальных стереоизомеров **101–104** показали, что наиболее сильным ингибитором iNOS является (2S,5S)-стереоизомер **101**. Остальные стереоизомеры амидина **100** и их рацемическая смесь значительно уступали ему как по активности, так и по селективности. В случае оптически неактивного соединения **105** и оптически чистого дифторамидина **106** последний оказался более активным в ингибировании NOS в сочетании с незначительной селективностью в отношении различных изоформ.

В работе [50] было синтезировано четыре оптически чистых аналога L-аргинина – син-(**107**) и анти-(**108**)-3,4-циклопропил-L-аргинин, син-(**109**) и анти-(**110**)-3,4-циклопро-

ТАБЛИЦА 6

$IC_{50}$  для соединений **99–106**

Соединение	Ингибирование NOS ( $IC_{50}$ , мкмоль)			Селективность	
	iNOS	eNOS	nNOS	iNOS/eNOS	iNOS/ nNOS
<b>99</b>	4.9±1.65	138	35	28	7
<b>100</b>	7.84	182	70.4	23	9
<b>101</b> (2S,5S)	2.36	81	21.7	34	9
<b>102</b> (2S,5R)	4.0*	28.2*	0.00*		
<b>103</b> (2R,5S)	47.8	374	311	8	7
<b>104</b> (2R,5R)	8.9*	6.52*	18*		
<b>105</b>	21.4	139	140	7	7
<b>106</b>	8.75	57.5	33.8	7	4

\* В процентах ингибирования при 10 мкмоль.

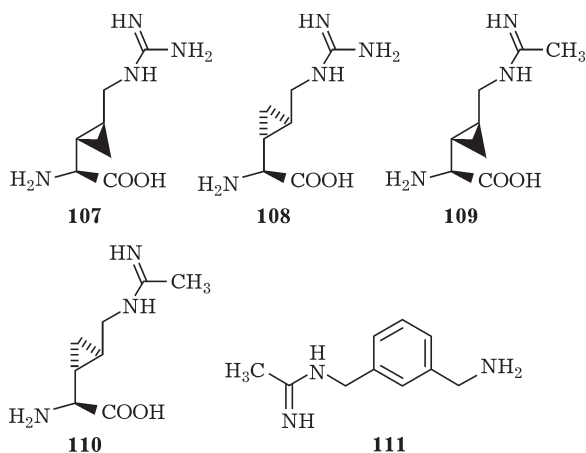


Рис. 12.

пил-N-(L-иминоэтил)-L-орнитин (рис. 12). Тестирование на NOS-ингибирующую активность показало, что соединение **107** не ингибирует ни одну из изоформ NOS, но при этом является слабым субстратом для NOS с  $K_m$  (константа Михаэлиса – Ментен), превышающей  $K_m$  L-аргинина ( $8.5 \pm 1$  и  $2.8 \pm 1.6$  мкмоль соответственно). Соединение **108** проявляет слабую ингибирующую способность ко всем трем изоформам NOS без какой-либо изоформной селективности. Син-3,4-циклопропил-N-(L-иминоэтил)-L-орнитин **109** показал себя как конкурирующий ингибитор всех изоформ NOS, причем степень ингибирования iNOS возрастала со временем инкубации. В то же время селективность соединения **109** относительно nNOS оказалась приблизительно в пять раз выше по сравнению с селективностью известного ингибитора iNOS 1400 W(N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин) **111** [51] (табл. 7). Анти-3,4-циклопропил-N-(L-иминоэтил)-L-орнитин **110** оказался слабым конкурирующим ингибитором конститутивных изоформ NOS и слабым связывающим ингибитором iNOS. Анализ зависимости “структура – активность” показывает, что при переходе от соединений **107**, **108** к веществам **109**, **110**, при замене аминогруппы в гуанидиновом фрагменте на метил происходит повышение NOS-ингибирующей активности (такой же структурный фрагмент содержится в известном NOS-ингибиторе **111**). Кроме того, син-изомер **109** по отношению к антиизомеру **110** проявляет более высокую активность и селективность по отношению NOS.

ТАБЛИЦА 7

Селективность соединений **109**, **110** и аמידина **111**

Соединение	Селективность	
	nNOS/iNOS	eNOS/iNOS
<b>109</b>	109	59
<b>110</b>	19	13
1400 W ( <b>111</b> )	22	382

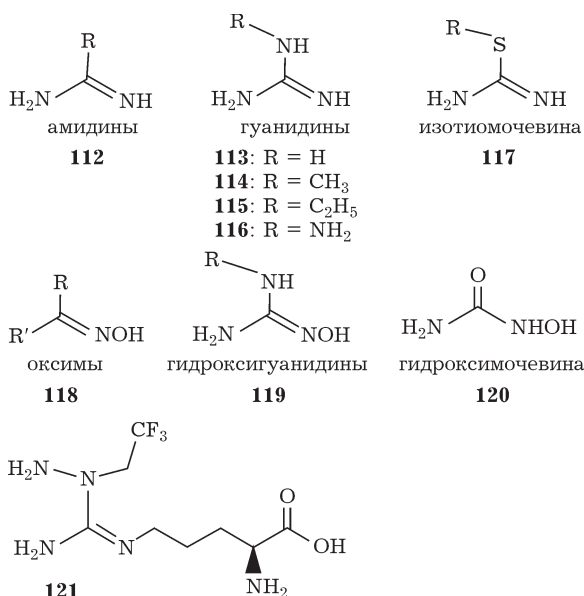


Рис. 13.

Аргинин и его аналоги могут рассматриваться как производные гуанидина **113** (рис. 13). Гуанидиновый фрагмент аргинина необходим для связывания субстрата и фермента, поэтому соединения состава **112–120** являются потенциальными ингибиторами изоформ NOS.

