

Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы

Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. В 1962 г. Gross J и Lapierre С впервые была обнаружена металлопротеиназа. С тех пор было охарактеризовано более 20 ферментов этого семейства, а также подробно изучены их функции. Металлопротеиназы участвуют в регуляции кровяного давления, развитии и ремоделировании клеточного матрикса, обезболивании, рассеянном склерозе, процессе свертывания крови, заживления ран, в процессах опухолевой трансформации и метастазирования и др. Настоящий обзор посвящён рассмотрению представлений о структуре матриксных металлопротеиназ, механизме их действия, а так же эндогенным и экзогенным ингибиторам матриксных металлопротеиназ. Особый акцент сделан на анализе подходов к дизайну синтетических ингибиторов матриксных металлопротеиназ и их активности. Представленный обзор демонстрирует перспективность конструирования новых селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ.

Ключевые слова: протеиназы; металлопротеиназы; матриксные металлопротеиназы; ММП; тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ; ингибиторы матриксных металлопротеиназ

Для цитирования:

Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 3–16. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10040.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors

Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYu

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Metalloproteinase was discovered by Gross and Lapierre in 1962 for the first time. Since then, more than 20 enzymes of this family have been characterized, and their functions have been studied in detail. Metalloproteinases take part in blood pressure regulation, the cell matrix extension and remodeling, anesthesia, multiple sclerosis, blood coagulation, wound healing, tumor transformation and metastasis, etc. This review covers structure of matrix metalloproteinases, their mechanism of action, as well as MMP's endogenous and exogenous inhibitors. A special place is occupied by analysis of approaches to matrix metalloproteinases synthetic inhibitors and their activity. This review demonstrates the perspectivity of new selective matrix metalloproteinase inhibitors design.

Keywords: proteinases; metalloproteinases; matrix metalloproteinases; MMP; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; inhibitors of matrix metalloproteinases

For citations:

Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYu. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:3–16. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10040.

Введение

Металлопротеиназы впервые были обнаружены учёными в первой половине 20 века. Позднее стало известно, что они принимают участие во многих процессах в организме, таких как повышение и понижение артериального давления, болезнь Крона, ревматоидный артрит и др. Металлопротеиназы можно разделить на подгруппы, такие как семейство метцинцина, цинк-зависимые протеазы, которые включают матриксные металлопротеиназы (ММП), ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), а также дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS) [1]. Металлопротеиназы относятся к семейству ферментов из класса гидролаз, способных разрушать пептидную связь между аминокислотами в белках. Они также включают в себя аспарагиновые протеиназы, сериновые протеиназы и цистеиновые протеиназы. Все 4 класса металлопротеиназ способны катализировать гидролиз пептидной связи [2]. Все цинксодержащие металлопротеиназы содержат в активном центре двухвалентный атом цинка (Zn^{2+}). При гидролизе пептидной связи тетраэдрический ион Zn^{2+} координируется с тремя донорными группами из

фермента и молекулой воды. На рис. 1 [3] представлено схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи матриксными металлопротеиназами (ММП). ММП являются основным классом цинксодержащих металлопротеиназ. Им и посвящён данный обзор.

Матриксные металлопротеиназы

Семейство цинксодержащих металлопротеиназ в большинстве своём состоит из матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Своё название они получили из-за способности специфически гидролизовать белки ВКМ. Они принимают участие в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, а также в процессах опухолевой трансформации и метастазирования. Активно изучается роль ММП при ревматоидных артритах, остеоартритах, эндометриозе, аневризмах аорты, периодонтитах, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе и язвообразовании [4, 5].

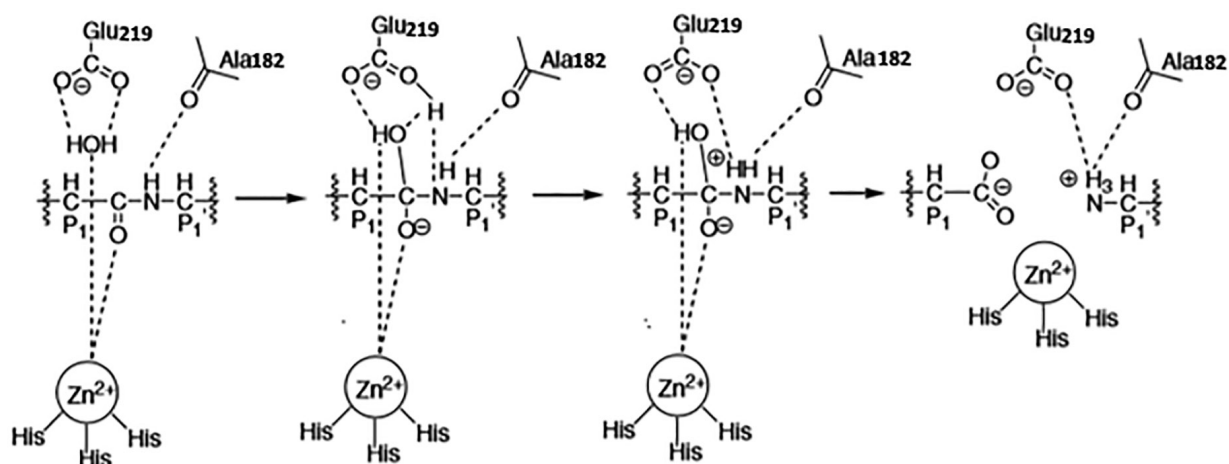


Рис. 1. Схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи в присутствии иона цинка Zn^{2+} ММП. Ион цинк, входящий в активный центр ММП, координирован тремя остатками гистидина (His). Частично обозначены аминокислоты Glu219 и Ala182, которые участвуют в процессе гидролиза [3].

Одно из самых ранних описаний ММП датируется 1949 г. [6]. В нем были описаны деполимеризующие ферменты, которые, как было предположено, могли способствовать росту опухоли, делая строму соединительной ткани, а также мелкие кровеносные сосуды более рыхлыми. 13 лет спустя, в 1962 году, *Gross J* и *Lapierre C* [6] впервые обнаружили коллагеназу во время изучения деградации тройного спирального коллагена при метаморфозе хвоста головастика. Коллаген расщепляли с помощью фермента, известного как промежуточная коллагеназа. В 1968 г. этот фермент в неактивной форме, называемой про-ММП (также называемый зимогеном ММП), был выделен из хвоста головастика и человеческой кожи [6]. Позже он был найден у позвоночных, насекомых (*Drosophila melanogaster*), нематод (*Caenorhabditis elegans*), гидр (*Hydra vulgaris*) и растений (*Arabidopsis*) [6].

Позднее были обнаружены и охарактеризованы другие ММП. Однако, как оказалось, многие вновь открытые ферменты были уже известны ранее или были найдены одновременно не связанными друг с другом группами учёных. Это приводило к тому, что одни и те же члены семейства ММП называли разными именами. В связи с этим, в 1989 году, *Harris Ed Jr* и его коллегами во время конференции «Destin Beach Matrix Metalloproteinase» было предложено использовать название «матриксная металлопротеиназа» или «матриксина» для этого семейства ферментов. (Первая обзорная статья, где впервые упомянуто название «матриксные металлопротеиназы», была написана *Birkedal-Hansen H* и опубликована в 1988 г.). Впоследствии, Международный союз биохимии и молекулярной биологии присвоил семейству название – «Matrix Metalloproteinases» и назначил каждому члену свой ферментный номер. К 1991 г. были названы и охарактеризованы ММП-1,

-2, -3, -7, -8, -9 и -10, а также тканевые эндогенные ингибиторы ММП 1 и 2 типа (ТИММП-1 и -2) [7]. Путём ДНК-клонирования было показано, что коллагеназы и желатиназы нейтрофилов генетически отличны от тех же самых ферментов, синтезируемых фибробластами. Нейтрофильная коллагеназа была обозначена ММП-8 а желатиназа – ММП-9 [8].

Строение матриксных металлопротеиназ

В 1994 г. с помощью рентген-кристаллографии лабораторией Longley были получены 3D структуры каталитических доменов ММП-1 и ММП-8 [9]. В 1995 г. удалось получить кристаллическую структуру у всей молекулы коллагеназы 1. В 1996–1997 гг. благодаря рентгеноструктурному анализу удалось получить 3D структуры комплексов каталитических доменов ММП-3 и ММП-8 с их ингибиторами [5].

