

ПЕПТИДНЫЕ БЛОКАТОРЫ ИНДУЦИРОВАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Обзор

© 2024 В.Ю. Тощакон

АНОО ВО «Научно-технологический университет Сириус»,
354340 г.мт Сириус, Краснодарский край, Россия: электронная почта: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 05.01.2024

После доработки 29.02.2024

Принята к публикации 12.03.2024

Образование транзиторных белковых комплексов в ответ на активацию клеточных рецепторов является общим механизмом ответа клетки на внешние стимулы. В настоящем обзоре представлена концепция блокировки взаимодействий сигнальных белков пептидными блокаторами, а также описаны имеющиеся к настоящему времени достижения в разработке ингибиторов передачи сигнала, блокирующих сигнал-зависимые белковые взаимодействия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Толл-подобные рецепторы, TIR-домены, сигнальные комплексы, пептидные блокаторы белковых взаимодействий.

DOI: 10.31857/S0320972524050025 EDN: YPFIEI

ВВЕДЕНИЕ

Формирование многокомпонентных структурированных белковых комплексов в ответ на активацию клеточных рецепторов является общим механизмом трансляции клеткой экзогенных сигналов в биологически значимый ответ. Принципы функционирования таких комплексов, часто называемых сигнальными, были концептуально сформулированы ещё к концу прошлого–началу этого века [1, 2]. Существующее концептуальное понимание было дополнено достигнутыми в последние два десятилетия успехами структурной биологии, выявившими тонкую структуру многих олигомерных комплексов, состоящих из сигнальных белков или из их отдельных доменов, с разрешением, достаточным для визуализации положения отдельных атомов [3]. Эти знания существенно рас-

ширили понимание механизмов сборки сигнальных комплексов и их функционирования. Вместе с тем признаётся, что накопленные к настоящему времени сведения в значительной степени фрагментарны и не отражают динамики существования реальных комплексов. Также, поскольку большинство комплексов разрешено с использованием рекомбинантных методов, существует проблема верификации физиологически значимых структур.

Образование сигнальных комплексов в подавляющем большинстве случаев осуществляется специализированными белковыми доменами, зачастую называемыми доменами взаимодействия белков (ДВБ) [2, 4]. Некоторые ДВБ, такие как SH2, SH3 или бромодомены, распознают специфические характеристические особенности или короткие мотивы, присутствующие в первичной структуре

Принятые сокращения: АМП – антимикробный пептид; БП – блокирующий пептид; ВВ-петля – петля между вторым тяжом и второй α-спиралью; ДВБ – домен взаимодействия белков; ДС – домен (клеточной) смерти; ПП – проникающий пептид; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; IL – интерлейкин; IL-1R – рецептор интерлейкина 1; LPS – липополисахарид; MAP – митоген-активируемая протеинкиназа; MyD88 – Myeloid differentiation primary response protein 88; TIR – домен гомологии Толл-белка насекомых, IL-1R человека и белков устойчивости растений; TIRAP – TIR-containing adapter protein, также называемый Mal; TLR – Толл-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухолей; TRAM – TRIF-related adapter molecule, также известный под наименованием TICAM-2; TRIF – TIR domain-containing adapter inducing IFN-β, также называемый TICAM-1.

белков; тогда как домены другого типа, примерами которых являются TIR-домены (домены гомологии Толл-белка насекомых, IL-1R человека и белков устойчивости растений) или домены смерти (ДС), не имеют специфического мотива связывания. ДВБ последнего типа характеризуются способностью одновременно устанавливать множественные кооперативные взаимодействия с доменами своего типа как гомо-, так и гетеротипически [5, 6]. Опубликованные к настоящему времени структуры сигнальных комплексов демонстрируют как их широчайшее топологическое разнообразие, так и фактическую уникальность сайтов, осуществляющих индивидуальные бинарные взаимодействия компонентов внутри олигомерных комплексов [3]. Структурное разнообразие сигнальных комплексов включает в себя как линейные двуцепочечные комплексы, образуемые TIR-доменами активированных Толл-подобных рецепторов (TLR) и их адаптерных белков, а также рецепторами семейства рецептора интерлейкина 1 (IL-1R) [7, 8], так и спиральные комплексы различной структуры. Имеющиеся к настоящему времени примеры топологий спиральных комплексов включают в себя как одно-, так и двуцепочечные спирали и представлены такими комплексами, как Myddosome [9], PIDDosome [10], MDA5-MAVS [11], инфламасомы [12–14] и другие [3, 15, 16].

Сигнальные пути клеток являются важнейшей фармакологической мишенью. Этот тезис, в частности, подтверждается достигнутым в последние 25 лет клиническим успехом терапевтических антител, направленных как на блокировку активирующих сигнальные пути клеточных рецепторов, так и на блокировку цитокинов, функционально являющихся циркулирующими активаторами регулирующих иммунный ответ рецепторов [17–19]. Другим указанием на важность сигнальных путей как фармакологической мишени является то, что малые молекулы, блокирующие сайты связывания лиганда рецепторами, сопряжёнными с G-белком, составляют значительную часть имеющегося пула лекарственных средств [20–23]. Ввиду того, что малые молекулы оказались не столь эффективными для блокады рецепторов, активируемых макромолекулами (такими как цитокины или экзогенные молекулы патогенов), а также того, что многие сигнальные пути не имеют свободно циркулирующих агонистов, блокировка сигнальных путей посредством нарушения сборки сигнальных комплексов представляется перспективным подходом к созданию новых фармакологических препаратов. Однако следует отметить, что практический успех в создании лекарственных препаратов с таким механизмом действия к настоящему времени ограничен. Вместе с тем значительный пласт экспериментальных данных, полученных как *in vitro*

с использованием культивируемых клеток, так и на различных моделях *in vivo*, указывает на то, что направленная разработка ингибиторов передачи сигнала с активированных рецепторов посредством блокировки сборки сигнальных комплексов возможна. Поскольку сборка сигнальных комплексов в большинстве случаев осуществляется за счёт взаимодействий ДВБ [2], ДВБ и белковые взаимодействия, осуществляемые за счёт ДВБ, являются наиболее частой мишенью ингибиторов, разработанных к настоящему времени. В настоящем обзоре мы рассмотрим имеющиеся достижения в разработке ингибиторов сборки сигнальных комплексов, а также оценим перспективы и сложности создания фармакологических агентов на основе таких ингибиторов.

КОНЦЕПЦИЯ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ ТРАНЗИТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Многочисленные примеры (многие из которых будут рассмотрены ниже) показывают, что относительно короткие пептиды, соответствующие линейному фрагменту первичной белковой последовательности, формирующему сайт функционально значимого белок-белкового взаимодействия, способны блокировать функцию белка-прототипа. Механизм действия таких пептидов, зачастую называемых блокирующими пептидами (БП) или пептидами-приманками (от английского decoy peptides), заключается в том, что блокирующий пептид связывает и блокирует сайты взаимодействия белка-прототипа с белками-партнёрами, таким образом предотвращая формирование функционально значимого комплекса и, как следствие, ингибируя подлежащую функцию (рис. 1). Поскольку сборка сигнальных комплексов является внутриклеточным процессом, помимо сегмента, имитирующего сайт связывания на белке-прототипе, функциональный блокатор сборки сигнального комплекса должен содержать сегмент, обеспечивающий проникновение всей конструкции в клетку. В качестве агента, обеспечивающего трансмембранный перенос блокатора, наиболее часто используются пептидные векторы, взятые либо из натуральных белков, обладающих способностью проникать через плазматические мембраны клеток, либо искусственно созданные аминокислотные последовательности. Пептидные блокаторы взаимодействий, осуществляемых цитоплазматическими белками, таким образом, состоят из двух функциональных частей: специфической части, обеспечивающей связывание с белками-мишенями, и пептидного вектора, необходимого для проникновения всей конструкции в клетку.

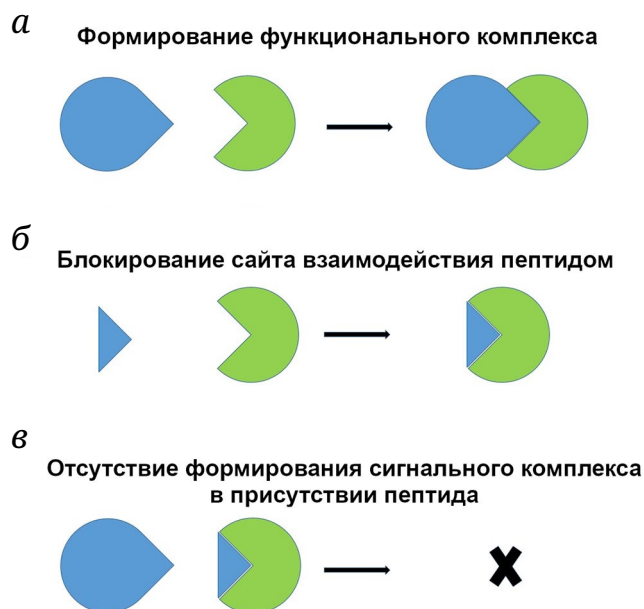


Рис. 1. Механизм действия блокирующих пептидов – предотвращение формирования белкового комплекса за счёт конкуренции с белком-прототипом за функциональный сайт связывания. *а* – Взаимодействие ДВБ1 (голубая фигура) и ДВБ2 (зелёный сектор) приводит к формированию функционального бинарного комплекса. *б* – Пептид, соответствующий сайту связывания ДВБ1 с ДВБ2, (голубой треугольник) сохраняет способность связываться с ДВБ2. *в* – Связывание пептида с ДВБ2 предотвращает формирование комплекса ДВБ1–ДВБ2

Ниже мы рассмотрим типичные характеристики этих двух частей отдельно.