Сам гуанидин **113** не является ни ингибитором, ни субстратом для различных форм NOS, в то время как метил-(**114**) и этилгуанидин **115** проявляют ингибирующую способность. Среди производных гуанидина наибольшей известностью пользуется аминогуанидин **116**, как одно из первых соединений, для которого была показана селективность в отношении ингибирования iNOS. В большинстве *in vitro* систем аминогуанидин **116** и L-N<sup>G</sup>-мометиларгинин (L-NMMA) **89** одинаково эффективны при ингибировании индуцибельной изоформы, но первый на порядок менее активен в отношении конститутивных форм. Многие N-аминогуанидины подавляют активность NOS [52]. Среди них следует отметить N<sup>G</sup>-амино-L-аргинин **91**, который является широко известным необратимым ингибитором

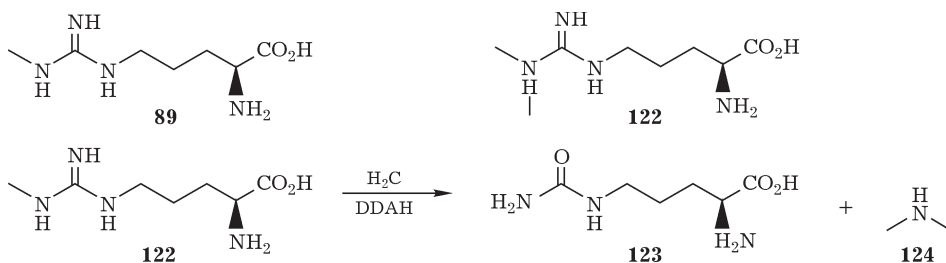


Схема 3.

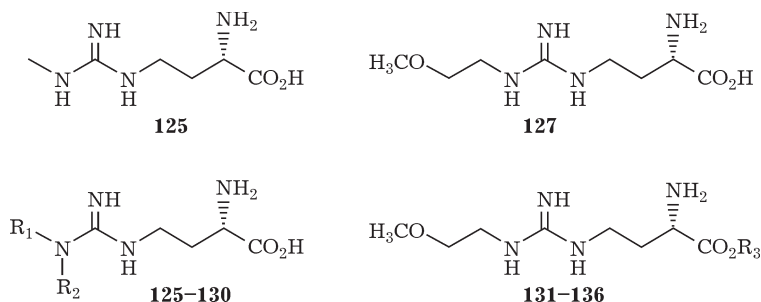


Рис. 14.

NOS. Он инактивирует NOS благодаря ковалентным взаимодействиям с гемовым кофактором [53]. Как показано в работе [54], этот механизм не является общим для всех ингибиторов NOS с N-аминогуанидиновым остовом. Так, N<sup>G</sup>-амино-N<sup>G</sup>-2,2,2-трифтороэтил-L-аргинин **121** (см. рис. 13) препятствует окислению НАДФН, тем самым предотвращая каталитическое окисление L-аргинина.

Другой подход к ингибированию NOS продемонстрирован в работе [55]. Как отмечают авторы статьи, метиларгинины – L-N<sup>G</sup>-метиларгинин (L-NMMA) **89** и ассиметричный диметиларгинин (ADMA) **122** (схема 3) – являются неселективными эндогенными ингибиторами NOS. Диметиларгинин диметиламиногидролаза (ДДАГ, DDAH) участвует в гидролизе метиларгининов **89** и **122** [56, 57], превращая

ингибиторы, например соединение **122**, в L-цитруллин **123** и диметиламин **124** (см. схему 3). Таким образом, подобрав ингибитор для ДДАГ, можно регулировать продукцию NO.

В работе [55] были синтезированы ингибиторы ДДАГ на основе 2-амино-4-(N<sup>G</sup>-метилгуанидино)бутановой кислоты **125** (рис. 14). Следует отметить, что все синтезированные в этой работе соединения практически не оказывают прямого влияния на различные формы NOS. По механизму действия этот подход относится к синтезу агентов, ингибирующих экспрессию NOS.

Путем варьирования заместителей у атома азота (R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>) в соединениях **125–130** (табл. 8) было выбрано соединение **127** как наиболее перспективное в плане ингибирования ДДАГ (IC<sub>50</sub> для него составило 189 мкмоль).

ТАБЛИЦА 8

IC<sub>50</sub> для соединений **125–130**, мкмоль

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Ингибирование при 1 мкмоль, %	IC <sub>50</sub>
<b>125</b>	Me	H	48	1510
<b>126</b>	Et	H	100	300
<b>127</b>	2-метоксиэтил	H	90	189
<b>128</b>	2-изопропоксиэтил	H	97	301
<b>129</b>	Me	Me	85	325
<b>130</b>	Пиперидинил		74	264



ТАБЛИЦА 9

IC<sub>50</sub> для соединений **131–136**, мкмоль

Соединение	R <sub>3</sub>	Ингибирование при 100 мкмоль, %	IC <sub>50</sub>
<b>131</b>	Me	75	96
<b>132</b>	Et	44	159
<b>133</b>	<i>n</i> -Pr	64	111
<b>134</b>	<i>n</i> -Bu	40	113
<b>135</b>	Bz	96	27
<b>136</b>	<i>i</i> -Pr	30	189

В свою очередь, на основе (S)-2-амино-4-(N'-(2-метоксиэтил)гуанидино)бутановой кислоты **127** были синтезированы ее эфиры **131–136**, среди которых наиболее активным для ингибирования ДДАГ оказался бензиловый эфир **135** (табл. 9).

В последнее время по причине недостаточной селективности аминокислотных ингибиторов большинство исследователей отходят от темплаты аминокислоты [58] и предлагают ингибиторы другого строения [59].

#### Халконы и кумарины

В работе [60] был синтезирован 3,4,5-триметокси-4'-фторхалкон **137** (рис. 15), который дозозависимо ингибирует продукцию NO *in vivo*, причем его цитотоксичность невысокая (IC<sub>50</sub> = 0.033 мкмоль). Авторы работы предполагают, что выделение NO уменьшается вследствие ингибирования экспрессии iNOS. Эксперименты *in vitro* показали, что халкон **137** является ингибитором ядерного фактора NF-κB. Результаты испытаний *in vitro* и *in vivo* коррелируют между собой. В качестве контроля использовался известный ингибитор iNOS 1400W (**111**) и дексаметазон (Dx).