На данный момент при помощи того же метода и ЯМР-спектроскопии помимо ММП-1 и ММП-8 были выяснены структуры ММП-2, ММП-3, ММП-7, ММП-9, ММП-10, ММП-11, ММП-12, ММП-13, ММП-14 и ММП-16. Частичны были выяснены структуры про-ММП-3 и про-ММП-9, про-ММП-1 и про-ММП-2. Комплексы про-ММП-2 совместно с ТИММП-2 каталитического домена ММП-3 с кат–ТИММП-1, ММП-14 и кат–ТИММП-2 помогли понять механизм катализа и связывания субстрата при поиске новых ингибиторов [9].

Благодаря новым методам исследования структур органических молекул оказалось возможным выяснить структуры ММП и их эндогенных ингибиторов, а также установить ряд общих особенностей. ММП состоит из следующих частей, представленных на рис. 2.

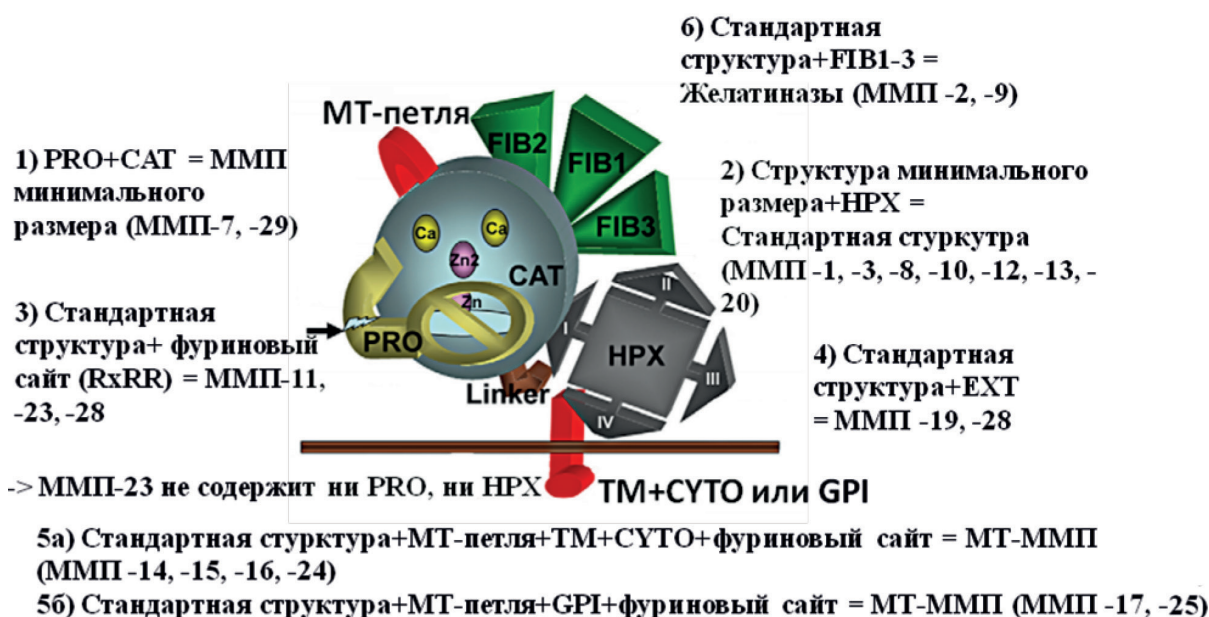


Рис. 2. Схематическое представление доменной структуры MMP человека
Примечания: Каталитический домен (CAT) с двумя ионами цинка (выделены розовым) и двумя ионами кальция (выделены жёлтым). Продомен (PRO) показан тёмно-жёлтым блокирует активный сайт. Линкерный пептид (LINKER) соединяет каталитический и гемопексиноподобный домен (HPX). Некоторые MMP показаны с расширением (EXT) на С-конце, которое не является мембранным якорем. MT-MMP (MT-петля) демонстрирует мембранный якорь, который является либо трансмембранной (TM) спиралью с небольшой цитоплазматической частью (CYTO), либо GPI-якорем (GPI). Фибронектиноподобные домены типа II (FIB1-3) показаны зелёным цветом [9].

Продомен (PRO)

Эта структура, которую условно можно разделить на два фрагмента: N-концевую последовательность (сигнальный домен) из 18–20 аминокислотных остатков (АКО), отщепляющихся во время активации фермента, и так называемого «пропептида», содержащего около 80 АКО. В последнем находится последовательность PRCGxPD (пролин – аргинин – цистеин – глицин – остаток любой аминокислоты – пролин – остаток любой аминокислоты). Эта последовательность несёт остаток цистеина, взаимодействующего с ионом Zn²⁺ в каталитическом домене. При этом образуется координационная связь и предотвращается связывание молекулы воды с ионом металла, благодаря чему фермент может существовать в неактивной форме (проMMP) [10].

Каталитический домен (CAT)

Каталитический домен (CAT) состоит примерно из 170 АКО. Включает активный Zn-связывающий сайт в котором ион металла связывают три остатка гистидина. После сайта следует стабилизирующая структура из метионина, его восемь остатков образуют «метиониновую петлю», которая поддерживает структуру активного центра вокруг каталитического иона цинка [11, 12].

Шарнирная область (LINKER)

Ещё часто называют линкерный пептид. Его основная задача состоит в том, чтобы соединять каталитический домен с последующим гемопексиноподобным.

Она может состоять из разных АКО, расположенных в произвольном порядке [12].

Гемопексиноподобный домен (HPX) (С-концевой)

Гемопексиноподобный домен (HPX) образован серией около 200 АКО. Ответственен за специфичность при взаимодействии с белком. Раскручивает спирали в молекуле коллагена, попутно определяя её положение по отношению к ферменту. Именно на гемопексиноподобном домене происходит взаимодействие с тканевыми ингибиторами MMP [12].

Классификация матриксных металлопротеиназ

В 80–90-х годах, когда было охарактеризовано достаточное количество MMP, возникла необходимость их классификации. Сначала MMP были классифицированы относительно их *in vitro* субстратной специфичности (внеклеточный матрикс). Однако не было понятно почему конкретные субстраты были протестированы относительно определённых MMP [3].

Для того, чтобы фермент отнесли к семейству MMP, он должен отвечать следующим требованиям:

- 1) протеолиз не менее одного компонента ВКМ;
- 2) катализ, связанный с ионом Zn²⁺ в активном центре фермента;
- 3) активация протеиназами или ртутьорганикой;
- 4) ингибируется этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), 1,10-фенантролином и одним из тка-

невых эндогенных ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП);

5) кДНК фермента должна быть гомологична с кДНК ММП-1.

Изначально предложенная классификация, заключающаяся в том, что протеиназа секретируется в про-формы, больше не применяется, в связи с открытием ММП-11 и ММП-28, которые внутриклеточно активируются фурином и секретируются в активных формах, а мембраны, связанные ММП, вообще не обязательно секретируются [13].

Активность некоторых ММП проверялась на коллагене I типа, фибронектине и ламинине. Однако далеко не все ММП проверялись на таком количестве субстратов. В итоге получилось так, что первые 10 ММП имели широкую субстратную специфичность, в то время как для ММП, открытых позднее (например, ММП-28), идентифицировано или исследовано только несколько субстратов. Такая ограниченная классификация субстратов привела к возникновению ряда ошибочных представлений и упрощений в понимании разнообразия функций ММП [13].

В результате были предложены две системы классификации матричных металлопротеиназ. Одна из них представляет собой 5 подсемейств: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, митрилизины и мембранносвязанные ММП (МС-ММП). Недостаточно изученные относят в группу «другие ферменты» [14]. Всего на сегодняшний день известно 28 ферментов ММП (табл. 1).

Другая классификация предложена (Huxley-Jones J.) в 2007 г. [16]. В геноме он идентифицировал гены, способные кодировать ММП. На основании полученных данных он разделил ММП на шесть групп:

А. Подгруппа А ММП-26 и ММП-28).

В. Подгруппа В ММП-21 и ММП-23).

С. Подгруппа С ММП-25).

Д. Подгруппа D ММП-3, ММП-8, ММП-12, ММП-13 и чьи гены в хромосоме 11q21–24).

Е. Подгруппа E ММП-15, ММП-16 и которые являются мембранного типа.

Ф. Подгруппа F (ММП-2, ММП-9 и ММП-20).