Дизайн мишень-связывающего сегмента блокирующих пептидов. Функциональное назначение этой части пептида – блокировка сайтов связывания белка-прототипа партнёрами по взаимодействию и, как следствие, предотвращение формирования сигнального комплекса (рис. 1). В случаях, когда сайт взаимодействия белка известен, дизайн прототипа блокирующего пептида представляется очевидным. Однако следует отметить, что, как показывают результаты скрининга библиотек пептидов, значительная часть пептидов, соответствующих сайту связывания, может не проявлять ингибирующей активности в тестах на культуре клеток или *in vivo* [24–26]. Наиболее частыми причинами отсутствия функциональной активности в таких случаях оказываются такие факторы, как неспецифическое связывание пептида компонентами протеома клетки, недостаточная растворимость пептида, негативное влияние мишень-связывающей части на проницаемость пептида, биологическая нестабильность пептида и другие факторы [27]. В случаях, когда границы сайтов взаимодействия не известны точно, ингибирующие последовательности определяются путём

скрининга библиотек пептидов или же подбираются эмпирически [5, 26, 28]. При эмпирическом выборе блокирующего сегмента или при дизайне библиотеки пептидов следует учитывать типичные размеры сайтов, осуществляющих транзиторные взаимодействия сигнальных белков. Общие характеристики сайтов взаимодействий белков достаточно хорошо изучены и описаны в серии исследований [29–32]. Анализ известных структур сигнальных комплексов, образованных ДВБ, подтверждает общие закономерности и уточняет, что площадь бинарных взаимодействий в таких комплексах находится в нижней половине диапазона размеров сайтов взаимодействия белков в транзиторных комплексах и составляет 250–800 Å² [7–9, 33]. Принимая во внимание то, что циркулярность сайтов взаимодействия глобулярных белков высока и составляет в среднем 0,7 [29], верхняя оценка размера условного сайта бинарного взаимодействия в сигнальном комплексе соответствует кругу диаметром ~30 Å. Альфа- или 3₁₀-спирали такой протяжённости соответствовали бы пептиду, состоящему из 20 или 15 а.о., тогда как пептид такой же длины в конформации тяжёлый β-листа состоял бы из 8–9 а.о. [34]. Следует отметить, что эти упрощённые оценки достаточно точно описывают диапазон размеров мишень-связывающего сегмента экспериментально подтверждённых блокирующих пептидов [26, 27].

Векторы, обеспечивающие внутриклеточную проницаемость блокирующих пептидов. Наиболее часто используемыми векторами для переноса БП внутрь клеток являются пептидные векторы. Основа для использования пептидных векторов для транспорта макромолекул через плазматическую мембрану клеток была заложена во второй половине 80-х гг. прошлого века открытием естественной способности транскриптора транскрипции (Tat), белка, кодируемого вирусом иммунодефицита человека, проникать через плазматические мембраны [35, 36]. Вслед за этим открытием аналогичная способность проникать через клеточные мембраны была обнаружена у белка мушек дрозофил Antennapedia homeodomain (Antp) [37]. Вскоре было показано, что проникающая способность Antp обеспечивается за счёт присутствия относительно короткого сегмента первичной последовательности (16 а.о.), формирующего третью α-спираль этого белка [38]. Позднее функционально аналогичные короткие последовательности (будем называть их проникающие пептиды (ПП)) были обнаружены в Tat и других белках, способных проникать через клеточные мембраны [39–42]. В настоящее время насчитывают более 1000 известных ПП различных классов [43, 44]. Помимо ПП, обнаруженных в природных белках, известны и искусственно

созданные ПП [40, 42, 45]. На основании различий в физико-химических свойствах выделяют следующие классы ПП: катионные, гидрофобные, а также амфипатические, включающие в себя как катионные, так и гидрофобные участки [45]. Примерами катионных пептидов являются проникающие последовательности белков Tat (RKKRRQRRR), Antp (RQIKIWFQNRRMKWKK), а также других членов семейства, способных к интернализации транскрипционных факторов, содержащих гомеодомен [42, 46]. К этой же группе относятся и некоторые искусственные последовательности, такие как олигоаргинины или олиголизины [45, 47]. Примером амфипатического ПП является транспортан, искусственно созданная комбинация двух фрагментов природных белков [48]. Гидрофобные ПП встречаются реже, и они менее чувствительны к аминокислотным заменам [45]. Отмечалась меньшая эффективность гидрофобных ПП по сравнению с ПП других классов.

Механизмы интернализации ПП по-прежнему остаются предметом дискуссий в литературе [42, 49]. Общеизвестным является то, что ПП интернализируются посредством как эндоцитоза с последующим выходом из эндосом, так и прямого взаимодействия с плазматической мембраной, причём отдельные ПП могут использовать множественные механизмы проникновения, важность отдельных из которых различается как для индивидуальных пептидов, так и для клеточных линий. Вместе с тем ПП не используют специальных белковых переносчиков для проникновения в клетку, чем объясняется универсальность их действия в отношении клеток различных типов. Длина использовавшихся ПП варьирует в диапазоне 5–30 а.о. Помимо белков и пептидов, ПП способны переносить внутрь клеток макромолекулярные соединения различной природы, включая нуклеиновые кислоты, медицинские препараты и контрастные вещества, а также сложные молекулярные структуры, такие как липосомы или наночастицы [45, 49, 50]. Пептидные векторы эффективны для внутриклеточного транспорта различных веществ не только в монослое культивируемых клеток. Многочисленные исследования показывают, что ПП также повышают тканевую проницаемость, включая проницаемость через гематоэнцефалический барьер. Так, уже в ранней работе Schwarze et al. [51] было показано, что Tat-пептид обеспечивает проникновение введённой интраперитонеально β -галактозидазы, белка размером 120 кДа, во все ткани мышей, включая мозг. Результаты последующих работ подтвердили эффективность ПП для внутриклеточного транспорта карго различной природы *in vivo*, а также показали широкое распределение по органам как при интраперитонеальном, так и при внутривенном

введении [52–55]. Вместе с тем отмечалось преимущественное накопление ПП в печени и почках, тогда как накопление в мозге и мышцах было существенно меньше [53, 54].

Отметим, что типичные рабочие концентрации ПП при применении в культуре клеток находятся в достаточно узком диапазоне, варьируя от 1–5 мкМ до 50–100 мкМ, для широкого спектра ПП, транспортируемых агентов, а также клеточных линий [26]. Наиболее вероятной причиной существования нижнего предела эффективных концентраций является низкая эффективность транспорта при меньших концентрациях ПП. Подтверждением такого обоснования являются наблюдения значительно более высокого сродства блокирующих пептидов к их белку-мишени *in vitro* по сравнению с эффективной концентрацией в культуре клеток. В качестве примера можно привести TLR-блокирующий пептид 2R9, константа связывания которого с мишенью, TIR-доменом адаптерного белка TIRAP, составляла ~40 нМ, тогда как эффективная концентрация в культуре макрофагов была примерно в 500 раз выше [56]. Существование верхнего предела используемых на клетках концентраций ПП обусловлено цитотоксичностью, зачастую наблюдаемой при использовании БП в концентрациях, превышающих 100 мкМ, что связано с их мембранотропным действием и способностью формировать мембранные поры при высоких концентрациях.

Другим проявлением мембранотропных свойств ПП являются антимикробные свойства, основывающиеся на сходстве их физико-химических свойств со свойствами так называемых «антимикробных пептидов» [57, 58]. Антимикробными пептидами (АМП) называют природные пептиды, кодируемые геномами как растений, так и животных как элемент системы противомикробной защиты, эффективный против патогенов различных классов, включая бактерии, вирусы и грибы [59]. Оба класса пептидов, как ПП, так и АМП, в основном представлены катионными пептидами, включающими в себя значительную долю гидрофобных аминокислотных остатков [57, 60, 61]. И хотя механизмы бактерицидного действия АМП, вероятно, множественны, как ПП, так и АМП проявляют меньшую цитотоксичность в отношении животных клеток по сравнению с активностью в отношении прокариот.

Несмотря на огромный прогресс в открытии новых ПП, наиболее часто используемыми векторами остаются 2 ПП, открытые первыми: Tat-пептид и вектор из Antp, часто называемый в литературе пенетратин. Следует отметить, что относительная эффективность этих векторов варьирует в различных системах и зависит от клеточной модели и природы молекулярной мишени:

в одних системах Tat оказывается более эффективным, в других – более эффективен пенетратин. Однозначное и верифицируемое объяснение данного наблюдения в литературе отсутствует, и первичный выбор ПП осуществляется исследователями эмпирически. Одним из удобств использования пенетратина является простота квантификации содержащих его БП. Пенетратин содержит аминокислотные остатки триптофана, соответственно его концентрацию можно определять спектрофотометрически, тогда как такая возможность для БП, содержащих Tat, зависит от присутствия поглощающих ароматических аминокислотных остатков в блокирующей части пептида. Следует отметить, что природные последовательности, обеспечивающие проникновение белков в клетку, в высокой степени эволюционно сохранены. Так, проникающая последовательность белка дрожжевой дрожжи *Antp* на 100% сохранена в гомологичном белке человека [62]. Высокая степень эволюционной сохранности проникающих последовательностей отражает их биологическую значимость для функции белков-носителей.