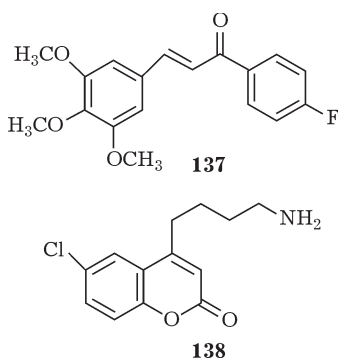


Рис. 15.

В работе [61] был синтезирован ряд соединений на основе кумаринового остова и изучена зависимость “структура – NOS-ингибирующая активность”. В результате лучшую селективность в ингибировании iNOS проявил кумарин **138** (см. рис. 15) со значением IC<sub>50</sub> = 0.095 мкмоль.

#### Тритерпеновые кислоты, фенольные соединения

В работе [62] было получено 20 производных 18β-глицирретовой кислоты, которые были протестированы на противовоспалительную и антиоксидантную активность. Секопроизводное **139** проявило наиболее высокую активность как ингибитор экспрессии iNOS (рис. 16).

Из метанольного экстракта *Spiraea prunifolia* был выделен пруниозид А **140** [63], который сам по себе не проявляет NOS-ингибирующей активности, но его ацетилированное производное **141** является ингибитором iNOS. В процессе установления строения соединения **140**, абсолютной конфигурации асимметрических атомов углерода авторами работы проводился гидролиз исходного соединения в продукты **142** и **144**. При анализе биологической активности соединений **142**, **144**

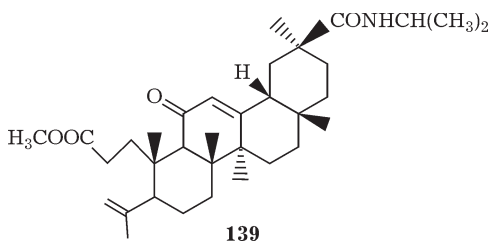


Рис. 16.

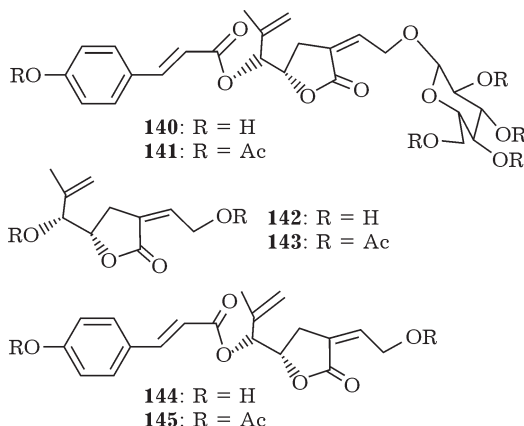


Рис. 17.

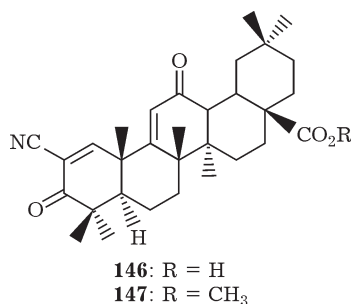


Рис. 18.

и соответствующих им ацетилированных производных **143** и **145** авторы работы [63] показали, что именно ацилированные производные проявляют iNOS-ингибирующую активность в LPS-индуцированных макрофагах (рис. 17).

В работе [64] было синтезировано и проверено на ингибирование iNOS 16 новых три-терпеноидов с олеонановым и урсоловым остовом. Среди полученных соединений наиболее эффективными оказались 2-циано-3,12-диоксоолеан-1,9(11)-диен-28-овая кислота (CDDO) **146** (рис. 18) и ее метиловый эфир (CDDO-Me) **147**. Значение IC<sub>50</sub> для этих соединений составило 0.0001 мкмоль. Как показано в статье [65], по механизму действия вещество **147** относится к ингибиторам переноса электронов.

#### ИНГИБИТОРЫ iNOS СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

##### Амидины

Среди амидинов стоит отметить N-(3-(аминометил)бензил)ацетамидин (1400W) **111**, который является высокоселективным ингибитором iNOS *in vitro* и *in vivo* [51]. Предыдущие исследования [45] показали, что он регенерируется после того, как iNOS полностью теряет свою активность, причем другие изоформы NOS при этом не фиксируются. Кроме того, в работе [66] было показано, что селективность ацетамидина 1400W **111** выше по сравнению с N-5-(L-иминоэтил)-L-орнитинном (L-NIO) **96**. В работе [67] были синтезированы аналоги ацетамидина **111**, среди которых наибольшую активность проявил N-бензилацетамидин **148** (рис. 19). Хотя для соединения **148** IC<sub>50</sub> = 0.20 мкмоль (для 1400W **111** оно равно 0.33 мкмоль), его селективность по

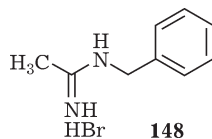


Рис. 19.

отношению к eNOS оказалась ниже, чем у ацетамидина **111** (1750 и 3300 соответственно). Механизм ингибирования амидиновыми инактиваторами объясняется первоначальным конкурентным связыванием с ферментом вместо субстрата L-аргинина, но из-за присутствующей в амидиновом фрагменте метильной группы пероксоинтермедиат гема не протонируется, препятствуя его превращению в оксоинтермедиат. Таким образом, механизм действия амидинов связан с их способностью вмешиваться в функции гема.

##### Азотсодержащие гетероциклические соединения

Показано [58], что значительную роль в окислительном домене iNOS играет аминокислотный остаток Glu<sup>371</sup>, который участвует в формировании водородных связей с гуанидиновым фрагментом. В связи с этим наиболее распространенный путь синтеза потенциальных ингибиторов iNOS заключается во внедрении в синтетические агенты цисамидинового фрагмента, который обеспечивает бидентантное взаимодействие с карбоксильной группой Glu<sup>371</sup>. Принимая во внимание эту фармакофорную группу был проведен скрининг активности некоторых 2-аминопиридинов **149–154** на основе остова 4-замещенного аминопиридина (табл. 10).