Механизм активации ММП

В 1990 г. было обнаружено, что «цистеиновый выключатель» отвечает за регуляцию фермента в его неактивной форме. [6]. В организме ММП синтезируются в виде проферментов (проММП), которые активируются как протеолитически, так и непротеолитически соединениями ртути (HgCl_2 ; 4-аминофенилацетат ртути), хаотропными агентами и додецилсульфатом натрия [19, 20]. В основном, активность фермента регулируется благодаря наличию пропептида. Он взаимодействует с цинком в каталитическом домене, образуя координационную связь. Молекула воды, находящаяся в пропептиде, не связывается с ионом цинка, следовательно, не происходит катализа и расщепления субстрата, из-за чего фермент и остаётся в неактивной форме. Чтобы ММП активировались,

Таблица 1

Матричные металлопротеиназы [9, 14–18]

ММП	Альтернативное название	Субстраты
Коллагеназы		
ММП-1	Интерстициальная коллагеназа	Коллаген I, II, III, VII, VIII, X, XI типов, агрекан, желатин, фибронектин, витронектин, ламинин, энтактин, тенасцин, верзикан, перлекан, проММП-1, проММП-2, проММП-9, $\alpha 2$ -макроглобулин, proTNF, C1q, IGFBP, $\alpha 1$ -антихимотрипсин
ММП-8	Нейтрофильная коллагеназа	Коллаген I, II, III, V, VII, VIII, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, $\alpha 2$ -макроглобулин, C1q, ангиотензин I, ангиотензин II, фибриноген, брадикинин
ММП-13	Коллагеназа-3	Коллаген I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV типов, агрекан, желатин, фибронектин, перлекан, проММП-9, $\alpha 2$ -макроглобулин, C1q, фактор XII, фибриноген, $\alpha 1$ -антихимотрипсин
Желатиназы		
ММП-2	Желатиназа А Коллагеназа IV типа	Коллаген I, II, III, IV, V, VII, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, верзикан, $\alpha 2$ -макроглобулин, проММП-1, проММП-2, проММП-9, проММП-13, proIL- β , proTGF- α , плазминоген, IGFBP-3/5, FGF-R1, CCL7, CXCL12
ММП-9	Желатиназа В	Коллаген IV, V, VII, X, XI, XIV типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, витронектин, верзикан, декорин, $\alpha 2$ -макроглобулин, proIL- β , proTGF- α , IL-2R α , ангиотензин I, ангиотензин II, плазминоген, CXCL6, CXCL8
Стромелизины		
ММП-3	Стромелизин 1	Коллагены II, III, IV, V, VII, IX, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, перлекан, верзикан, проММП-1, проММП-3, проММП-7, проММП-8, проММП-9, проММП-13, $\alpha 2$ -макроглобулин, proIL-1 β , proTNF- α , антитромбин-III, PAI-1, плазминоген, IGFBP-3, $\alpha 1$ -антихимотрипсин

ММП	Альтернативное название	Субстраты
ММП-10	Стромелизин 2	Коллагены III, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, проММП-1, проММП-7, проММП-8, проММП-9
ММП-11	Стромелизин 3	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, α 2-макроглобулин, α 2-антиплазмин, PAI-2, IGFBP-1
Митрилизины		
ММП-7	Митрилизин-1	Коллагены I, IV, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, фибулин, верзикан, проММП-1, проММП-2, проММП-7, проММП-9, α 2-макроглобулин, проTNF- α , плазминоген, β 4 интегрин, про- α -дефензин, Fas-L
ММП-26	Митрилизин-2, эндометаза	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, витронектин, α 2-антиплазмин, β 4 интегрин, фибриноген, E-кадхерин, проММП-9, Fas-L
Матриксные металлопротеиназы мембранного типа		
ММП-14	MT1-ММП	Коллагены I, II, III типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, проММП-13, α 2-макроглобулин, проTNF- α , фактор XII, фибриноген, CD44
ММП-15	MT2-ММП	Коллаген I типа, фибронектин, желатин, ламинин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, проTNF- α
ММП-16	MT3-ММП	Коллагены I, III типов, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, проММП-2, α 2-макроглобулин
ММП-24	MT5-ММП	Фибронектин, желатин, хондроитина сульфат, проММП-2, N-кадхерин
Заякоренные с помощью гликозилфосфатидилинозитола (GPI-anchored)		
ММП-17	MT4-ММП	Желатин, фибриноген, проTNF-
ММП-25	MT6-ММП, лейколезин	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, ламинин, хондроитина сульфат, дерматан-сульфат, α 2-макроглобулин, проММП-2, фибриноген, проTNF- α
Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы		
ММП-12	Металлоэластаза, макрофагальная эластаза	Коллаген I, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, остеоонектин, α 2-макроглобулин, проTNF- α , фактор XII, фибриноген, плазминоген
ММП-19	RASI-1	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, олигомерный матриксный протеин хряща, энтактин, фибриноген
ММП-20	Энамилизин	Коллаген V типа, агрекан, амелогенин, олигомерный матриксный протеин хряща
ММП-21	XMMP	α 1-антитрипсин, желатин
ММП-23		Желатин
ММП-27		Желатин, казеин
ММП-28	Эпилизин	Казеин

необходимо отщепить пропептид от каталитического домена. Зачастую это достигается автокатализом или взаимодействием с другими ММП (рис. 3) [12].

Ингибиторы матриксных металлопротеиназ

Разработка ингибиторов цинксодержащих металлопротеиназ в основном сконцентрирована на ингибиторах ММП и АПФ, потому что избыток в организме этих протеиназ может привести к появлению различного рода заболеваний. Ингибиторы других существующих металлопротеиназ, таких как СРА, TLN, NER, TACE и др., разрабатываются только для структурного изучения, и поэтому их количество ограничено. В связи с этим, в данной статье мы остановимся только на описании ингибиторов ММП.

ММП в организме ингибируются α 2-макроглобулином, а также семейством тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП) [21]. ТИММП представляют собой семейство из четырёх ферментов. Они не специфичны для каждого типа ММП, хотя наблюдается определённая предпочтительность связывания ТИММП-1 с ММП-9, а ТИММП-2 с ММП-2 [22]. ТИММП связываются с активным центром ММП в соотношении 1:1, блокируя доступ к субстрату. В последовательности генов четырёх ТИММП не выявлено большого сходства, что говорит об уникальной биологической роли каждого эндогенного ингибитора. Например, ТИММП-2 выборочно взаимодействует с ММП-1 мембранного типа, которые участвуют в активации про-ММП-2. ТИММП-3 уникальны в своей способности к взаимодействию с внеклеточным ма-

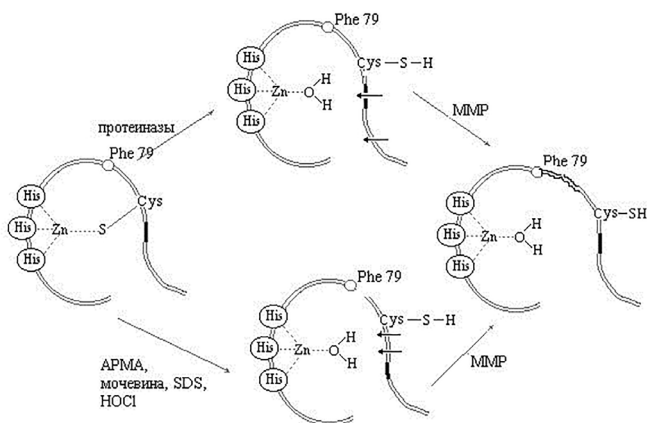


Рис. 3. проММП. Представлена активация проММП двумя путями: с помощью протеиназы и с использованием соединений ртути ($HgCl_2$); 4-аминофенилацетат (APMA), мочевины, додецилсульфата натрия (SDS) или $HOCl$ [12]

триксом [23]. Про последнего представителя группы эндогенных ингибиторов, ТИММП-4, известно немного, однако предполагается, что он играет главную роль при связывании ММП в тканях сердца.

Все известные ТИММП (ТИММП 1–4) состоят из двух, связанных между собой шестью дисульфидными связями доменов: маленького С-концевого и большого N-концевого. Последний, который представляет собой остаток Cys, связывается с активным Zn^{2+} -связывающим центром ММП в эквимольном соотношении, вследствие чего и наблюдается ингибирование. С-концевой домен задействован в активации проММП [24].