В заключение этого раздела статьи отметим, что концепция блокирующих пептидов основывается на часто наблюдаемой способности пептидов, соответствующих отрезку первичной последовательности белка, формирующему сайт (или значительную часть сайта) функционального белок-белкового взаимодействия, связывать белок-партнёр по взаимодействию и тем самым блокировать функцию белка-прототипа. Концепция БП применима к внутриклеточным мишеням за счёт использования пептидных векторов, способных осуществлять перенос специфической блокирующей части пептида внутрь клеток. Наибольшее число имеющихся на настоящее время успешных примеров применения БП относится к блокировке взаимодействий, осуществляемых ДВБ, белковыми доменами, специализирующимися на осуществлении сигнал-зависимых белковых взаимодействий.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Первые успешные попытки модулировать биологические функции с помощью синтетических БП можно отнести к 90-м гг. прошлого века. Мишенью первых экспериментальных работ были внеклеточные взаимодействия белков. Так, различные варианты пептидов, содержащих связывающий интегрин мотив (RGD), использовались в качестве агентов для блокировки клеточной адгезии в попытках разработки инновационных медицинских препаратов [63]. Другим ранним примером реализации концепции блокирова-

ния функциональных белковых взаимодействий является ингибирование протеинкиназы Akt пептидами-псевдосубстратами, а также пептидом, содержащим тяж β A взаимодействующего с Akt белка TCL1 [64, 65]. Применение пептидных векторов, обеспечивающих проникновение в клетку, в сочетании с сегментом, обеспечивающим связывание мишени, существенно расширило область применения методологии блокирующих пептидов. Так, пептиды, блокирующие олигомеризацию NEMO (nuclear factor kappa-B (NF- κ B) essential modulator), а также пептиды, соответствующие NEMO-связывающему домену IKK, ингибировали активацию NF- κ B, индуцированную фактором некроза опухолей (TNF) или липополисахаридом (LPS) [66–68]. В исследовании Borsello et al. [69] использовался пептид (10 а.о.), состоящий из последовательности белка Tat вируса иммунодефицита человека в сочетании с JNK-связывающим мотивом белка (20 а.о.), взаимодействующего с JNK 1 (JNK interacting protein 1). Интересно, что как L-, так и D-изомеры этого пептида блокировали киназную активность JNK и оказывали нейропротекторное действие в моделях ишемии мозга [69]. Другим примером белкового сегмента, блокирующего активность митоген-активируемых протеинкиназ (MAP), является участок последовательности киназы MEK1 (13 а.о.), который эффективно ингибировал активность киназ ERK [70]. Примером успешной реализации концепции блокирующих пептидов в отношении рецепторов, сопряжённых с G-белком, является пептид, включающий C-концевой сегмент белка G_{α_s} в связке с пенетратином. Этот пептид специфически ингибировал продукцию cAMP, стимулированную агонистами адренорецепторов [71].

Значительное количество исследований было посвящено разработке ингибиторов TLR. Horng et al. [72] были первыми, кто использовал синтетические проникающие пептиды для ингибирования TLR. Авторы показали, что пептид, состоящий из BB-петли (петля между вторым тяжом и второй α -спиралью) TIR-домена адаптерного белка TIRAP в связке с пенетратином, блокирует индуцированную LPS активацию NF- κ B и MAP-киназ в макрофагальной линии клеток. Этот пептид, однако, не проявлял подобной активности при стимуляции клеток агонистом TLR9 или IL-1 [72]. TIRAP-пептид также селективно блокировал TLR4-зависимые продукцию цитокинов и созревание дендритных клеток [72]. В другом исследовании сравнивались эффекты аналогичных пептидов, блокирующие части которых состояли из гомологичной BB-петли TIR-доменов всех известных адаптерных белков, участвующих в передаче сигнала с TLR [73]. Это и другие исследования показали, что пептиды, включающие в себя

петлю BB TIR-домена адаптерных белков MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN- β , также называемый TICAM-1) и TRAM (TRIF-related adapter molecule, также называемый TICAM-2), также обладают ингибиторным действием, в значительной степени подавляя сигнальную функцию TLR [41, 73–76]. Вместе с тем отмечались различия в эффективности отдельных адаптерных пептидов и сообщалось, что ингибиторное действие пептида, содержащего последовательность адаптерного белка TRAM, было наиболее выражено [73]. Пептидомиметик, имитирующий центральную часть БП, происходящего из BB-петли TRAM [55, 73], оказывал кардиопротекторное действие в мышинной модели инфаркта миокарда, что интерпретировалось авторами как проявление ингибирования TLR4-зависимого воспаления [77]. В последующем исследовании та же группа авторов подтвердила, что димерный пептидомиметик, имитирующий BB-петлю TRAM, дозозависимым образом ингибирует индуцированную LPS транскрипцию IFN- β и CXCL10 [78]. Вместе с тем отмечалась неполная специфичность действия этого агента, поскольку также ингибировалась продукция IFN- β , индуцированная агонистами TLR8 и MDA5/RIG-I [78]. Пептиды, соответствующие BB-петле рецепторов TLR2 и TLR4, аналогичные по дизайну адаптерным BB-пептидам, также блокировали активность рецепторов-прототипов и проявляли кросс-реактивность, тогда как пептид, содержащий гомологичную последовательность из TLR1 или TLR6 (эти белки не индуцируют сигналинг самостоятельно, а только при гетеродимеризации с TLR2), не обладал биологической активностью [79].

Следующим этапом в развитии методологии блокирующих пептидов стало использование скрининга библиотек пептидов, соответствующих вероятным сайтам взаимодействия доменов взаимодействия белков. Основой для этого подхода послужило возникшее понимание множественности функциональных сайтов взаимодействия, присутствующих на ДВБ, вместе с отсутствием точной информации о локализации таких сайтов. Первой работой, в которой были представлены результаты скрининга библиотеки пептидов, полно представляющих поверхность ДВБ, стал скрининг пептидов TIR-домена TLR4 [5]. Библиотека состояла из 11 пептидов, блокирующая часть каждого из которых состояла из сегмента первичной последовательности TIR-домена TLR4, представляющего нефрагментированную часть поверхности домена. В качестве проникающей последовательности использовался пенетратин. Результаты работы валидировали предложенный подход, косвенно подтвердив предположение о множественности сайтов взаимо-

действия, присутствующих на TIR-доменах. Было идентифицировано 5 пептидов, проявлявших ингибирующее действие в отношении индуцированной LPS активации MAP-киназ и факторов транскрипции, а также экспрессии цитокинов [5]. Ингибирующее действие проявляли пептиды, соответствующие участку, соединяющему TIR-домен с трансмембранным участком TLR, петлям AB и BB, а также α -спиралям B и D (рис. 2, а и б) [5]. В последующей работе авторы проскринировали аналогичным образом созданную библиотеку пептидов адаптерного белка TIRAP [80]. Скрининг выявил 5 активных пептидов, происходящих из следующих структурных элементов TIR-домена: петля AB, а также α -спирали B, C, D и E [80]. Интересно, что активность использовавшегося в этой работе пептида, представляющего петлю BB (пептид TR4), но не включающего лишь один аминокислотный остаток ранее использовавшегося TIRAP BB-пептида [72], была существенно меньше. В последующих работах были скринированы библиотеки TIR-доменов адаптерных белков MyD88-независимого пути, TRAM и TRIF [55, 81]. В обеих библиотеках было обнаружено по 2 активных пептида. В дополнение к ранее обнаруженным пептидам, происходящим из петли BB обоих адаптерных белков [73], ингибирующей активностью обладали пептид TM6 из третьей спирали TRAM и пептид TF5 из второй спирали TRIF [55, 81]. Используя делеционный анализ, авторы идентифицировали транкированные варианты (9 а.о.) блокирующих пептидов TM6- Δ C и TF5- Δ C, которые практически полностью сохраняли ингибиторную активность своих прототипов. Проведенные в последующих работах скрининги пептидных библиотек TIR-доменов рецепторов TLR2, корецепторов TLR2 (TLR1 и TLR6), а также TLR9, TLR7 и TLR5 выявили дополнительные ингибиторные последовательности в каждой из библиотек [25, 26, 56, 82, 83]. На основании анализа взаимного расположения сегментов, представляющих активные БП на поверхности TIR-доменов, было предложено, что активные пептиды происходят из 4-х топологически сохранных сайтов TIR-TIR-взаимодействий, ответственных за сборку сигнальных комплексов активированными TLR (рис. 2) [26, 83–85]. Два сайта (S1 и S4) расположены на противоположных сторонах TIR-домена в районах краевых тяжей β -листа. В дополнение к аминокислотным остаткам, формирующим тяж B, сайт S1 может быть представлен сегментами петель AB и/или BB, а также (в случае рецепторов TLR2, TLR4 и TLR7) сегментом, соединяющим TIR с трансмембранной спиралью [5, 24, 26]. Сайт S4 представлен пептидами, соответствующими тяжю E, а также прилегающей к тяжю E α -спиралью E [24–26]. Сайты S2 и S3 образованы тремя спиральными участками, прилегающими к β -листу