Видно, что алкилирование по атому C-6 (R<sub>2</sub>) увеличивает ингибирующую способность (метиламинопиридины **150**, **151**), при этом повышается и изоформная селективность соединений. N-метилирование приводит к потере ингибирующей активности (соединение **152**). Увеличение размера заместителя R<sub>1</sub> (аминопиридины **153**, **154**) также уменьшает активность соответствующих агентов. Таким образом, 4-метилзамещение оптимально для пиридинового кольца. Введение в уже имеющийся остов 4-пиперидинил карбаматного фрагмента приводит к образованию соедине-

ТАБЛИЦА 10

IC<sub>50</sub> для аминопиридинов **149–154**, мкмоль

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub>		
				iNOS	eNOS	nNOS
<b>149</b>	Me	H	H	0.12	0.30	0.11
<b>150</b>	Me	Me	H	0.045	0.17	0.098
<b>151</b>	Me	Pr	H	0.01	0.05	0.01
<b>152</b>	Me	Me	Me	86	30	>100d
<b>153</b>	Et	H	H	1.1	4.3	2.2
<b>154</b>	MeO	H	H	1.0	1.0	1.0

ТАБЛИЦА 11

IC<sub>50</sub> для соединений **155–161**, мкмоль

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub>		
			iNOS	eNOS	nNOS
<b>155</b>	Me	OEt	0.35	50	21
<b>156</b>	H	OEt	13	>100	>100
<b>157</b>	MeO	OEt	0.089	41	32
<b>158</b>	EtO	OEt	3.8	>100	96
<b>159</b>	MeO	Ph	0.53	100	28
<b>160</b>	MeO	4-ClPh	0.053	36	7.8
<b>161</b>	MeO	4-CNPh	0.071	>100	6.6

ния **155**, ингибирующая активность которого мало отличается от аминопиридина **149**, но изоформная селективность N-пиперидинил-аминопиридина выше (табл. 11). При замене R<sub>1</sub> в N-пиперидиниламинопиридине **155** на водород (соединение **156**) активность ингибирующего агента резко падает, что подтверждает предположение о необходимости наличия заместителя в положении 4 пиридинового кольца. Следует отметить, что, в отличие от наблюдаемой взаимосвязи “структура – активность” для серии аминопиридинов **149–154**, для серии N-замещенных аминопиридинов **151–157** увеличение размера заместителя R<sub>1</sub> не всегда приводит к падению активности. Так, в соединении **157** замена метила на метоксигруппу приводит к четырехкратному увеличению изоформной селективности по iNOS относительно аминопиридина **155**. Кроме того, возрастает селективность относительно eNOS и nNOS (в 450 и 350 раз соответственно). Дальнейшее увеличение размера R<sub>1</sub> (соединение **158**) приводит к 40-крат-

ному падению активности относительно аминопиридина **157**, обозначая тем самым лимитирующий размер заместителя.

Дальнейшая модификация соединения **157** проводилась путем варьирования заместителей в карбаматном кольце и привела к образованию аминопиридинов **159–161**. Среди них стоит отметить соединение **161**, которое отличается высокой ингибирующей активностью по отношению к iNOS и наилучшей изоформной селективностью.

В работе [68] при скрининге комбинаторной библиотеки на предмет возможных ингибиторов NOS, которые бы непосредственно взаимодействовали с гемом, были обнаружены 2-(имидазол-1-ил)-пиримидины. Они ингибируют димеризацию мономеров iNOS, предотвращая образование активной формы фермента. Имидазолилпиримидин **162** (рис. 20) среди протестированных пиримидинов оказался наиболее селективным.

Соединение с условным названием PH-302 **163** (см. рис. 20) также ингибирует iNOS, координи-

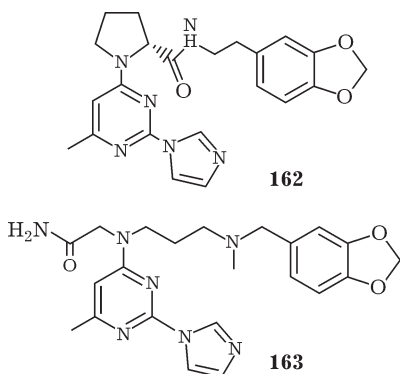


Рис. 20.

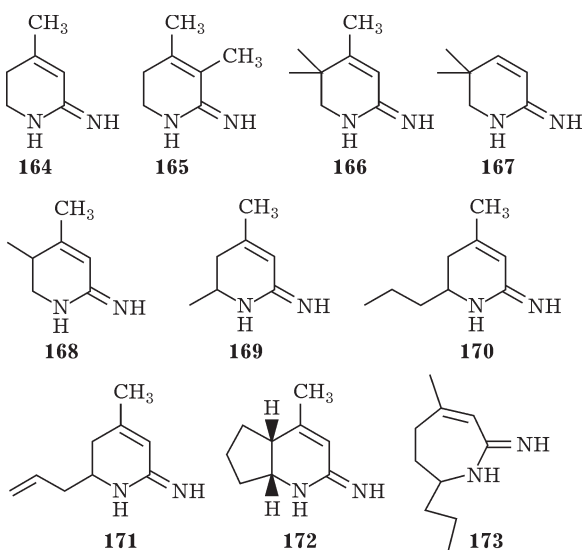


Рис. 21.

руясь с гемом мономерной (неактивной) формы фермента и препятствуя образованию активного димера iNOS [69]. Механизм ингибирования в этом случае – ингибирование цитохрома P450 3A4.

В работе [70] в качестве ингибиторов iNOS представлены  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные циклические амидины – 4-метил-5,6-дигидропиридин-2(1H)-имин **164** и его производные **165–173** (рис. 21). В экспериментах на мышях было показано, что соединения **166**, **167**, **170**, **171** и **173** проявили изоформную селективность eNOS/iNOS в диапазоне от 5 до 19.