За последние два десятилетия стало известно, что ММП играют основную роль в возникновении и прогрессировании многих патологий. В связи с этим большую популярность обрёл поиск ингибиторов ММП. Таким образом, позднее, были определены основные структурные требования к ингибиторам различных матриксных металлопротеиназ. Основным является наличие цинк-хелатирующей группы (ZBG). К таким группам относят гидроксаматную (CONHOH), формилгидроксиламиновою, сульфгидрильную (SH), фосфиновую, аминокарбоксильную и карбоксильную группы (COOH) [25]. Также необходимо наличие, по меньшей мере, одной функциональной группы, способной образовывать водородную связь с ферментами. Последним требованием является наличие одной или нескольких боковых цепей, которые могут эффективно связываться с ферментами посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий [2].

К указанным требованиям может подходить множество соединений с различными структурами, поэтому они были разделены на несколько классов (рис. 4) [2, 25]:

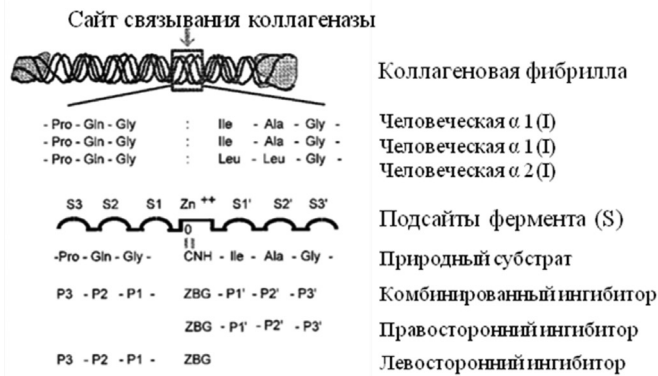


Рис. 4. Дизайн ингибиторов матриксных металлопротеиназ

Примечания: показана структура коллагеновой фибриллы человека, подсайт фермента (S3-S3'), денатурирующего коллаген (ММП), структура природного субстрата ММП (PQGCNH(O)IAG) и структуры подклассов ингибиторов ММП [25].

1. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки с обеих сторон от ZBG, например P3-P2-P1-ZBG-P1'-P2'-P1' – смешанные ингибиторы.

2. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только с правой стороны от ZBG, например ZBG-P1'-P2'-P3' – так называемые правосторонние ингибиторы.

3. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только по левую сторону от ZBG, например P3-P2-P1-ZBG – левосторонние ингибиторы.

Данная классификация основана на специфичности по отношению к определённому субстрату, характерному для конкретной ММП. Эти ингибиторы отличаются по силе действия; правосторонние являются более мощными ингибиторами, однако среди левосторонних иногда также встречаются активные ингибиторы [3]. Позднее во всех представленных классах ингибиторов были выделены:

- природные ингибиторы ММП;
- ингибиторы, содержащие карбоксильную группу;
- ингибиторы, содержащие остаток гидроксамовой кислоты;
- ингибиторы на основе тиола;
- ингибиторы содержащие фосфор;
- ингибиторы на основе сульфонамидов;
- ингибиторы на основе барбитуратов;
- ингибиторы не содержащие цинк-связывающую группу.

Природные ингибиторы ММП

Производные жирных кислот с длинной цепью (олеиновая, элаидиновая и паринаровая кислоты), обладают ингибирующей активностью по отношению к ММП. Паринаровая кислота (цис- и трансизомеры) –

¹ Здесь и далее в статье для обозначения взаимодействующих между собой остатков субстрата и фермента используют нomenclатуру Шехтера и Бергера [26].

ингибитор желатиназ, с $K_i \sim 10^{-6}$ М. Элаидиновая кислота, нанесённая на кожную ткань, также защищает клетки от воздействия желатиназ. Активность данного класса соединений связана с наличием карбоксильной ZBG и длинного углеводородного хвоста, взаимодействующего с S1' сайтом активного центра желатиназ (рис. 5) [27].

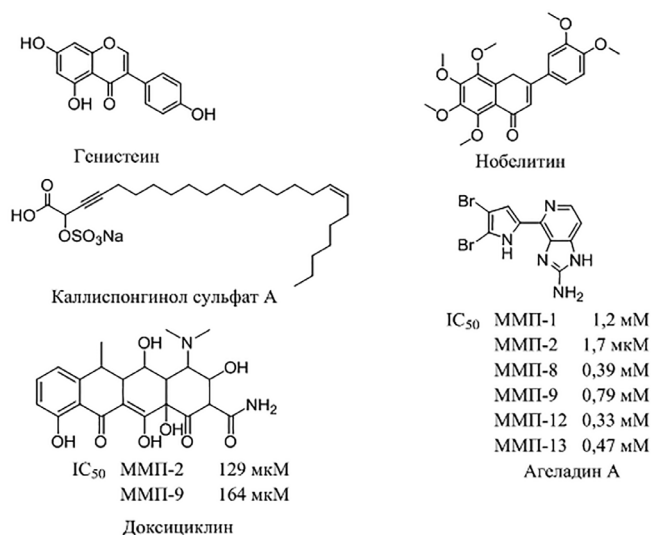


Рис. 5. Природные ингибиторы ММП

Флавоноиды и подобные структуры (рис. 5) [28–30]: агеладин А — флуоресцентный алкалоид, выделенный из морской губки, ингибирует ММП-1, -8, -9, -12, и -13 со значением $IC_{50} = 1,2; 0,39; 0,79; 0,33,$ и $0,47$ мг/мл, соответственно; генистеин — (4Н-1-бензоперан-4-он-5,7-дигидрокси-3-4-гидроксифенил) изофлавоноид, промежуточное вещество в синтезе других изофлавоноидов, защищающих растения от микробов [28]. Содержится в сое, является ингибитором желатиназ, при этом способствует выделению ТИММП-1. Нобилетин — цитрусовый флавоноид, обладающий ингибирующей активностью против желатиназ. Является веществом, способствующим понижению роста раковых клеток [29].

Тетрациклины: периостат, также известный как доксициклин (см. рис. 5) — полусинтетическое тетрациклиновое соединение, которое помимо антибактериальной активности может остановить разрушение внеклеточного матрикса при заболеваниях полости рта и в миокарде. Доксициклин был разрешён FDA в 1998 г., и до сих пор остаётся единственным зарегистрированным ингибитором ММП-9 [30].

Гидроксаматные ингибиторы ММП

Ингибиторы на основе гидроксамовой кислоты являются самыми изученными и распространёнными среди всех соединений этой группы. Все они содержат гидроксаматную цинк-связывающую группу (CONHOH). Данные ингибиторы подразделяются на сукцинильные пептидные и непептидные гидроксама-

ты, сульфонамидные гидроксаматы, а так же сульфонамиды на основе малоновой кислоты. Считается, что из всех представителей сукцинильные гидроксаматы обладают наибольшей аффинностью по отношению к ММП. Поэтому, до недавнего времени, они были наиболее широко изученными. Самыми известными ингибиторами данного класса являются батимастат и маримастат. Многими исследователями было обнаружено, что наличие заместителя в подсайте P1 приводит к получению ингибиторов ММП широкого спектра действия. Всего было синтезировано множество сукцинильных гидроксаматов пептидной и не пептидной природы. Однако только батимастат и маримастат дошли до стадии клинических испытаний. Они обладают широким спектром действия и показали хорошую активность *in vivo* в ряде клинических моделей заболеваний [31, 32].

Батимастат проявил высокую ингибирующую активность по отношению к ММП-1, -2, -3, -7 и -9. Он является первым ингибитором ММП, для которого были проведены клинические испытания (I фаза, 1994 г.). Из-за плохой растворимости, отсутствия пероральной биодоступности батимастата и наличия побочных эффектов (мышечно-скелетная боль появлялась после 3–5 мес. применения препарата), клинические испытания этого вещества были прерваны на III фазе (рис. 6) [33, 34].

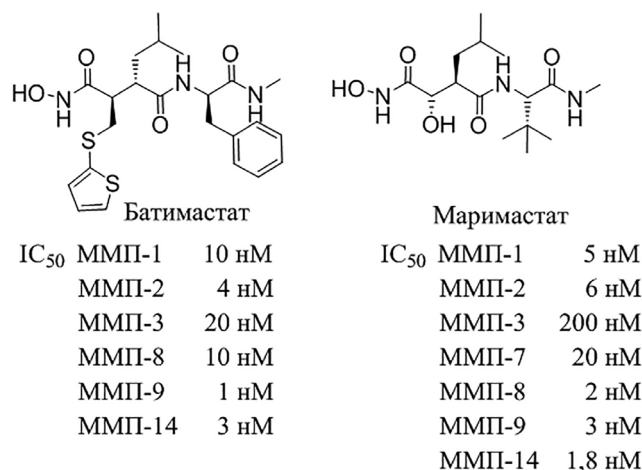


Рис. 6. Батимастат и маримастат

Маримастат является активным при пероральном применении, с периодом полураспада в плазме крови 8–10 ч. Маримастат прошел III фазу клинических испытаний в отношении нескольких типов рака. Его биодоступность объяснили наличием гидрофильного ОН-фрагмента что, вероятно, может увеличить растворимость в воде соединения. Маримастат — обратимый ингибитор ММП, обладающий высокой аффинностью. Однако оказалось, что и маримастат вызывает скелетно-мышечные боли, но его применяют в терапии рака органов ЖКТ [35].