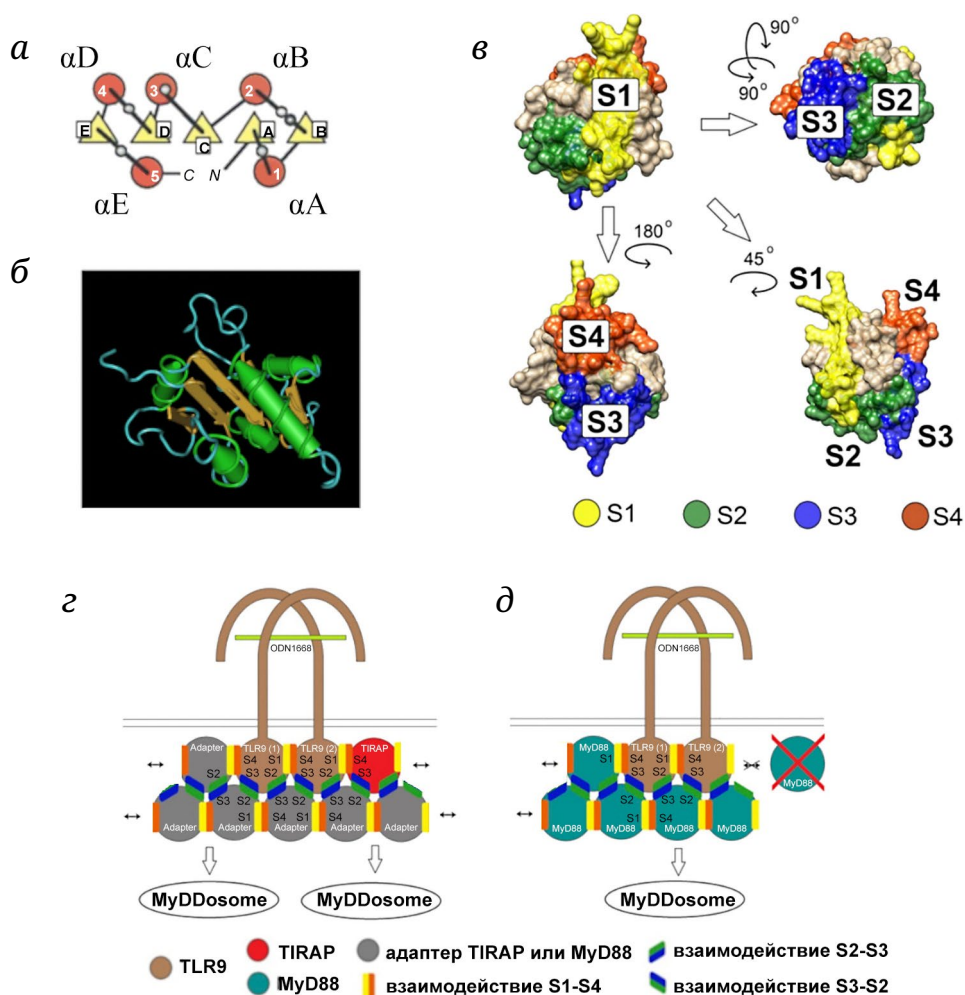


Рис. 2. Структура TIR-доменов, позиции участков, соответствующих ингибиторным БП, и предполагаемая архитектура комплексов, образуемых TIR-доменами при активации TLR. *а* – Схема, показывающая вторичную структуру TIR-доменов [84]. TIR-Домены принадлежат к классу α/β белковых доменов, вторичная структура которых образована β -тяжами, чередующимися с α -спиральными участками [84]. Согласно наиболее часто используемой номенклатуре, элементы вторичной структуры TIR-доменов обозначаются в алфавитном порядке, начиная с N-конца. Например, βA и βE (показаны на панели (а) треугольниками) обозначают первый и пятый тяжи, а αB и αD – вторую и четвертую спирали (показаны на схеме коричневыми кружками). Петли обозначаются двумя заглавными буквами соответственно элементам, которые они соединяют. Например, петля BB соединяет второй тяж со второй спиралью, а петля DE – четвертую спираль с пятым тяжом. *б* – Третичная структура TIR-домена TLR2 человека [85]. Типичный TIR-домен включает в себя 5 тяжей, уложенных в параллельный β -лист, формирующий сердцевину домена. α -Спирали располагаются по обе стороны листа – первая и последняя располагаются с вогнутой стороны листа; вторая, третья и четвертая располагаются на его выпуклой стороне. *в* – 4 сайта связывания TIR-доменов, осуществляющие димеризацию TIR-доменов рецепторов и рекрутирование адаптерных белков, обозначены на рисунке как S1–S4. Сайты S1 и S4 расположены на противоположных концах TIR-домена, в районах краевых тяжей β -листа. Сайты S2 и S3 располагаются в одной полусфере. Сайт S2 формируется спиралями B и/или C; сайт S3 – спиралью D вместе с прилегающими петлями [26, 83]. *з* – Схема взаимодействия TIR-доменов в формирующемся сигнальном комплексе при активации TLR9 в присутствии обоих адаптеров MyD88-зависимого пути, TIRAP и MyD88. Сайты S1 и S4, реципрокно взаимодействуя, образуют связи внутри каждой из цепей двуцепочечной структуры комплекса, тогда как сайты S2 и S3 формируют межцепочечные связи [83]. *д* – Схема взаимодействия TIR-доменов в сигнальном комплексе при активации TLR9 при отсутствии TIRAP [83]

с его выпуклой стороны: спиралями B, C и D. Спираль B и/или C образуют сайт S2; спираль D – сайт S3 (рис. 2, в) [26, 83]. Предложено, что сборка первичного сигнального комплекса активированными TLR осуществляется за счёт TIR–TIR-взаимодействий, осуществляемых за счёт связывания

сайта S1 с сайтом S4, а также сайта S2 с сайтом S3 (рис. 2, з и д) [26, 83]. Последнее положение также основывается на результатах структурного анализа олигомерных комплексов, спонтанно образуемых *in vitro* рекомбинантными TIR-доменами адаптерных белков TIRAP и MyD88 [7, 8].

Помимо стратегий дизайна блокирующих пептидов, основывающихся на мимикрии сайтов взаимодействия белков эукариот, также использовались стратегии, основывающиеся на способности некоторых бактериальных и вирусных патогенов блокировать антимикробную защиту высших животных посредством белков, связывающих компоненты иммунной системы [86, 87]. Одним из примеров таких белков являются белки вируса коровьей оспы A46R и A52R, обладающие способностью связывать TIR-домены как TLR4, так и адаптерных белков, передающих сигнал с TLR4, тем самым блокируя сборку сигнальных комплексов [88, 89]. В обоих вирусных белках были идентифицированы короткие пептиды, способные ингибировать TLR. Так, конъюгированный с поли-аргининовым вектором пептид P13 из белка A52R эффективно ингибировал продукцию цитокинов, индуцированную агонистами TLR3, TLR4 и TLR7 в культуре клеток, а также снижал летальность мышей в модели септического шока, индуцированной введением LPS и D-галактозамина [90, 91]. Скрининг пептидов, представляющих участки A46R, ответственные за ингибирование TLR4 полноразмерным белком, выявил пептид, способный ингибировать TLR4 в культуре клеток в концентрации 1–5 мкМ [28]. Этот пептид, названный авторами VIPER, был специфичен к TLR4 и не оказывал ингибирующего действия на TLR2, TLR3 или TLR9. Авторы исследовали влияние аминокислотных замен на активность VIPER. Интересно, что замена одной аминокислоты в любой из позиций за исключением центрального лейцина не оказывала существенного влияния на ингибиторную активность пептида [28].

Было показано, что содержащие TIR-домен бактериальные факторы вирулентности TspV и TspC обладают способностью ингибировать TLR за счёт связывания адаптерного белка MyD88 [92]. Snyder et al. [93] тестировали пептиды, соответствующие петлям BB и DD TIR-домена белка TspC уропатогенного штамма *Escherichia coli*. Оба пептида подавляли индуцированную LPS активацию макрофагов. Используя иммунопреципитацию, авторы показали, что BB-пептид связывает TLR4, а DD-пептид – MyD88 [93]. Ke et al. [94] скринировали библиотеку пептидов TIR-домена белка TspV (TIR-containing protein in *Brucella*). Скрининг выявил 2 пептида, TB-8 и TB-9, ингибирующих ответ на LPS в моделях *in vitro* и *in vivo* [94].

Методология блокирующих пептидов также применялась в попытках разработки антивирусных агентов, предотвращающих проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку [95]. Предлагались пептиды, происходящие как из вирусного белка Spike, так и из белка ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), являющегося рецептором, связываю-

щим Spike и необходимым для вхождения вируса в клетку хозяина [95]. На основании известной структуры комплекса Spike–ACE2 Loi et al. [96] создали серию коротких пептидов, происходящих из различных сайтов взаимодействия белка Spike с ACE2, и показали, что эти пептиды снижают связывание вируса с экспрессирующими ACE2 клетками при применении Spike-пептидов как по отдельности, так и (более эффективно) в составе коктейля из нескольких пептидов.

В заключение раздела, дающего функциональную характеристику известных БП, можно констатировать, что пептидные блокаторы могут быть направлены на блокировку как внеклеточных взаимодействий белков, так и взаимодействий сигнальных белков, находящихся в цитоплазме. В последнем случае требуется дополнение блокирующей части пептида пептидным вектором, обеспечивающим трансмембранный перенос. Блокировка функции трансмембранных рецепторов, располагающихся на плазматической мембране или на мембране эндосом, реализуема как за счёт блокировки взаимодействий, осуществляемых непосредственно рецепторами, так и за счёт блокировки индуцированных активацией рецептора взаимодействий адаптерных и эффекторных белков, располагающихся в цитоплазме. Опубликованные работы также показывают, что скрининг библиотек пептидов, созданных на основе последовательностей ДВБ, оказывается наиболее продуктивным вследствие множественности сайтов связывания, типично присутствующих на ДВБ. Ещё одним общим наблюдением при анализе опубликованных работ является достаточно узкий диапазон рабочих концентраций БП, направленных на блокировку внутриклеточных мишеней. Эффективная рабочая концентрация в культуре клеток для подавляющего большинства известных пептидов находится в диапазоне 5–40 мкМ, что, по-видимому, определяется эффективностью трансмембранного переноса пептидными векторами.

ВЕРИФИКАЦИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Концепция блокирующих пептидов основывается на предположении, что БП в значительной степени сохраняют специфичность и аффинность взаимодействий полноразмерного белка-прототипа. На практике, однако, БП идентифицируют не по связыванию с мишенью в системе *in vitro*, а в функциональных тестах либо путём скрининга, либо используя предсуществующее знание о положении сайта взаимодействия, необходимого для выполнения ингибируемой функции. Очевидно, что верификация механизма действия БП,

идентифицированных по ингибированию функции, должна включать подтверждение прямого связывания БП с белком-мишенью и/или блокировку пептидом взаимодействия мишени с полноразмерным белком-прототипом пептида. К настоящему времени имеются данные, подтверждающие такой механизм действия для значительного числа БП. Так, в одной из ранних работ методом иммунопреципитации было показано, что пептид, соответствующий петле BB TIR-домена MyD88, предотвращает димеризацию MyD88 [97]. Piao et al. [56], используя дот-блоттинг, позднее показали, что пептид из BB-петли TIR-домена MyD88, кроме MyD88, связывает и TIR-домены TIRAP и TLR9. Другим примером мультиспецифического связывания является пептид 7R11, соответствующий пятой спирали TIR-домена TLR7 (сайт S4; рис 2, в). 7R11 связывал TIR-домены как MyD88, так и TIRAP, но не контрольный белок; тогда как пептид 7R9 из 4-й спирали TIR-домена TLR7 (сайт S3; рис 2, в) связывал TIRAP, но не MyD88 или контрольный белок [24]. Более поздние исследования показали, что многие БП, происходящие из TIR-доменов, демонстрируют мультиспецифическое связывание, взаимодействуя со специфической подгруппой TIR-доменов, что повторяет свойства полноразмерных ДВБ как класса белков [26]. Эти наблюдения показывают, что БП могут связывать несколько мишеней, что в совокупности и определяет функциональные свойства того или иного пептида.

Вместе с тем отмечались и определённые закономерности в специфичностях связывания БП, происходящих из ДВБ. Так, БП, соответствующие 4-й спирали TIR-домена TLR, взаимодействовали с TIR-доменами адаптерных белков, но не с TIR-доменами рецепторов [26]. Так, пептид 4R9 (спираль D TLR4) не связывал TIR-домены TLR4 и TLR2 [5], но взаимодействовал с TIR-доменом адаптера TIRAP [81]. Пептид 2R9 (4-й спиральный регион (спираль D) TIR-домена TLR2) также преимущественно взаимодействовал с TIR-доменом TIRAP, но не с TIR-доменами TLR1, TLR4, TLR6 или TLR9 [56]. Аналогичным образом, БП из 4-го спирального региона рецепторов TLR1 и TLR6 преимущественно взаимодействовали с TIR-доменами адаптерных белков, MyD88 и TIRAP соответственно, а не с TIR-доменом TLR2, являющегося корецептором белков-прототипов этих БП [82]. Другим примером специфичности взаимодействия БП, происходящих из TIR-доменов, является связывание, демонстрируемое пептидами адаптерного белка TRIF, принадлежащего к MyD88-независимому сигнальному пути [81]. Пептид TF4 взаимодействовал с TIR-доменом рецептора TLR4, а TF5 – с TIR-доменами как TLR4, так и TRAM, но ни один из TRIF-пептидов не связывал адаптерные белки MyD88-зависимого пути, TIRAP и MyD88 [81].

Одним из свидетельств, подтверждающих, что связывание белка пептидом действительно является механизмом ингибирования функции этого белка, могло бы стать совпадение кажущейся константы связывания пары белок–БП, измеренной в клеточной системе, с константой ингибирования функции, также измеренной в клеточной системе. Чтобы получить такое подтверждение, наша группа разработала и применила систему, использующую Фёрстеровский резонансный перенос энергии для количественной оценки связывания пептидов с белками-мишенями непосредственно в клетке. Была создана панель плазмид, кодирующих гибридные белки, состоящие из TIR-домена в связке с белковой флуоресцентной меткой. Для оценки связывания пептидов с TIR-доменами флуоресцентно меченные TIR-домены, рассматриваемые как вероятные мишени пептида, эктопически экспрессировались в клетках HeLa, и клетки инкубировались в присутствии блокирующего пептида, меченного флуоресцентным красителем, способным тушить флуоресценцию белковой метки TIR-домена [5, 98]. Связывание пептида с TIR-доменом оценивалось по тушению флуоресценции белковой метки, выражающемуся в снижении времени жизни её флуоресценции. Многочисленные примеры, подробно разобранные в опубликованном ранее обзоре литературы [26], а также в двух статьях, вышедших позднее [24, 25], продемонстрировали практически полное совпадение эффективных концентраций, необходимых для блокирования функции проникающими БП и для тушения ими флуоресценции меченых TIR-доменов. Кажущиеся константы связывания и ингибирования, измеренные в клеточной системе для ингибиторных БП с TIR-мишенями, находятся в диапазоне 1–20 мкМ для всех эффективно связывающихся пар БП–TIR, идентифицированных к настоящему времени [26]. Такой достаточно узкий диапазон эффективных концентраций для достаточно большой группы БП, идентифицированных к настоящему времени, вероятно, является следствием общности механизма проникновения БП через плазматическую мембрану клеток. Подтверждением последнего предположения является то, что БП демонстрируют значительно более высокие константы связывания в *in vitro* тестах, использующих рекомбинантные белки-мишени по сравнению со связыванием в клеточной системе. Так, пептид 2R9 связывался с рекомбинантным TIR-доменом адаптерного белка TIRAP в растворе с $K_D \sim 40$ мкМ, что значительно меньше кажущейся константы диссоциации для этой пары в клеточной системе [56]. Расхождение констант связывания, измеренных *in vitro* и в клеточной системе, также отчасти может объясняться неспецифическим связыванием пептида с вне- и внутриклеточными белками. В частности, было

показано, что 2R9 связывается с сывороточным альбумином с $K_D \sim 1,5$ мкМ [56]. Эксперименты, выполненные с использованием методики поверхностного плазмонного резонанса, подтвердили, что высокое сродство пептидов к TIR-доменам обеспечивается за счёт высокой скорости ассоциации вместе с низкой скоростью диссоциации [56].

В заключение этого раздела можно констатировать, что накопленные к настоящему времени экспериментальные данные подтверждают связывание белков-мишеней блокирующими пептидами как основной механизм действия БП. И хотя некоторые БП, происходящие из ДВБ, подобно их белкам-прототипам, демонстрируют способность к взаимодействию с несколькими белками, представителями своего класса, многие взаимодействия селективны. Одним из примеров селективности таких взаимодействий являются взаимодействия БП, происходящих из α -спирали D TIR-доменов TLR, с TIR-доменами адаптерных белков, вместе с тем, что эти пептиды не взаимодействуют с TIR-доменами рецепторов.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ *in vivo*

Пептидные блокаторы белковых взаимодействий, идентифицированные в экспериментах на культуре клеток, были оттестированы в экспериментах *in vivo*. Следует отметить, однако, что представленные к настоящему времени в литературе примеры использования БП *in vivo* ограничиваются экспериментами на мелких лабораторных животных и в подавляющем большинстве случаев представлены тестированием ингибиторов TLR. В первых попытках модулировать функции TLR *in vivo* с помощью БП использовались пептиды вирусных белков A46R и A52R. Tsung et al. [91] показали, что P13, пептид белка A52R, снижал уровень циркулирующего TNF, индуцированного введением LPS мышам, приблизительно вдвое. Аналогичное действие оказывал пептид VIPER при интравенозном, совместном с LPS введении мышам, снижая циркулирующий IL-12p40 на ~50% по сравнению с контролем [28]. Couture et al. [80] первыми протестировали в мышинной модели блокирующие TLR-пептиды на основе белков млекопитающих. Было протестировано 2 пептида, идентифицированных при скрининге библиотеки адаптерного белка TIRAP, это пептиды из второго и третьего спирального участка последовательности TIRAP, соответственно обозначенные TR5 и TR6. Пептиды вводили мышам интраперитонеально в дозе 10 нмоль/г за час до введения сублетальной дозы LPS. Оба БП, но не контрольный проникающий пептид аналогичной длины, прак-

тически полностью блокировали выброс TNF в кровоток животных в ответ на введение LPS, а также значительно снижали уровни циркулирующего IL-6 [80].

В последующей работе Piao et al. [55] более детально оценили эффективность БП в животной модели. Оценивались ингибирующие пептиды, происходящие из адаптерного белка TRAM, принадлежащего к MyD88-независимому сигнальному пути [99]. Эксперименты подтвердили системную ингибирующую активность, демонстрируемую пептидами при введении мышам. Пептиды, TM4, TM6, а также транкированный пептид TM4- Δ C снижали уровни циркулировавших TNF и IL-6 на ~90% от их пиковых значений [55]. Авторы сравнивали активность пептидов при интраперитонеальном и интравенозном введении. БП достоверно снижали системные уровни цитокинов при обоих способах введения, однако ингибиторная активность пептидов после интраперитонеального введения была выше [55]. Также изучалась эффективность БП при так называемом «терапевтическом введении». В этих экспериментах менялась очерёдность введения БП и LPS, БП вводились через 30 минут после введения LPS, а не за час до него. Эксперименты продемонстрировали значительное снижение уровней циркулирующих цитокинов уже через полтора часа после «терапевтического» введения БП [55]. В другой серии экспериментов этого исследования была оценена способность TRAM-пептидов предотвращать летальность, вызванную введением LPS мышам. Введение пептидов TM4 и TM4- Δ C в дозе 10 нмоль/г за час до введения LPS в дозе 17,5 мкг/г предотвращало летальность в 100% случаев, тогда как пептиды TM6 и TR6 были эффективны в ~65–80% случаев [55]. Выживаемость мышей при терапевтическом введении пептида TM4- Δ C (через 3 часа после введения летальной дозы LPS) ожидаемо снижалась, по сравнению с профилактическим введением, и составляла ~70% против 100%-ной выживаемости при введении пептида за 1 час до введения LPS [55].