В литературе часто встречаются попытки объединить в одном агенте свойства ингибитора нескольких ферментов. Так, iNOS совместно с c-Src (семейство протоонкогенных тирозинкиназ) играют роль основных регуляторов в процессе опухолеобразования. Идея создания одного агента, который был бы спо-

собен ингибировать оба этих фермента, безусловно, очень привлекательна. В этой связи в работе [71] был синтезирован ряд соединений на основе известного противоракового агента Bosutinib (SKI-606, 4-анилин-3-хинолин-карбонитрил **174**), находящегося на II стадии клинических испытаний, а так же 2-аминопиридина **175** и 2-аминотиазола **176**.

На основе этих темплат был синтезирован ряд соединений **177–181** (рис. 22), которые были протестированы на ингибирование c-Src (в качестве контроля использован сам Bosutinib **174**) и iNOS (путем сравнения с коммерчески доступными L-канаванином и 2-аминотиазолом **176**). К сожалению, большинство синтезированных соединений оказались активны только по отношению к одному из ферментов, хотя некоторые были способны ингибировать оба, но в различной степени (табл. 12).

Так, соединение **181** проявляет свойства сильного ингибитора и c-Src, и iNOS, а агенты **177**, **178**, **180** ингибируют только iNOS, причем значения  $IC_{50}$  для c-Src довольно высокие и составляют 0.076, 0.646 и 0.111 мкмоль соответственно. Обратная ситуация наблюдается для соединения **179** – оно хорошо ингибирует c-Src, но для iNOS  $IC_{50}$  составляет 313 мкмоль.

В работе [72] был синтезирован ряд новых 5-фенил-1H-пиррол-2-карбоксамидных производных. Эти соединения показали среднюю активность *in vitro* в отношении ингибирования nNOS и iNOS, в некоторых случаях (соединения **182**, **183**, рис. 23) были получены данные о некоторой селективности для iNOS. Эти соединения в экспериментах *in vivo* способствовали резкому уменьшению количества NO в цитозоле и митохондриях.

Определенную конформацию пирролидинового кольца в качестве основного блока использовали авторы работы [73] для получения селективных пирролидинсодержащих ингибиторов iNOS. Все соединения были получены из коммерчески доступного транс-4-гидрокси-L-пролина. Для оптимизации пирролидинового блока были проведены следующие превращения:

1) к 4-му углеродному атому пирролидинового кольца присоединен фрагмент (3-нитрогуанидино)гексановой кислоты (для структурного сходства с L-NNA **90**);

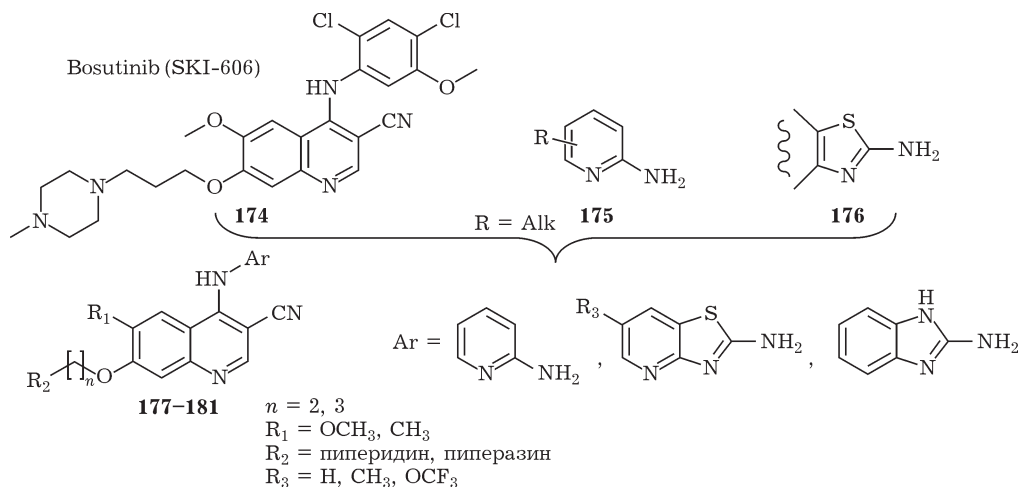


Рис. 22.

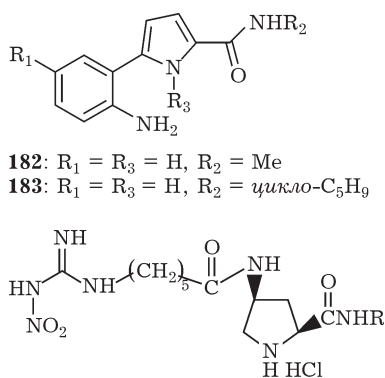


Рис. 23.

2) сохранена вторичная аминогруппа в положении 1 пирролидинового кольца;

3) через карбоксамидную группу присоединяли ароматические кольца с различными заместителями.

В результате был получен ряд соединений, среди которых следует отметить пирролидины **184–186** (см. рис. 23) в качестве перспективных ингибиторов iNOS: наряду с высокой ингибирующей активностью (2.36, 2.68, 2.5 мкмоль соответственно) они проявляют низкую цитотоксичность; для L-NNA **90** в этих же условиях  $\text{IC}_{50} = 14.74$  мкмоль.

#### НАИБОЛЕЕ ИЗВЕСТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ iNO

Следует отметить, что в большинстве анализируемых статей имеются определенные разночтения, затрудняющие интерпретацию результатов и касающиеся следующих аспектов:

ТАБЛИЦА 12

$\text{IC}_{50}$  для соединений **174–181** [71]

Соединение	$R_1$	$n$	$R_2$	Ar	c-Src, $\text{IC}_{50}$ , нмоль	iNOS, $\text{IC}_{50}$ , мкмоль
<b>177</b>	Me	3	N-Ме-пиперазин	2-пиридин	75.9	18.6
<b>178</b>	Me	3	N-Ме-пиперазин	2-(6-Ме-бензотиазол)	646	12.7
<b>179</b>	Me	3	Пиперидин	2-(6-Ме-бензотиазол)	15.4	313
<b>180</b>	Me	3	N-Ме-пиперазин	2-(6-трифлюорометокси-бензотиазол)	111	16.3
<b>181</b>	OMe	2	N-Ме-пиперазин	2-бензотиазол	9.23	218
Bosutinib <b>174</b>					12	–
L-канаванин <b>175</b>					–	60
2-аминотиазол <b>176</b>					–	18

1. Селективность относительно различных форм NOS: что считать селективностью – превышение активности одной изоформы по отношению к другой в 2, 10 или 100 раз?