Гидроksamатные ингибиторы на основе малоновой кислоты связываются в АЦ ММП по другому механизму, нежели вышепредставленные ингибиторы (рис. 7) [36].

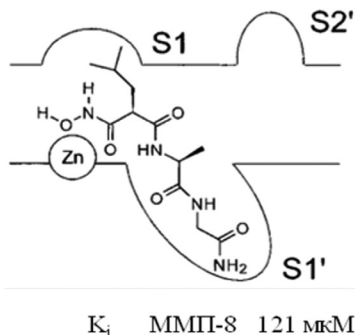
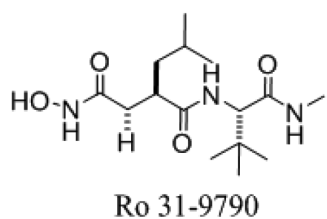


Рис. 7. Гидроksamатный ингибитор ММП на основе малоновой кислоты

Примечание: Несубстратоподобное связывание HONH-Mal(i-Bu)-Ala-Gly-NH₂ с ММП-8

Гидроksamатный фрагмент связывается с ионом цинка ММП как бидентантный хелатор, таким же образом, как и остальные гидроksamаты. Из-за отсутствия спейсера между цинк-связывающей и гидрофобной группой, изобутильный фрагмент занимает подсайт S1. Фрагмент Ala-Gly-NH₂ изгибается таким образом, чтобы занять карман S1'.

Модификация заместителя P2'-составляющей также влияет на фармакокинетическую активность потенциальных ингибиторов. Третбутильная группа в P2' положении (рис. 8) [31, 35] стерически закрывает амидную связь, так же является, по всей вероятности, наиболее предпочтительным заместителем, обеспечивающим наибольшее связывание с субстратом.



IC_{50}	ММП-1	10 нМ
	ММП-2	8 нМ
	ММП-3	700 нМ
	ММП-14	1,9 нМ

Рис. 8. Пример ингибитора с заместителем P2'

Так же существуют соединения с заместителями в положении P3'. Однако по своей ингибирующей способности ингибиторы данного рода мало чем отличаются от ингибиторов с заместителем в P2'. Ранее предполагали, что ингибиторы с заместителем P3' из-за

своего связывания с метионином способны селективно ингибировать ММП-7, однако позже эта информация была опровергнута [36].

При проведении клинических испытаний было обнаружено, что гидроksamатные ингибиторы являются метаболически лабильными, могут разрушаться до гидроксиламина (канцероген) и, в случае пептидных ингибиторов, плохо усваиваются в ЖКТ, а также вызывают скелетно-мышечные боли в качестве побочного эффекта. Однако эти соединения доказали свою эффективность *in vivo*, поэтому их продолжают разрабатывать [37].

Ингибиторы ММП, содержащие карбоксильную группу

В ингибиторах на основе карбоновых кислот цинк-связывающей группой является карбоксильная группа (-COOH). Эти ингибиторы проявляют меньшее сродство к ММП, чем остальные. Однако они отличаются хорошей биодоступностью и отсутствием токсичности и побочных эффектов по сравнению с ингибиторами других классов. Так же известно, что некоторые карбоксильные ингибиторы действуют как селективные по отношению к некоторым ММП, которые имеют глубокий сайт связывания (S1'). К ним относятся ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 и ММП-13. Таким образом, они являются перспективными для синтеза и последующего применения в клинической практике в качестве селективных ингибиторов некоторых классов ММП.

Соединения AG-3433 и BAY 12-9566 (рис. 9) [3, 31] являются одними из немногих карбоксилатных ингибиторов ММП, которые дошли до клинических исследований (AG-3433 прошёл I фазу, BAY 12-9566 дошёл до III фазы) как противоопухолевые средства. Они отличаются удлинённым и достаточно громоздким гидрофобным заместителем в месте связывания с сайтом S1'. Кроме того, наличие аминогруппы (-NH) в соединении AG-3433 позволяет образовывать дополнительные связи с аминокислотами АЦ ферментов.

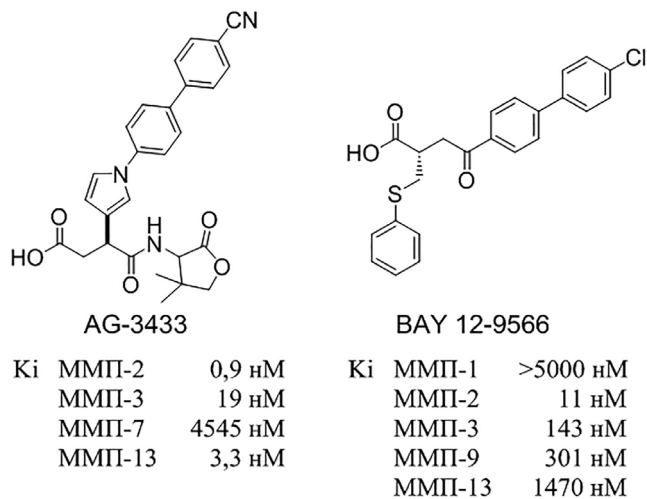


Рис. 9. Карбоксилатные ингибиторы AG-3433 и BAY 12-9566

Ещё один яркий представитель карбоксилатных ингибиторов ММП (рис. 10) [2] дифенилтетразол также обладает длинной биароматической группой для связывания с S1' сайтом в АЦ ММП. Однако, помимо этого, в его структуре присутствует сульфонамидная

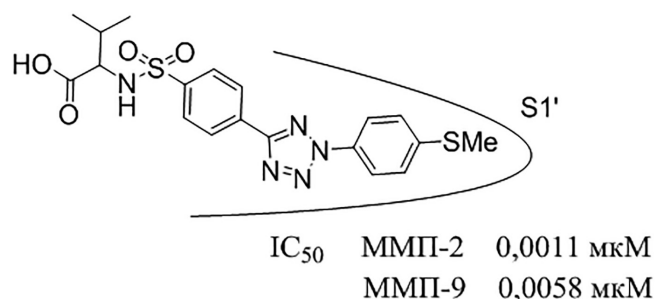


Рис. 10. Карбоксилатный ингибитор ММП

группа, которая образывает сильные водородные связи между одним из её атомов кислорода и основными NH-группами Leu181 и Ala182, присутствующими в ММП. В связи с этим, многие производные сульфонила-аминокислот на данный момент синтезированы в качестве ингибиторов ММП [2].

Ингибиторы ММП с тиольной цинк-связывающей группой

Тиольная группа является монодентантной, её сродство с ионом цинка в АЦ меньше, чем сродство бидентантных групп, таких как гидроксаматная и карбоксильная. Однако тиольные ингибиторы являются хорошо растворимыми и легче ионизируются. В результате их ингибиторные свойства почти такие же, как у гидроксаматных и карбоксилатных ингибиторов.

Среди ингибиторов ММП, содержащих тиольную цинк-связывающую группу, до клинических испытаний дошло всего два соединения (рис. 11) [3, 31].

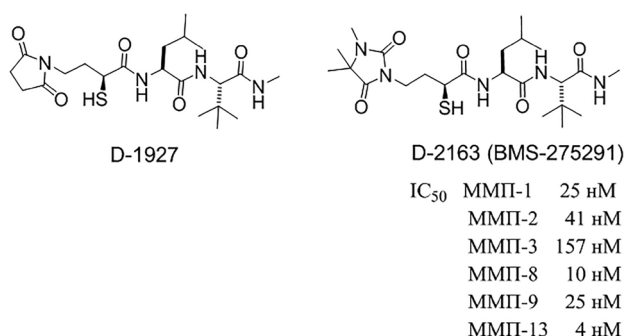


Рис. 11. Тиольные ингибиторы ММП D-1927 и D-2163 (BMS-275291)

Соединение D-1927 изначально разрабатывалось как противоопухолевое средство, однако не дошло до клинических исследований, а дошло до второй фазы клинических испытаний в качестве противовоспалительного средства.