В литературе использовались несколько вариантов пептидов, происходящих из третьего спирального участка последовательности TIRAP. Так, Shah et al. [100] использовали пептид MIP2, 8 из 12 а.о. последовательности которого перекрывались с последовательностью TR6, ингибиторного пептида, идентифицированного Couture et al. [80] в оригинальном скрининге библиотеки пептидов TIR-домена TIRAP. MIP2 демонстрировал мультиспецифичный эффект в отношении TLR, ингибируя TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 и TLR9 [100]. Это наблюдение подтвердило и расширило данные исследования Couture et al. [80], в котором влияние TR6 оценивалось только на TLR2 и TLR4. На модели LPS-индуцированного септического шока

было показано, что MIP2 увеличивал 72-часовую выживаемость мышей с 0 до 20–25% [100]. Shah et al. [100] детально изучали эффекты MIP2 в моделях хронических воспалительных заболеваний: псориаза, индуцированного введением имиквимода, агониста TLR7; системной красной волчанки (СКВ), использовавшей мышей линии MRL/lpr, склонных к спонтанному развитию этого заболевания; а также неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), индуцированной диетой с низким содержанием метионина и холина. Авторы сообщают, что 6-дневный курс MIP2 оказывал значительное (сравнимое с эффектом метотрексата) противовоспалительное действие в модели псориаза при применении пептида в низкой дозе (1 нмоль/г), которое, однако, парадоксальным образом снижалось при применении MIP2 в высоких дозах (10 и 20 нмоль/г) [100]. В мышинной модели СКВ 20-дневный курс MIP2 заметно замедлял прогрессирование воспалительных проявлений болезни, тогда как в модели НЖБП длительное применение пептида, хотя и не вызывало снижения печёночных маркеров и гистологических проявлений стеатоза, заметно понижало воспалительные проявления [100]. Другим примером блокирующего пептида, происходящего из третьего спирального участка последовательности TIRAP, является TR667, представляющий эволюционно сохранный сегмент поверхности TIR-домена и отличающийся от MIP2 сдвигом на один аминокислотный остаток к С-концу TIRAP [25]. TR667, подобно MIP2, проявлял мультиспецифические ингибирующие свойства в отношении TLR и ингибировал TLR2, TLR4, TLR5 и TLR9; однако, в отличие от MIP2, не ингибировал TLR7 [25].

В исследовании Piao et al. [56] оценивалась эффективность пептида 2R9 в отношении системной продукции цитокинов, индуцированной агонистами TLR2 и TLR7, а также для подавления цитокинового ответа на способный к репликации патоген (использовался штамм PR8 вируса гриппа H1N1). Предварительные исследования показали, что 2R9, пептид, идентифицированный при скрининге библиотеки пептидов TIR-домена TLR2, мультиспецифичен и блокирует TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 за счёт связывания TIRAP, адаптерного белка, усиливающего передачу сигнала с этих рецепторов [56]. При введении мышам 2R9 достоверно ингибировал цитокиновый ответ как на Pam3Cys (S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-Ser-Lys₄-OH), агонист TLR2, так и на R848 (резиквимод), агонист TLR7, а также на ODN1668, агонист TLR9 [56, 83]. 2R9 также на 80–90% блокировал MyD88-зависимую секрецию TNF, IL-6 и IFN- β культивируемыми перитонеальными макрофагами, инфицированными вирусом гриппа [56]. Избыточная секреция цитокинов мо-

жет служить причиной смертности при острых вирусных инфекциях. Используя такое обоснование, авторы протестировали, будет ли 2R9 снижать летальность мышей, инфицированных вызывающей ~90%-ную летальность дозой вируса гриппа (штамм PR8). Эксперименты показали, что 5-дневный курс ежедневных инъекций пептида, начатых спустя 48 часов после инфицирования вирусом, достоверно снижали смертность [56]. В другой работе, однако, было показано, что эффект от подавления TLR-зависимого иммунного ответа на исход болезни сильно зависит от времени начала терапии [101], причём слишком раннее начало введения подавляющих иммунный ответ агентов может усугублять течение инфекционных болезней.

Представленные работы показывают эффективность БП как для подавления системной продукции цитокинов, индуцированной введением синтетических агонистов специфических рецепторов, так и в более сложных моделях хронического воспаления или воспаления, индуцированного инфекционными агентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних двух десятилетий привели к значительному прогрессу в открытии новых БП и пониманию механизмов их действия. К настоящему времени отработаны методики идентификации БП, оценки специфичности их связывания с мишенями *in vitro* и на клеточных моделях, а также оценки эффективности БП *in vivo*. Показана высокая эффективность методологии блокирующих пептидов для создания ингибиторов сигнальных путей, механизм действия которых заключается в блокировке транзитных взаимодействий сигнальных белков, осуществляемых специализированными белковыми доменами. В экспериментах на мелких лабораторных животных убедительно показана способность БП подавлять системный ответ на стимуляцию определённых рецепторов как при интраперитонеальном, так и при внутривенном введении пептидов. Также имеются примеры эффективности БП при длительном применении для подавления хронических воспалительных процессов. К настоящему времени достигнуто понимание, что мультиспецифичность, демонстрируемая некоторыми БП, важна для понимания их биологических эффектов, а также что она, по-видимому, вносит существенный вклад в эффективность БП в сложных животных моделях.

Несмотря на то что пул известных БП достаточно велик, точные молекулярные детерминанты их ингибиторной активности на данный

момент не установлены. Это обусловлено такими ключевыми факторами, как значительное разнообразие ингибиторных последовательностей, толерантность БП к аминокислотным заменам, множественность сайтов, связывающих отдельные БП, а также отсутствие известных структур комплексов БП с их белками-мишенями. Определение атомной трёхмерной структуры комплексов БП с их белками-мишенями улучшит понимание механизмов распознавания сигнальных белков, а также заложит основание для рациональной оптимизации уже известных БП. Функциональность БП также может быть улучшена за счёт оптимизации проникающих последовательностей для более прицельной доставки блокатора к молекулярной

мишени, а также за счёт использования пептидомиметиков с целью повышения биологической стабильности блокирующих агентов.

Финансирование. Финансирование осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; проект НИР-ИМБ-2102).

Конфликт интересов. Автор является сообладателем авторских прав на коммерческое использование некоторых из описанных в статье пептидов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray, D. (1998) Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 59-75, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.59>.
2. Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science*, **300**, 445-452, <https://doi.org/10.1126/science.1083653>.
3. Wu, H., and Fuxreiter, M. (2016) The structure and dynamics of higher-order assemblies: amyloids, signalosomes, and granules, *Cell*, **165**, 1055-1066, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.004>.
4. Mayer, B. J. (2015) The discovery of modular binding domains: building blocks of cell signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 691-698, <https://doi.org/10.1038/nrm4068>.
5. Toshchakov, V. Y., Szmazinski, H., Couture, L. A., Lakowicz, J. R., and Vogel, S. N. (2011) Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface, *J. Immunol.*, **186**, 4819-27, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002424>.
6. Wu, H. (2013) Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction, *Cell*, **153**, 287-292, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.013>.
7. Ve, T., Vajjhala, P. R., Hedger, A., Croll, T., Dimaio, F., Horsefield, S., Yu, X., Lavrencic, P., Hassan, Z., Morgan, G. P., Mansell, A., Mobli, M., O'Carroll, A., Chauvin, B., Gambin, Y., Sieracki, E., Landsberg, M. J., Stacey, K. J., Egelman, E. H., and Kobe, B. (2017) Structural basis of TIR-domain-assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 743-751, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3444>.
8. Clabbers, M. T. B., Holmes, S., Muusse, T. W., Vajjhala, P. R., Thygesen, S. J., Malde, A. K., Hunter, D. J. B., Croll, T. I., Flueckiger, L., Nanson, J. D., Rahaman, M. H., Aquila, A., Hunter, M. S., Liang, M., Yoon, C. H., Zhao, J., Zatsepin, N. A., Abbey, B., Sieracki, E., Gambin, Y., Stacey, K. J., Darmanin, C., Kobe, B., Xu, H., and Ve, T. (2021) MyD88 TIR domain higher-order assembly interactions revealed by microcrystal electron diffraction and serial femtosecond crystallography, *Nat. Commun.*, **12**, 2578, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22590-6>.
9. Lin, S. C., Lo, Y. C., and Wu, H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling, *Nature*, **465**, 885-890, <https://doi.org/10.1038/nature09121>.
10. Park, H. H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J. K., and Wu, H. (2007) The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation, *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 561-586, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656>.
11. Song, B., Chen, Y., Liu, X., Yuan, F., Tan, E. Y. J., Lei, Y., Song, N., Han, Y., Pascal, B. D., Griffin, P. R., Luo, C., Wu, B., Luo, D., and Zheng, J. (2021) Ordered assembly of the cytosolic RNA-sensing MDA5-MAVS signaling complex via binding to unanchored K63-linked poly-ubiquitin chains, *Immunity*, **54**, 2218-2230.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.008>.
12. Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q. X., Halfmann, R., and Chen, Z. J. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation, *Cell*, **156**, 1207-1222, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.063>.
13. Lu, A., Magupalli, V. G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M. K., Vos, M. R., Schröder, G. F., Fitzgerald, K. A., Wu, H., and Egelman, E. H. (2014) Unified polymerization mechanism for the assembly of asc-dependent inflammasomes, *Cell*, **156**, 1193-1206, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>.
14. Fu, J., and Wu, H. (2023) Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation, *Annu. Rev. Immunol.*, **41**, 301-316, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-021207>.