2. Единицы оценки селективности ( $IC_{50}$ ,  $K_i$  или фармакологически эффективная доза).

3. Объект исследования (изолированные ферменты, клетки или *in vivo*) [26].

В связи с этим авторы работы [26] предлагают определять изоформную селективность потенциальных ингибиторов и разделять их на неселективные (превышение активности по отношению к другой изоформе менее чем в 10 раз), частично селективные (превышение в 10–50 раз) и селективные (более чем в 50 раз). В соответствии с этим авторами были протестированы наиболее известные ингибиторы различных форм NOS (рис. 24) в одних и тех же условиях (табл. 13).

Согласно данным табл. 13 и классификации ингибиторов по Альдертону, соединения **89**, **90** и **187** являются неселективными ингибиторами; агент **188**, аминогуанидин **116** и ацетамидный аналог аргинина L-NIL **99** можно отнести к частично селективным ингибиторам изоформ NOS. Высокой степенью селективности относительно iNOS отличается ингибитор 1400W **111**, но ввиду токсичности в больших концентрациях использование этого препарата в качестве терапевтического агента на людях неприемлемо, хотя и допустимо на животных моделях. В противоположность 1400W **111**, серосодержащие ацетамидные аминокислоты **189** и **190** не проявляют высокой токсичности, однако являются высокоэффективными ингибиторами iNOS, хотя их значения  $IC_{50}$  довольно высоки.

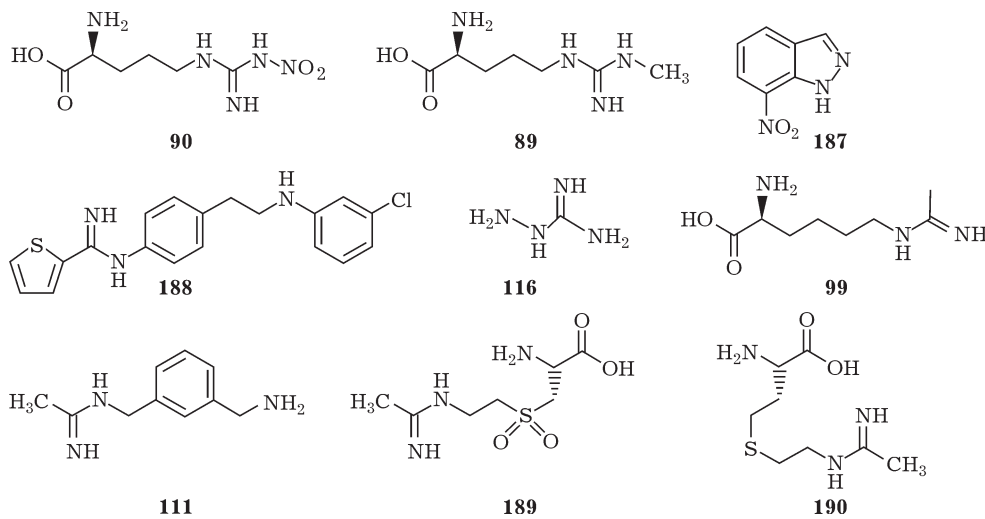


Рис. 24.

ТАБЛИЦА 13

Сравнение изоформной селективности наиболее известных ингибиторов iNOS

Ингибитор	$IC_{50}$ , мкмоль			Селективность		
	iNOS	nNOS	eNOS	iNOS/nNOS	iNOS/eNOS	nNOS/eNOS
L-NNA <b>90</b>	3.1	0.29	0.35	0.09	0.11	1.2
L-NMMA <b>89</b>	6.6	4.9	3.5	0.7	0.5	0.7
7-NI <b>187</b>	9.7	8.3	11.8	0.9	1.2	1.4
ARL-17477 <b>188</b> [74]	0.33	0.07	1.6	0.2	5	23
Аминогуанидин <b>116</b>	31	170	330	5.5	11	1.9
L-NIL <b>99</b>	1.6	37	49	23	49	1.3
1400W <b>111</b>	0.23	7.3	1000	32	>4000	>130
GW273629 <b>189</b> [75]	8.0	630	1000	78	>125	>1.6
GW274150 <b>190</b>	1.4	145	466	104	333	3.2



**ВЫВОДЫ**

На основании анализа современного состояния проблемы поиска селективных ингибиторов iNOS можно сделать следующие выводы:

1. На ингибирующую способность iNOS протестировано огромное количество различных классов соединений.

2. Наиболее полно изучены аминокислотные ингибиторы благодаря их сходству с субстратом (L-аргинином) и возможному протеканию конкурентного ингибирования с субстратом.

3. Модификация потенциальных ингибиторов проводится с использованием методов комбинаторной химии и последующей проверки полученных соединений.

4. В случае природных соединений часто имеются сведения об активности только самих природных объектов, так как их химическая модификация бывает затруднена из-за малой доступности этих соединений и многоступенчатости их тотального синтеза.