Соединение D-2163 (BMS-275291) дошло до третьей фазы клинических исследований как противоопухолевый препарат [3, 31].

Фосфоросодержащие ингибиторы ММП

В основе фосфоросодержащих ингибиторов лежит либо фосфиновая, либо фосфоновая кислота для связывания с ионом цинка. Например, на рис. 12 представлены синтезированные ингибиторы ММП, содержащие фосфор [31, 38]. Эти соединения являются моно- и бидентантными, соответственно, что позволяет им связываться с ионом цинка. Данные заместители не могут превзойти гидроксаматную группу по силе связывания цинка, но полностью выполняют роли акцепторов водородных связей и взаимодействуют с ферментом другими способами.

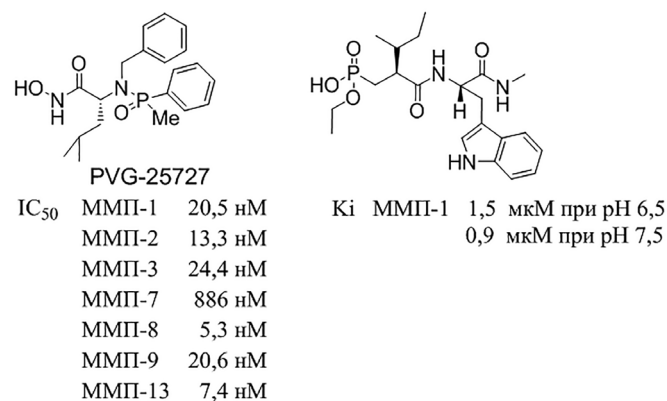


Рис. 12. Фосфоросодержащие ингибиторы ММП

Многие фосфоросодержащие ингибиторы являются селективными ингибиторами ММП-1, ММП-3 и ММП-13. Однако, не смотря на всю их перспективность, ни одно из них до сих пор не достигло стадии клинических исследований.

Ингибиторы ММП на основе сульфонамидов

Эффективность данной группы ингибиторов зависит от электронного окружения атома серы. Повышение положительного заряда на сере облегчает разложение вещества, поэтому при ней предпочтителен электрон-донорный заместитель. Сама SO₂-группа отвечает за водородные связи с аминокислотами субстрата. За счёт этого связывания комплекс становится более стабильным [3].

Из данных литературы известно, что гидроксаматы, содержащие сульфонамидную группу являются эффективными ингибиторами ММП [2, 31]. Некоторые из них дошли до III стадии клинических исследований в качестве противоопухолевых препаратов (AG-3340) (рис. 13) [3, 31].

Соединение CGS 27023A прошло I фазу клинических исследований в качестве противоопухолевого средства, а также препарата против артрита [3]. Важной особенностью представленных структур является нали-

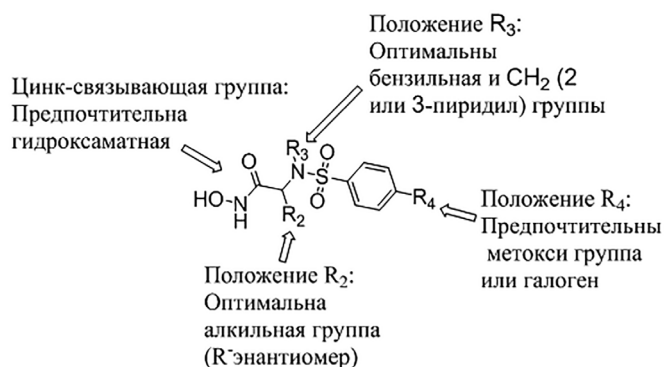


Рис. 13. Общая формула сульфамидного ингибитора ММП

чие алкильной изопропилной группы (-R энантиомера, при наличии хиральной активности), замедляющей метаболизм цинк-связывающего гидроксаматного участка ингибитора. S-изомер, при этом, практически не активен. Считается, что именно он связывается с подсайтом S1. Более громоздкий пиридилметил или бензильный фрагмент, присутствующий при атоме азота, который, вероятно, связывается с карманом S2, и арилсульфонильная группа для взаимодействия с карманом S1' (рис. 14) [2].

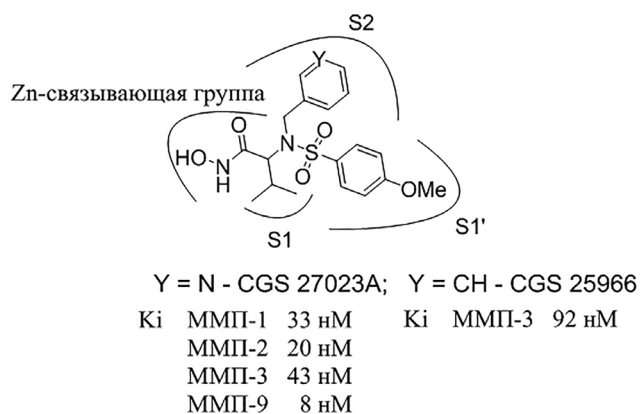


Рис. 14. Сульфамидные ингибиторы ММП

Примерно в это же время был разработан ингибитор AG-3340 с IC₅₀, находящийся в наномолярном диапазоне концентраций [31]. Он прошёл II фазу клинических испытаний в качестве противоопухолевого средства и прошёл I стадию как препарат против макулодистрофии. Этот ингибитор и ингибиторы похожего строения обладают высокой селективностью и оральной биодоступностью (рис. 15) [3, 31].

Сульфонамидные ингибиторы на основе карбоновых кислот (рис. 16) в основном проявляют ингибиторную активность по отношению к ММП-2, ММП-1, ММП-3, ММП-7 и ММП-13 [39].

Ингибиторы ММП на основе барбитуратов

Эти соединения связывают цинк-ион ММП посредством карбонильного кислорода, кольцевого азота, либо же их комбинации (ионизированного кольца).

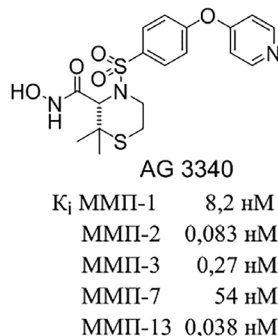


Рис. 15. Ингибитор ММП AG-3340

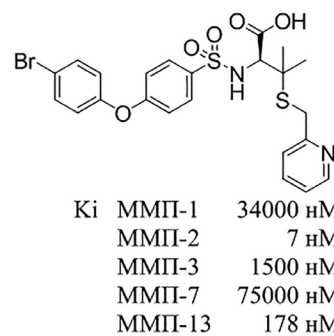


Рис. 16. Сульфонамидный ингибитор ММП на основе карбоновой кислоты

К этой группе относятся спиробарбитураты и другие 5,5-дизамещённые производные пиперазинов [40, 41].

В 2001 г. работники компании Hoffman La-Roche Company при скрининге противоопухолевых препаратов обнаружили, что 5,5-дизамещённые барбитураты стабильны *in vivo*, обладают хорошей ингибирующей активностью по отношению к желатиназам [41]. После этого, в 2011 г. группа Гильмера синтезировала 5-пиперазин и гомопиперазин-замещённые барбитураты. Впоследствии они описали новый тип ингибиторов ММП на основе барбитуратов, включающий донорную NO-группу [42]. Эта же группа изучила ряд гомодимерных соединений, полученных из 5-гомопиперазинзамещённых пиримидиновых трионов (барбитуратов) с линкерами размером в диапазоне от 2 до 20 атомов углерода [43]. Эти соединения разрабатывались в качестве перорально биодоступных ингибиторов желатиназ А и Б. Димерные соединения обладают такой же эффективностью и селективностью, как и класс мономерных гомопиперазиновых барбитуратов. Представленные на рис. 17 барбитураты показали хорошую ингибирующую активность по отношению к желатиназам и могут использоваться в качестве противоопухолевых средств [44].

Ингибиторы не содержащие цинк-связывающую группу

Многие десятилетия развитие ингибиторов ММП фокусировалось на подборе структур, которые связываются в активном центре фермента и хелатируют каталитический цинк. Однако из-за высокого сходства между каталитическими доменами ММП и других металлопротеиназ (например, АПФ) ингибиторы первых далеко не всегда оказываются селективными. В связи с этим перспективными оказались структуры, способные связываться с другими доменами, ММП и таким образом ингибировать их. В качестве целевого может быть использован гемопексиноподобный домен металлопротеиназ, структурные особенности которого позволяют повысить избирательность ингибиторов, вплоть до таких, как ингибиторы желатиназ, структура каталитических доменов которых практически идентична [45].