15. Kagan, J. C., Magupalli, V. G., and Wu, H. (2014) SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 821-826, <https://doi.org/10.1038/nri3757>.
16. Nanson, J. D., Kobe, B., and Ve, T. (2019) Death, TIR, and RHIM: Self-assembling domains involved in innate immunity and cell-death signaling, *J. Leukoc. Biol.*, **105**, 363-375, <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-123R>.
17. Attwood, M. M., Jonsson, J., Rask-Andersen, M., and Schiöth, H. B. (2020) Soluble ligands as drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 695-710, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0078-4>.
18. Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., and Feldmann, M. (2015) Anti-TNF therapy: past, present and future, *Int. Immunol.*, **27**, 55-62, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102>.
19. Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., and de Haan, L. (2012) Monoclonal antibody therapeutics: history and future, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **12**, 615-622, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>.
20. Filmore, D. (2004) It's a GPCR world, *Modern Drug Discov.*, **11**, 24-28.
21. Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*, **93**, 251-258, <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>.
22. George, S. R., O'Dowd, B. F., and Lee, S. P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 808-820, <https://doi.org/10.1038/nrd913>.
23. Chan, W. K. B., Zhang, H., Yang, J., Brender, J. R., Hur, J., Ozgur, A., and Zhang, Y. (2015) GLASS: a comprehensive database for experimentally validated GPCR-ligand associations, *Bioinformatics*, **31**, 3035-3042, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv302>.
24. Javmen, A., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., and Toshchakov, V. Y. (2020) Frontline science: targeting the TLR7 signalosome assembly, *J. Leukoc. Biol.*, **108**, 1697-1706, <https://doi.org/10.1002/JLB.2HI0819-180R>.
25. Javmen, A., Zou, J., Nallar, S. C., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., Gewirtz, A. T., and Toshchakov, V. Y. (2023) TLR5-derived, TIR-interacting decoy peptides to inhibit TLR signaling, *J. Immunol.*, **210**, 1428-1436, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200371>.
26. Toshchakov, V. Y., and Javmen, A. (2020) Targeting the TLR signalosome with TIR domain-derived cell-permeable decoy peptides: the current state and perspectives, *Innate Immun.*, **26**, 35-47, <https://doi.org/10.1177/1753425919844310>.
27. Toshchakov, V. Y., and Vogel, S. N. (2007) Cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides: a novel class of TLR signaling inhibitors and a tool to study topology of TIR-TIR interactions, *Exp. Opinion Biol. Ther.*, **7**, 1035-1050, <https://doi.org/10.1517/14712598.7.7.1035>.
28. Lysakova-Devine, T., Keogh, B., Harrington, B., Nagpal, K., Halle, A., Golenbock, D. T., Monie, T., and Bowie, A. G. (2010) Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule, *J. Immunol.*, **185**, 4261-4271, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002013>.
29. Jones, S., and Thornton, J. M. (1996) Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13-20, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>.
30. Conte, L. Lo; Chothia, C., and Janin, J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites, *J. Mol. Biol.*, **285**, 2177-2198, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>.
31. Nooren, I. M. A., and Thornton, J. M. (2003) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions, *J. Mol. Biol.*, **325**, 991-1018, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01281-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01281-0).
32. Chen, J., Sawyer, N., and Regan, L. (2013) Protein-protein interactions: general trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area, *Protein Sci.*, **22**, 510-515, <https://doi.org/10.1002/pro.2230>.
33. Park, H. H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschoop, J., and Wu, H. (2007) Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex, *Cell*, **128**, 533-546, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.019>.
34. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. (2005) *Физика белка* (В. Я. Дубнова, ред.) 3-е изд., издательство «КДУ», Москва.
35. Green, M., and Loewenstein, P. M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell*, **55**, 1179-1188, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
36. Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, **55**, 1189-1193, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2).
37. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1864-1868, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.
38. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10444-10450, [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34080-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34080-2).
39. Park, J., Ryu, J., Kim, K.-A., Lee, H. J., Bahn, J. H., Han, K., Choi, E. Y., Lee, K. S., Kwon, H. Y., and Choi, S. Y. (2002) Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells, *J. Gen. Virol.*, **83**, 1173-1181, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1173>.

40. Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., and Kim, S. C. (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8245-8250, <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>.
41. Low, W., Mortlock, A., Petrovska, L., Dottorini, T., Dougan, G., and Crisanti, A. (2007) Functional cell permeable motifs within medically relevant proteins, *J. Biotechnol.*, **129**, 555-564, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.019>.
42. Joliot, A., and Prochiantz, A. (2004) Transduction peptides: from technology to physiology, *Nat. Cell Biol.*, **6**, 189-196, <https://doi.org/10.1038/ncb0304-189>.
43. Kauffman, W. B., Fuselier, T., He, J., and Wimley, W. C. (2015) Mechanism matters: a taxonomy of cell penetrating peptides, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 749-764, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.004>.
44. Kardani, K., and Bolhassani, A. (2021) Cpps site 2.0: an available database of experimentally validated cell-penetrating peptides predicting their secondary and tertiary structures, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166703, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.002>.
45. Milletti, F. (2012) Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discovery Today*, **17**, 850-860, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>.
46. Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2022) Shuttling homeoproteins and their biological significance, *Methods Mol. Biol.*, **2383**, 33-44, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_2.
47. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Pept. Res.*, **56**, 318-325, <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
48. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan, *FASEB J.*, **12**, 67-77, <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.1.67>.
49. Sun, Z., Huang, J., Fishelson, Z., Wang, C., and Zhang, S. (2023) Cell-penetrating peptide-based delivery of macromolecular drugs: development, strategies, and progress, *Biomedicines*, **11**, 1971, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071971>.
50. Bechara, C., and Sagan, S. (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.*, **587**, 1693-1702, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
51. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999) *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, *Science*, **285**, 1569-1572, <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>.
52. Reveret, L., Leclerc, M., Morin, F., Émond, V., and Calon, F. (2023) Pharmacokinetics, biodistribution and toxicology of novel cell-penetrating peptides, *Sci. Rep.*, **13**, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37280-0>.
53. Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., and Futaki, S. (2012) Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery *in vivo*, *J. Controll. Rel.*, **159**, 181-188, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.016>.
54. Sarko, D., Beijer, B., Garcia Boy, R., Nothelfer, E.-M., Leotta, K., Eisenhut, M., Altmann, A., Haberkorn, U., and Mier, W. (2010) The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides, *Mol. Pharmaceut.*, **7**, 2224-2231, <https://doi.org/10.1021/mp100223d>.
55. Piao, W., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2013) Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides *in vitro* and *in vivo*, *J. Immunol.*, **190**, 2263-2272, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202703>.
56. Piao, W., Shirey, K. A., Ru, L. W., Lai, W., Szmazinski, H., Snyder, G. A., Sundberg, E. J., Lakowicz, J. R., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2015) A decoy peptide that disrupts TIRAP recruitment to TLRs is protective in a murine model of influenza, *Cell Rep.*, **11**, 1941-1952, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.035>.
57. Henriques, S. T., Melo, M. N., and Castanho, M. A. R. B. (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.*, **399**, 1-7, <https://doi.org/10.1042/BJ20061100>.
58. Dutta, P., and Das, S. (2016) Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation, *Curr. Top. Med. Chem.*, **16**, 99-129, <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121819>.
59. Sadiq, I. Z., Muhammad, A., Mada, S. B., Ibrahim, B., and Umar, U. A. (2022) Biotherapeutic effect of cell-penetrating peptides against microbial agents: a review, *Tissue Barriers*, <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1995285>.
60. Splith, K., and Neundorff, I. (2011) Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa, *Eur. Biophys. J.*, **40**, 387-397, <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0682-7>.
61. Neundorff, I. (2019) Antimicrobial and cell-penetrating peptides: how to understand two distinct functions despite similar physicochemical properties, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1117**, 93-109, https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_7.
62. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
63. Goligorsky, M. S., Noiri, E., Kessler, H., and Romanov, V. (1998) Therapeutic effect of arginine-glycine-aspartic acid peptides in acute renal injury, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 276-279, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.t01-2-x>.