5. Наиболее перспективные ингибиторы iNOS – полусинтетические и синтетические соединения.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Furchgott R. F., Zavadski J. W. // *Nature*. 1980. Vol. 286. P. 373–376.
- Малкоч А. В., Майданник В. Г., Курбанова Э. Г. // *Нефрология и диализ*. 2000. Т. 2, № 1–2. С. 69–75.
- Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S. // *Nature*. 1987. Vol. 327. P. 534–526.
- Garthwaite J., Charles S. L., Chess-Williams R. // *Nature*. 1988. Vol. 336. P. 385–388.
- Gillespie J. S., Liu X., Martin W. // *Br. J. Pharmacol.* 1989. Vol. 98. P. 1080–1082.
- Nathan C., Hibbs J. B. // *Curr. Opin. Immunol.* 1991. No. 3. P. 65–70.
- Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. // *Nature*. 1987. No. 327. P. 524–526.
- Nakaki T. // *Keio J. Med.* 1994. Vol. 43. P. 15–26.
- Culotta E., Koshland D. E. // *Science*. 1992. Vol. 258. P. 1862–1865.
- Граник В. Г., Григорьев Н. Б. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2002. № 11. С. 1819–1841.
- Kerwin J. F., Lancaster J. R., Feldman P. L. // *J. Med. Chem.* 1995. Vol. 38, No. 22. P. 4343–4362.
- Stamler J. S. // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 931–936.
- Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, No. 31. P. 23106–23110.
- S. Moncada, Palmer R. M. J., Higgs E. A. // *Pharmacol. Rev.* 1991. Vol. 43. P. 109–142.
- Ванин А. Ф. // *Биохимия*. 1998. Вып. 63, № 7. С. 924–938.
- Gow A. J., Stamler J. S. // *Nature*. 1998. Vol. 391, No. 6663. P. 169–173.
- Schmidt H. H., Walter U. // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 919–925.
- Nitric oxide donors. For pharmaceutical and biological applications / P. G. Wang, T. B. Cai, N. Taniguchi (Eds.). Wiley, 2004. 390 p.
- Nathan C., Xie Q.-W. // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 915–918.
- Менщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. М.: Слово, 2006. 556 с.
- Forstermann U., Closs E. I., Pollock J. S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. // *Hypertension*. 1994. Vol. 23. P. 1121–1131.
- Busse R., Mulsch A. // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 275. P. 87–90.
- Solhaug M. J., Balleve L. D., Guignard J.-P. // *Pediatr. Nephrol.* 1996. Vol. 10. No. 4. P. 529–539.
- Geller D. A., Billiar T. R. // *Cancer Metastasis Rev.* 1998. Vol. 17. P. 7–23.
- Shirato M., Sakamoto T., Uchida Y., Nomura A., Ishii Y., Iijima H., Goto Y., Hasegawa S. // *Biochem. J.* 1998. Vol. 333. P. 795–799.
- Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. // *Biochem. J.* 2001. P. 593–615.
- Griffith O. W., Stuehr D. J. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. Vol. 57. P. 707–736.
- Marletta M. A. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, No. 17. P. 12231–12234.
- Groves J. T., Watanabe Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. Vol. 110. P. 8443.
- Yamaguchi K., Watanabe Y., Morishima I. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 115. P. 4058.
- Huang H., Hah J.-M., Silverman R. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123, No. 11. P. 2674–2676.
- Tantillo D. J., Fukuto J. M., Hoffman B. M., Silverman R. B., Houk K. N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122, No. 3. P. 536–537.
- Babu B. R., Griffith O. W. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998. Vol. 2. P. 491–500.
- Abdel-Halim O. B., Morikawa T., Ando S., Matsuda H., Yoshikawa M. // *J. Nat. Prod.* 2004. Vol. 67, No. 7. P. 1119–1124.
- Jin H. Z., Lee J. H., Lee D., Hong Y. S., Kim Y. H., Lee J. J. // *Phytochem.* 2004. Vol. 65, No. 15. P. 2247–2253.
- Matsuda H., Toguchida I., Ninomiya K., Kageura T., Morikawa T., Yoshikawa M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. Vol. 11, No. 5. P. 709–715.
- Matsuda H., Morikawa T., Ando S., Oominami H., Murakami T., Kimura I., Yoshikawa M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2004. Vol. 12, No. 11. P. 3037–3046.
- Pan M.-H., Chang Y.-H., Tsai M.-L., Lai C.-S., Ho S.-Y., Badmaev V., Ho C.-T. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56, No. 16. P. 7502–7509.
- Zhang X., Xu J.-K., Wang J., Wang N.-L., Kurihara H., Kitanaka S., Yao X.-S. // *J. Nat. Prod.* 2007. Vol. 70, No. 1. P. 24–28.
- Harinantenaina L., Quang D. N., Takeshi N., Hashimoto T., Kohchi C., Soma G. I., Asakawa Y. // *J. Nat. Prod.* 2005. Vol. 68, No. 12. P. 1779–1781.
- Matsuda H., Ando S., Kato T., Morikawa T., Yoshikawa M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. Vol. 14, No. 1. P. 138–142.
- Taira J., Nanbu H., Ueda K. // *Food Chem.* 2009. Vol. 115, No. 4. P. 1221–1227.
- Fang S.-H., Rao Y. K., Tzeng Y.-M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. Vol. 13, No. 7. P. 2381–2388.
- Yoshikawa M., Nishida N., Ninomiya K., Ohgushi T., Kubo M., Morikawa T., Matsuda H. // *Bioorg. Med. Chem.* 2006. Vol. 14, No. 2. P. 456–463.