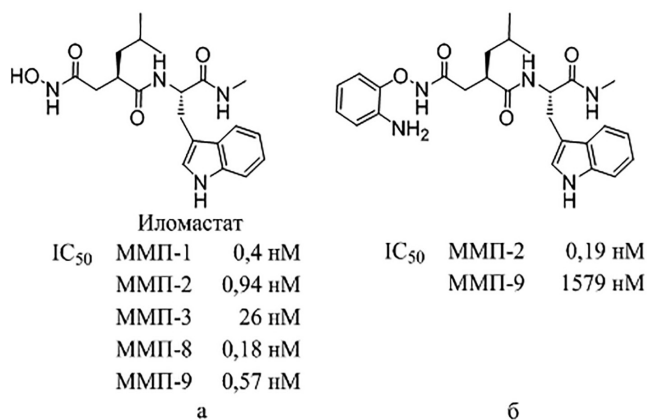
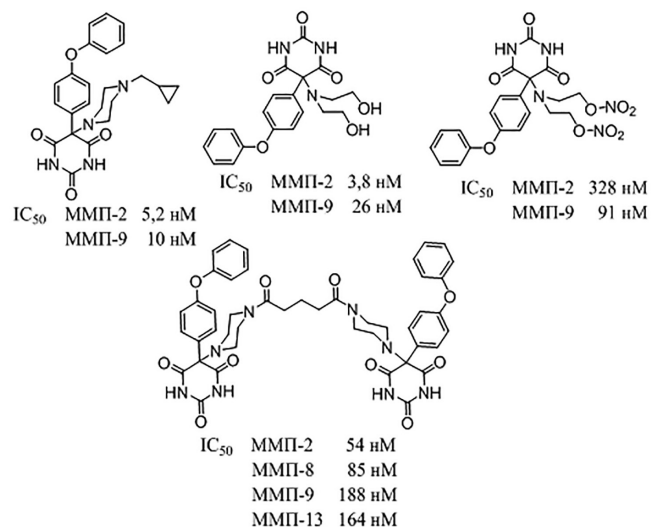


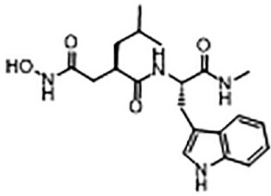
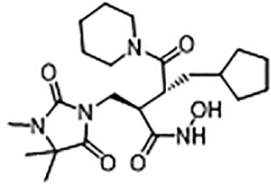
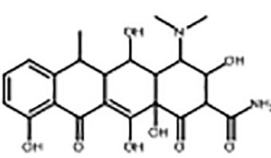
Рис. 17. 5,5-дизамещённые барбитуратные ингибиторы ММП

Рис. 18. Иломастат (а) и его аналог (б)

Таблица 2

Ингибиторы ММП

№	Ингибитор ММП	Структура	Показания	Статус	Компания	Ссылка
1	Маримастат (BB-2516)		Рак молочной железы; Рак лёгких; Сосудистые аномалии	Фаза III	Pfizer	[47]
2	Батимастат (BB-94)		Злокачественные опухоли	Фаза II	British Biotech	[48]
3	S-3304		Рак лёгких; Солидные опухоли	Фаза II Фаза I	Shionogi	[49, 50]
4	COL-3 (NSC-683551)		Рефрактерный метастатический рак	Фаза I	National Cancer Institute (NCI)	[51]
5	CGS-27023A		Артрит; Злокачественные образования	Фаза I	Novartis	[52]

№	Ингибитор ММП	Структура	Показания	Статус	Компания	Ссылка
6	Иломастат		Злокачественные опухоли; Фибробластная коллагеназа кожи; Термолизин	Фаза III	Glycomed	[53]
7	RO 32-3555		Артрит	Фаза I	Roche	[54]
8	Доксициклин		Постинфарктное ремоделирование миокарда; Сердечный амилоидоз	Фаза II Фаза III	Careggi Hospital IRCCS Policlinico S. Matteo	[54, 55]

Хорошим примером подобной модификации ингибитора является Иломастат (Iloprost). Иломастат по своей природе является ингибитором широкого спектра действия из-за наличия в структуре гидроксаматной группы, которая связывается с ионом цинка металлопротеина [31, 46].

Для улучшения селективности Иломастата в 2016 г. группа учёных разработала и синтезировала новые аналоги Иломастата с замещёнными бензамидными группами вместо гидроксамовой кислоты [46] (рис. 18). Среди этих аналогов наиболее эффективным оказалось соединение, представленное на рис. 18б, которое проявляло ингибирующую активность против ММП-2 в пять раз более сильную, чем у Иломастата ($IC_{50} = 0,19$ нМ и $IC_{50} = 0,94$ нМ, соответственно). Важно отметить, что аналог демонстрировал более чем 8300-кратную селективность для ММП-2 по сравнению с ММП-9 ($IC_{50} = 1,58$ мкМ). Исследования показали, что связывание аналога с ММП происходит минуя каталитический домен, а также фармакокинетические свойства у аналога были лучше, чем у исходного Иломастата [44, 46].

Заключение

Анализ данных литературы, посвящённых матричным металлопротеиназам и их ингибиторам, свидетельствует о том, что вышеупомянутые ферменты в настоящее время являются перспективными мишенями при поиске лекарственных средств, применяемых при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, а также для лечения различных злокачественных образований (табл. 2). На сегодняшний день в клиническую практику не введено ни одного ингибитора ММП. Это делает актуальной дальнейшую разработку данной тематики по поиску клинически эффективных соединений с учётом спектра необходимых требований к активности, безопасности, фармакокинетики и прочих показателей ингибиторов.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 18-015-00244 А.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Григоркевич Оксана Сергеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: oksana.grigorkevich@academpharm.ru

ORCID: 0000-0001-7702-0569

SPIN-код: 9149-3541

м. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Grigorkevich Oksana

Corresponding author

e-mail: oksana.grigorkevich@academpharm.ru

ORCID: 0000-0001-7702-0569

SPIN code: 9149-3541

Junior Researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department. FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Мокров Григорий Владимирович

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Косова Любовь Юрьевна

Студент РХТУ им. Д.И. Менделеева

Mokrov Grigory

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 8755-7666

Candidate of Chemical Sciences
Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Kosova Liubov