64. Luo, Y., Smith, R. A., Guan, R., Liu, X., Klinghofer, V., Shen, J., Hutchins, C., Richardson, P., Holzman, T., Rosenberg, S. H., and Giranda, V. L. (2004) Pseudosubstrate peptides inhibit Akt and induce cell growth inhibition, *Biochemistry*, **43**, 1254-1263, <https://doi.org/10.1021/bi034515p>.
65. Hiromura, M., Okada, F., Obata, T., Auguin, D., Shibata, T., Roumestand, C., and Noguchi, M. (2004) Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the β A strand of the proto-oncogene TCL1, *J. Biol. Chem.*, **279**, 53407-53418, <https://doi.org/10.1074/jbc.M403775200>.
66. May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glöckner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000) Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex, *Science*, **289**, 1550-1554, <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1550>.
67. Agou, F., Courtois, G., Chiaravalli, J., Baleux, F., Coïc, Y. M., Traincard, F., Israël, A., and Véron, M. (2004) Inhibition of NF- κ B activation by peptides targeting NF- κ B essential modulator (NEMO) oligomerization, *J. Biol. Chem.*, **279**, 54248-54257, <https://doi.org/10.1074/jbc.M406423200>.
68. Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M. C., Scheidereit, C., Luft, F. C., and Kettritz, R. (2003) Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis, *Blood*, **102**, 2259-2267, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2960>.
69. Borsello, T., Clarkel, P. G. H., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D. F., Bogousslavsky, J., and Bonny, C. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia, *Nat. Med.*, **9**, 1180-1186, <https://doi.org/10.1038/nm911>.
70. Kelemen, B. R., Hsiao, K., and Goueli, S. A. (2002) Selective *in vivo* inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 8741-8748, <https://doi.org/10.1074/jbc.M108459200>.
71. D'Ursi, A. M., Giusti, L., Albrizio, S., Porchia, F., Esposito, C., Caliendo, G., Gargini, C., Novellino, E., Lucacchini, A., Rovero, P., and Mazzoni, M. R. (2006) A membrane-permeable peptide containing the last 21 residues of the G alpha(s) carboxyl terminus inhibits G(s)-coupled receptor signaling in intact cells: correlations between peptide structure and biological activity, *Mol. Pharmacol.*, **69**, 727-736, <https://doi.org/10.1124/mol.105.017715>.
72. Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat. Immunol.*, **2**, 835-841, <https://doi.org/10.1038/ni0901-835>.
73. Toshchakov, V. U., Basu, S., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2005) Differential involvement of BB loops of Toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4- versus TLR2-mediated signal transduction, *J. Immunol.*, **175**, 494-500, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.494>.
74. Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R. G., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α / β -dependent gene expression in macrophages, *Nat. Immunol.*, **3**, 392-398, <https://doi.org/10.1038/ni774>.
75. Loiarro, M., Sette, C., Gallo, G., Ciacci, A., Fantó, N., Mastroianni, D., Carminati, P., and Ruggiero, V. (2005) Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B, *J. Biol. Chem.*, **280**, 15809-15814, <https://doi.org/10.1074/jbc.C400613200>.
76. Schilling, D., Thomas, K., Nixdorff, K., Vogel, S. N., and Fenton, M. J. (2002) Toll-like receptor 4 and toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages, *J. Immunol.*, **169**, 5874-5880, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5874>.
77. Trifonov, L., Nudelman, V., Zhenin, M., Matsree, E., Afri, M., Schmerling, B., Cohen, G., Jozwiak, K., Weitman, M., Korshin, E., Senderowitz, H., Shainberg, A., Hochhauser, E., and Gruzman, A. (2018) Structurally simple, readily available peptidomimetic 1-benzyl-5-methyl-4-(n-octylamino)pyrimidin-2(1H)-one exhibited efficient cardioprotection in a myocardial ischemia (MI) mouse model, *J. Med. Chem.*, **61**, 11309-11326, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01471>.
78. Trifonov, L., Yurchenko, M., Skjesol, A., Cohen, G., Espevik, T., Korshin, E. E., Grøvdal, L. M., Husebye, H., and Gruzman, A. (2022) Benzyl-para-di-[5-methyl-4-(n-octylamino) pyrimidin-2(1H)one] as an interferon beta (IFN- β) modulator, *Mol. Diversity*, **26**, 2175-2188, <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10324-1>.
79. Toshchakov, V. Y., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2007) Cutting edge: differential inhibition of TLR signaling pathways by cell-permeable peptides representing BB loops of TLRs, *J. Immunol.*, **178**, 2655-2660, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2655>.
80. Couture, L. A., Piao, W., Ru, L. W., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2012) Targeting toll-like receptor (TLR) signaling by toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides, *J. Biol. Chem.*, **287**, 24641-24648, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360925>.
81. Piao, W., Ru, L. W., Piepenbrink, K. H., Sundberg, E. J., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2013) Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 19036-19041, <https://doi.org/10.1073/pnas.1313575110>.

82. Piao, W., Ru, L. W., and Toshchakov, V. Y. (2016) Differential adapter recruitment by TLR2 co-receptors, *Pathogens Disease*, **74**, ftw043, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw043>.
83. Javmen, A., Szmackinski, H., Lakowicz, J. R., and Toshchakov, V. Y. (2018) Blocking TIR domain interactions in TLR9 signaling, *J. Immunol.*, **201**, 995-1006, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800194>.
84. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 588-593, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>.
85. Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, *Science*, **408**, 111, 111-115, <https://doi.org/10.1038/35040600>.
86. Odendall, C., and Kagan, J. C. (2017) Activation and pathogenic manipulation of the sensors of the innate immune system, *Microbes Infect.*, **19**, 229-237, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.01.003>.
87. Reddick, L. E., and Alto, N. M. (2014) Bacteria fighting back: how pathogens target and subvert the host innate immune system, *Mol. Cell*, **54**, 321-328, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.010>.
88. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., and O'Neill, L. A. J. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162-10167, <https://doi.org/10.1073/pnas.160027697>.
89. Azar, D. F., Haas, M., Fedosyuk, S., Rahaman, M. H., Hedger, A., Kobe, B., and Skern, T. (2020) Vaccinia virus immunomodulator A46: destructive interactions with MAL and MyD88 shown by negative-stain electron microscopy, *Structure*, **28**, 1271-1287.e5, <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.09.007>.
90. McCoy, S. L., Kurtz, S. E., MacArthur, C. J., Trune, D. R., and Hefeneider, S. H. (2005) Identification of a peptide derived from vaccinia virus A52R TLR-dependent signaling and reduces *in vivo*, *J. Immunol.*, **174**, 3006-3014, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.3006>.
91. Tsung, A., McCoy, S. L., Klune, J. R., Geller, D. A., Billiar, T. R., and Hefeneider, S. H. (2007) A novel inhibitory peptide of toll-like receptor signaling limits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators and enhances survival in mice, *Shock*, **27**, 364-369, <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000239773.95280.2c>.
92. Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., and Miethke, T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins, *Nat. Med.*, **14**, 399-406, <https://doi.org/10.1038/nm1734>.
93. Snyder, G. A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Römmler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Dürr, S., Tjandra, N., Miethke, T., and Xiao, T. S. (2013) Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6985-6990, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215770110>.
94. Ke, Y., Li, W., Wang, Y., Yang, M., Guo, J., Zhan, S., Du, X., Wang, Z., Yang, M., Li, J., Li, W., and Chen, Z. (2016) Inhibition of TLR4 signaling by *Brucella* TIR-containing protein TcpB-derived decoy peptides, *Int. J. Med. Microbiol.*, **306**, 391-400, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.003>.
95. Круть В. Г., Чувпило С. А., Астраханцева И. В., Козловская Л. И., Ефимов Г. А., Круглов А. А., Друцкая М. С., Недоспасов С. А. (2022) Помогут ли пептиды остановить Covid-19? *Биохимия*, **87**, 707-726, <https://doi.org/10.31857/S0320972522060021>.
96. Loi, L. K., Yang, C. C., Lin, Y. C., Su, Y. F., Juan, Y. C., Chen, Y. H., and Chang, H. C. (2023) Decoy peptides effectively inhibit the binding of SARS-CoV-2 to ACE2 on oral epithelial cells, *Heliyon*, **9**, e22614, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22614>.
97. Loiarro, M., Capolunghi, F., Fantò, N., Gallo, G., Campo, S., Arseni, B., Carsetti, R., Carminati, P., De Santis, R., Ruggiero, V., and Sette, C. (2007) Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound, *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 801-810, <https://doi.org/10.1189/jlb.1206746>.
98. Szmackinski, H., Toshchakov, V., and Lakowicz, J. R. (2014) Application of phasor plot and autofluorescence correction for study of heterogeneous cell population, *J. Biomed. Optics*, **19**, 046017, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.4.046017>.
99. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nat. Immunol.*, **4**, 1144-1150, <https://doi.org/10.1038/ni986>.
100. Shah, M., Kim, G. Y., Achek, A., Cho, E. Y., Baek, W. Y., Choi, Y. S., Lee, W. H., Kim, D. J., Lee, S. H., Kim, W., Kim, S. S., Cheong, J. Y., Suh, C. H., and Choi, S. (2020) The α C helix of TIRAP holds therapeutic potential in TLR-mediated autoimmune diseases, *Biomaterials*, **245**, 119974, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119974>.
101. Shirey, K. A., Lai, W., Scott, A. J., Lipsky, M., Mistry, P., Pletneva, L. M., Karp, C. L., McAlees, J., Gioannini, T. L., Weiss, J., Chen, W. H., Ernst, R. K., Rossignol, D. P., Gusovsky, F., Blanco, J. C. G., and Vogel, S. N. (2013) The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection, *Nature*, **497**, 498-502, <https://doi.org/10.1038/nature12118>.

PEPTIDE INHIBITORS OF THE INDUCED SIGNALING PROTEIN INTERACTIONS: THE CURRENT STATE AND PERSPECTIVES

Review

V. Y. Toshchakov

*Sirius University of Science and Technology,
354340 «Sirius» Federal Territory, Krasnodar region, Russia; e-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru*

The formation of transitory protein complexes in response to activation of cellular receptors is a common mechanism by which cells respond to external stimuli. This article presents the concept of blocking the interactions of signaling proteins by peptide inhibitors, and describes the progress achieved to date in development of signaling inhibitors that act by blocking the signal-dependent protein interactions.

Keywords: Toll-like receptors, TIR domains; signaling complexes, peptide inhibitors of protein interactions