- 45 Fast W., Nikolic D., Van Breemen R. B., Silverman R. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121, No. 5. P. 903–916.
- 46 Wolff D. J., Luberskie A., Gauld D. S., Neulander M. J. // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 350. P. 325–334.
- 47 Moore W. M., Webber R. K., Jerome G. M., Tjoeng F. S., Misko T. P., Currie M. G. // *J. Med. Chem.* 1994. Vol. 37. P. 3886–3888.
- 48 Komori Y., Wallage G. C., Fukuto J. M. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. Vol. 315. P. 213–218.
- 49 Hallinan E. A., Hagen T. J., Bergmanis A., Moore W. M., Jerome G. M., Spangler D. P., Stevens A. M., Shieh H. S., Manning P. T., Pitzele B. S. // *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47, No. 4. P. 900–906.
- 50 Fishlock D., Perdicakis B., Montgomery H. J., Guillemette J. G., Jervis E., Lajoie G. A. // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. Vol. 11, No. 6. P. 869–873.
- 51 Garvey E. P., Oplinger J. A., Furfine E. S., Kiff R. J., Laszlo F., Whittle B. J. R., Knowles R. G. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 4959–4963.
- 52 Wolff D. J., Gauld D. S., Neulander M. J., Southan G. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. Vol. 283. P. 265–273.
- 53 Vuletic J. L., Lowe E. R., Jianmongkol S., Kamada Y., Kent U. M., Bender A. T., Demady D. R., Hollenberg P. F., Osawa Y. // *Mol. Pharmacol.* 2002. Vol. 62. P. 110–118.
- 54 Martin N. I., Beeson W. T., Woodward J. J., Marletta M. A. // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, No. 4. P. 924–931.
- 55 Rossiter S., Smith C. L., Malaki M., Nandi M., Gill H., Leiper J. M., Vallance P., Selwood D. L. // *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48, No. 14. P. 4670–4678.
- 56 Smith C. L., Birdsey G. M., Anthony S., Arrigoni F. I., Leiper J. M., Vallance P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 308. P. 984–989.
- 57 Achan V., Broadhead M., Malaki M., Whitley G. St. J., Leiper J. M., MacAllister R. J., Vallance P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. Vol. 23. P. 1455–1459.
- 58 Connolly S., Aberg A., Arvai A., Beaton H. G., Cheshire D. R., Cook A. R., Cooper S., Cox D., Hamley P., Mallinder P., Millichip I., Nicholls D. J., Rosenfeld R. J., St-Gallay S. A., Tainer J., Tinker A. C., Wallace A. V. // *J. Med. Chem.* 2004. Vol. 47, No. 12. P. 3320–3323.
- 59 Beaton H. G., Hamley P., Nicholls D. J., Tinker A. C., Wallace A. V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000. Vol. 10, No. 11. P. 1023–1026.
- 60 Rojas J., Paya M., Devesa I., Dominguez J. N., Ferrandiz M. L. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2003. Vol. 368. P. 225–233.
- 61 Jackson S. A., Sahni S., Lee L., Luo Y., Nieduzak T. R., Liang G., Chiang Y., Collar N., Fink D., He W., Laoui A., Merrill J., Boffey R., Crackett P., Rees B., Wong M., Guilloteau J.-P., Mathieu M., Rebello S. S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. Vol. 13, No. 8. P. 2723–2739.
- 62 Maitraie D., Hung C.-F., Tu H.-Y., Liou Y.-T., Wei B.-L., Yang S.-C., Wang J.-P., Lin C.-N. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. Vol. 17, No. 7. P. 2785–2792.
- 63 Oh H., Shin H., Oh G.-S., Pae H.-O., Chai K.-Y., Chung H.-T., Lee H.-S. // *Phytochem.* 2003. Vol. 64, No. 6. P. 1113–1118.
- 64 Honda T., Rounds B. V., Bore L., Finlay H. J., Favalaro F. G., Suh Jr. N., Wang Y., Sporn M. B., Gribble G. W. // *J. Med. Chem.* 2000. Vol. 43. P. 4233–4246.
- 65 Samudio I., Konopleva M., Pelicano H., Huang P., Frolova O., Bornmann W., Ying Y., Evans R., Contractor R., Andreeff M. // *Mol. Pharm.* 2006. Vol. 69, No. 4. P. 1182–1193.
- 66 Zhu Y., Nikolic D., Van Breemen R. B., Silverman R. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, No. 3. P. 858–868.
- 67 Maccallini C., Patruno A., Besker N., Ali J. I., Ammazalorso A., De Filippis B., Franceschelli S., Giampietro L., Pesce M., Reale M., Tricca M. L., Re N., Felaco M., Amoroso R. // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52. P. 1481–1485.
- 68 Davey D. D., Adler M., Arnaiz D., Eagen K., Erickson S., Guilford W., Kenrick M., Morrissey M. M., Ohlmeyer M., Pan G., Paradkar V. M., Parkinson J., Polokoff M., Saionz K., Santos C., Subramanyam B., Vergona R., Wei R. G., Whitlow M., Ye B., Zhao Z., Devlin J. J., Phillips G. // *J. Med. Chem.* 2007. Vol. 50, No. 6. P. 1146–1157.
- 69 Hutzler J. M., Melton R. J., Rumsey J. M., Schnute M. E., Locuson C. W., Wienkers L. C. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. Vol. 19, No. 12. P. 1650–1659.
- 70 Kawanaka Y., Kobayashi K., Kusuda S., Tatsumi T., Murota M., Nishiyama T., Hisaichi K., Fujii A., Hirai K., Nishizaki M., Naka M., Komeno M., Nakai H., Toda M. // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. Vol. 11, No. 5. P. 689–702.
- 71 Cao X., You Q.-D., Li Z.-Y., Guo Q.-L., Shang J., Yan M., Chern J.-W., Chen M.-L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, No. 11. P. 5890–5898.
- 72 Lypez Cara L. C., Camacho M. E., Carriyn M. D., Tapias V., Gallo M. A., Escames G., Acuca-Castroviejo D., Espinosa A., Entrena A. // *Eur. J. Med. Chem.* 2009. Vol. 44, No. 6. P. 2655–2666.
- 73 Liu F.-Z., Fang H., Zhu H.-W., Wang Q., Yang Y., Xu W.-F. // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, No. 1. P. 578–585.
- 74 Zhang Z. G., Reif D., Macdonald J., Tang W. X., Kamp D. K., Gentile R. J., Shakespeare W. C., Murray R. J., Chopp M. // *J. Cer. Blood Flow & Metabolism.* 1996. Vol. 16. P. 599–604.
- 75 Young R. J., Beams R. M., Carter K., Clark H. A. R., Coe D. M., Chambers C. L., Davies P. I., Dawson J., Drysdale M. J., Franzman K. W., French C., Hodgson S. T., Hodson H. F., Kleanthous S., Rider P., Sanders D., Sawyer D. A., Scott K. J., Shearer B. G., Stocker R., Smith S., Tackley M. C., Knowles R. G. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000. Vol. 10, No. 6. P. 597–600.