Student of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

Литература / References

- Rivera S, Khrestchatskiy M, Kaczmarek L, et al. Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? *Journal of Neuroscience*. 2010;30(46):15337–15357. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010>
- Gupta SP. Quantitative Structure Activity Relationship Studies on Zinc-Containing Metalloproteinase Inhibitors. *Chemical Reviews*. 2007;107(7):3042–3087. DOI: [10.1021/cr030448t](https://doi.org/10.1021/cr030448t)
- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;5:2223–2268. DOI: [10.1016/j.bmc.2007.01.011](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011)
- Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2012. – Т. 61. – № 1. – С. 113–125. [Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matriksnyye metalloproteinyazy i inhibitory: klassifikatsiya, mekhanizm deystviya. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*. 2012;61(1):113–125. (In Russ).]
- Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л. и др. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // *Иммунология, аллергология, инфектология*. – 2016. – № 2. – С. 11–22. [Markelova EV, Zdor VV, Romanchuk AL, et al. Matriksnyye metalloproteinyazy: ikh vzaimosvyaz' s sistemoi tsitokinov, diagnosticheskii i prognosticheskii potentsial. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya*. 2016;2:11–22. (In Russ).]
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, et al. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(31):3751–3768. DOI: [10.2174/092986710793213724](https://doi.org/10.2174/092986710793213724)
- Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994;732:11–21.
- Supuran CT, Winum J, editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors*. Ist ed. Hoboken: Wiley; 2009.
- Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005;87:249–263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.019>
- Соловьёва Н.И. Основные металлопротеиназы соединительно-тканного матрикса // *Биоорганическая химия*. – 1994. – Т. 20. – № 2. – С. 143–152. [Solov'eva NI. Osnovnyye metalloproteinyazy soedinitel'no-tkannogo matriksa. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1994;20(2):143–152. (In Russ).]
- Butler GS. The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):15615–15620. DOI: [10.1074/jbc.m312727200](https://doi.org/10.1074/jbc.m312727200)
- Lauer-Fields JI, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen metabolism. *Biopolymers*. 2002;66(1):19–32. DOI: [10.1002/bip.10201](https://doi.org/10.1002/bip.10201)
- Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, et al. The History of Matrix Metalloproteinases (MMPs): Milestones, Myths, and (Mis)Perceptions. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*. 2012;17. DOI: [10.1152/ajpheart.00577.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00577.2012)
- Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem. Bio.* 1996;3(11):895–904. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90178-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90178-7)
- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2008;75:346–359. DOI: [10.1016/j.bcp.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.004)
- Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C. The evolution of the vertebrate metzincins; Insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol. Biol.* 2007;7(1):63. DOI: [10.1186/1471-2148-7-63](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-63)
- Шадрина А.С. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм // *Патогенез*. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 14–23. [Shadrina AS. Matriksnyye metalloproteinyazy: struktura, funktsii i geneticheskii polimorfizm. *Patogenez*. 2017;15(2):14–23. (In Russ).] DOI: [10.25557/GM.2017.2.7297](https://doi.org/10.25557/GM.2017.2.7297)
- Клишо Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // *Сибирский онкологический журнал*. – 2003. – № 2 – С. 62–70. [Klisho EV. Matriksnyye metalloproteinyazy v onkogeneze. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*. 2003;2:62–70. (In Russ).]
- Stack MS, Itoh Y, Young TN, et al. Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;333(1):163–169. DOI: [10.1006/abbi.1996.0377](https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0377)
- Kim TH, Mars WM. Expression and Activation of Pro-MMP-2 and Pro-MMP-9 During Rat Liver Regeneration. *Hepatology*. 2003;31(1):75–82. DOI: [10.1002/hep.510310114](https://doi.org/10.1002/hep.510310114)
- Woessner JF, Jr. MMPs and TIMPs - An Historical Perspective. *Mol Biotechnol.* 2002;22(1):33-49. DOI: [10.1385/MB:22:1:033](https://doi.org/10.1385/MB:22:1:033)
- Kim WU, Min SY, Cho ML, et al. Elevated matrix metalloproteinase 9 in patients with systemic Sclerosis. *Arthritis Res.* 2005;7(1):71–79. DOI: [10.1186/ar1454](https://doi.org/10.1186/ar1454)
- Yu WH, Yu S, Meng Q, et al. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *Biol Chem.* 2000;275:31226–31232. DOI: [10.1074/jbc.M000907200](https://doi.org/10.1074/jbc.M000907200)
- Hundsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2005;11(6):849–860.
- Whittaker M, Ayscough A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors – current status and future challenges. *Celltransmissions.* 2001;17(1):3–14.
- Schechter I, Berger A. Reprint of «On the size of the active site in proteases. I. Papain». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;425(3):497–502. DOI: [10.1016/j.bbrc.2012.08.015](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.015)
- Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;48(3):445–453. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2009.09.013](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.013)
- Fingleton B. Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Targets Current Pharmaceutical Design. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13(3):333–346. DOI: [10.2174/138161207779313551](https://doi.org/10.2174/138161207779313551)
- Thomas NV, Kim SK. Metalloproteinase Inhibitors: Status and Scope from Marine Organisms. *Biochemistry Research International.* 2010;2010:1–10. DOI: [10.1155/2010/845975](https://doi.org/10.1155/2010/845975)
- Lindsey ML, Ma Y, Yabluchanskiy A. Matrix Metalloproteinase-9 Post Myocardial Infarction: Breakdowns and Breakthroughs. *Global J. Hum. Anat. Physiol. Res.* 2014;1(1):6–9.
- Whittaker M, Floyd CD, Brown P, et al. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 1999;99(9):2735–2776. DOI: [10.1021/cr9804543](https://doi.org/10.1021/cr9804543)
- Levin JI. The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TAC. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004;4(12):1289–1310. DOI: [10.2174/1568026043387935](https://doi.org/10.2174/1568026043387935)
- PharmaXChange.info [Internet]. Matrix Metalloproteinases: Its Implications in Cardiovascular Disorders [updated November 28, 2011]. Available from: <http://pharmaxchange.info/press/2011/11/matrix-metalloproteinases-its-implications-in-cardiovascular-disorders/>

34. Graff von Roedern E, Grams R, Brandstetter H, et al. Design and Synthesis of Malonic Acid-Based Inhibitors of Human Neutrophil Collagenase (MMP8). *J. Med. Chem.* 1998;41(3):339–345. DOI: 10.1021/jm9706426
35. Preece G, Murphy G, Agers A. Metalloproteinase-mediated Regulation of L-selectin Levels on Leucocytes. *J Biol Chem.* 1996;771(20):11634–11640. DOI: 10.1074/jbc.271.20.11634
36. Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ. Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Review on Pharmacophore Mapping and (Q)Sars Results. *Current Medicinal Chemistry.* 2005;12(3):339–355. DOI:10.2174/0929867053363243
37. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 2006;69:677–687. DOI:10.1016/j.cardiores.2005.11.032
38. Veerendhar A, Reich R, Breuer E. Phosphorus based inhibitors of matrix metalloproteinases. *Comptes Rendus Chimie.* 2010;13(8–9):1191–1202. DOI: 10.1016/j.crci.2010.07.003
39. Bender SL, Melwin AA. Metalloproteinase inhibitors, pharmaceutical composition containing them and their pharmaceutical compositions. United States patent US 5985900. 1999. Nov 16.
40. Kim SH, Pudzianowski AT, Leavitt KJ, et al. Structure-based design of potent and selective inhibitors of collagenase-3 (MMP-13). *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(4):1101–1106. DOI:10.1002/chin.200526096
41. Wang J, Medina C, Radomski MW, et al. N-substituted homopiperazine barbiturates as gelatinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19(16):4985–4999. DOI:10.1016/j.bmc.2011.06.055
42. Wang J, O'Sullivan S, Harmon S, et al. Design of barbiturate-nitrate hybrids that inhibit MMP-9 activity and secretion. *J Med Chem.* 2012;55(5):2154–2162. DOI:10.1021/jm201352k
43. Wang J, Radomski MW, Medina C, et al. MMP inhibition by barbiturate homodimers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(2):444–447. DOI:10.1016/j.bmcl.2012.11.063
44. Yue Zhong, Yu-Ting Lu, Ying Sun, et al. Recent opportunities in matrix metalloproteinase inhibitor drug design for cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2017;13(1):75–87. DOI: 10.1080/17460441.2018.1398732
45. Jillian M Cathcart, Jian Cao. MMP Inhibitors: Past, present and future. *Frontiers in Bioscience.* 2015;20(7):1164–1178. DOI:10.2741/4365
46. Song J, Peng P, Chang J, et al. Selective non-zinc binding MMP-2 inhibitors: novel benzamide Ilomastat analogs with anti-tumor metastasis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(9):2174–2178. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.03.064
47. clinicaltrials.gov [Internet]. BB-2516 [update 2004 May 26; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=BB-2516&cntry=&state=&city=&dist>
48. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(3):178–193. DOI:10.1093/jnci/93.3.178
49. clinicaltrials.gov [Internet]. A Phase 1 Study of S-3304 in Patients With Solid Tumors [update 2002 Apr 10; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00033215?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=55>
50. clinicaltrials.gov [Internet]. Study of S-3304 in Patients With Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [update 2004 Feb 26; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct00078390>
51. clinicaltrials.gov [Internet]. A Phase I Study of Oral COL-3 (NSC-683551), a Matrix Metalloproteinase Inhibitor, in Patients With Refractory Metastatic [update 1999 Nov 4; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001683?cond=matrix+metalloproteinase&draw=4&rank=20>
52. Grobelny D, Poncz L, Galaray RE. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry.* 1992;31(31):7152–7154. DOI:10.1021/bi00146a017
53. Beckett RP, Whittaker M. Matrix metalloproteinase inhibitors 1998. *Expert Opin Ther Pat.* 1998;8(3):259–282. DOI.org/10.1517/13543776.8.3.259
54. clinicaltrials.gov [Internet]. Tetracycline (Doxycycline) and Post Myocardial Infarction Remodeling (TIPTOP) [update 2007 May 4; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00469261?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=54>
55. clinicaltrials.gov [Internet]. A Study of Doxycycline and Tauroursodeoxycholic Acid (Doxy/TUDCA) Plus Standard Supportive Therapy Versus Standard Supportive Therapy Alone in Cardiac Amyloidosis Caused by Transthyretin [update 2018 Mar 29; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03481972?term=Doxycycline&rank=1>