

## ALCALOIDES ACRIDÔNICOS INIBEM CATEPSINA L E V

Emerson F. Marques<sup>a</sup>, Paulo C. Vieira<sup>a</sup> e Richele P. Severino<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905, São Carlos – SP, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, 75704-020, Catalão – GO, Brasil

Recebido em 05/06/2015; aceito em 17/09/2015; publicado na web em 26/11/2015

ACRIDONE ALKALOIDS AS INHIBITORS OF CATHEPSIN L AND V. Cathepsins represent a class of enzymes that has the primary function of randomly degrading proteins in the lysosomes, although are also involved in different pathologies. The aim of this paper was to evaluate the capacity of acridone alkaloids isolated from *Swinglea glutinosa* (Rutaceae) to inhibit cathepsin L *in vitro*. The IC<sub>50</sub> values found were in the 0.8-57 µM range and the most promising compounds were alkaloids 1 and 2, with IC<sub>50</sub> of 0.9 and 0.8 µM, respectively. Enzyme kinetics revealed that they are reversible competitive inhibitors with respect to the substrate Z-FR-MCA. This small series of acridone alkaloids showed low selectivity for both cathepsins, but represent promising lead candidates for the further development of competitive cathepsin L and V inhibitors.

Keywords: cathepsin L; inhibitors; natural products; acridone alkaloids.

## INTRODUÇÃO

Os avanços da química e da biologia, bem como a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, tornaram possível o planejamento de importantes inovações terapêuticas. Os produtos naturais representam uma importante fonte de compostos bioativos que podem atuar na terapêutica devido às suas habilidades de modular diferentes processos bioquímicos, contribuindo assim na identificação de compostos líderes para o desenvolvimento de novos fármacos. No século 19, os primeiros produtos naturais isolados de fontes naturais foram alcaloides e, desde então, diversos compostos foram isolados a partir de plantas, animais e micro-organismos, com diferentes variações estruturais e expressiva atividade biológica. Além disso, há muitos exemplos de importantes fármacos que foram formulados a partir de fontes naturais e estão disponíveis na medicina, tais como o agente anti-hipertensivo reserpina, o relaxante muscular tubocurarina, os anticâncer paclitaxel e maitansina. Muitas vezes as substâncias devem ser quimicamente modificadas, a fim de melhorar seu perfil farmacológico.<sup>1</sup>

Enzimas são alvos biológicos importantes para o planejamento de novos fármacos, devido principalmente ao seu papel essencial em inúmeras vias bioquímicas e versatilidade na adequação de ensaios biológicos capazes de identificar substâncias que atuem como inibidores.<sup>2</sup>

As cisteíno peptidases lisossomais, também conhecidas por catepsinas humanas, formam uma importante família composta por onze enzimas similares à papaína (*papain-like*).<sup>3</sup> Extensas revisões foram publicadas sobre as catepsinas e seu papel em processos celulares altamente especializados como, progressão de tumores malignos, doença de Alzheimer, osteoporose, processos inflamatórios e inúmeras outras patologias, o que tem despertado grande interesse das indústrias farmacêuticas.<sup>4</sup>

Estudos com células tumorais demonstraram o aumento da expressão das catepsinas L, B ou D em diferentes tipos de câncer, incluindo melanoma e carcinomas de pulmão, cólon, próstata e mama.<sup>5</sup> A localização da catepsina B e L aumenta e altera o nível de gravidade dos tumores humanos,<sup>6</sup> sendo o aumento de expressão celular da catepsina L associado com o início de tumores mais agressivos e/ou com resultados clínicos mal sucedidos.<sup>7</sup>

As catepsinas L, B e D também estão envolvidas em processos inflamatórios, tais como periodontia, artrite reumatóide, aterosclerose, pancreatite e gastrite.<sup>6</sup> Além disso, estão relacionadas com a remodelação de proteínas da matriz extracelular (ECM)<sup>8</sup> e, juntamente com a catepsina V, na destruição de tecidos ricos em elastina, desempenhando papel central em doenças cardiovasculares.<sup>9</sup>

As catepsinas L e K estão envolvidas na regulação da reabsorção óssea, tanto em condições normais quanto patológicas, estando a catepsina L em menor concentração nos osteoclastos em relação à catepsina K. Alterações na expressão da catepsina L têm sido relatadas em tumores ósseos, como osteosarcoma, tumores de células gigantes do osso, mieloma múltiplo e condrosarcoma.<sup>10</sup>

Estudos mostram que a catepsina L também participa da invasão de células de melanoma, pois foi demonstrado que células de melanoma não metastáticas são convertidas em células metastáticas pela superexpressão da catepsina L. A associação da catepsina L com a membrana em humanos e células de melanoma sugere uma função extra lisossomal em metástases.<sup>11</sup> Foi verificado que o potente inibidor da catepsina L, a cistatina C, bloqueia a mobilidade e invasão de células de melanoma.<sup>12</sup>

Na busca por potentes inibidores de catepsinas, recentes avanços foram feitos chegando a inibidores bem caracterizados farmacologicamente *in vitro* e *in vivo*, e que avançaram para ensaios clínicos no tratamento da osteoporose, osteoartrite e doenças ósseas metastáticas associadas com a mama e próstata. Nos últimos anos o interesse das indústrias farmacêuticas evoluiu na concepção e desenvolvimento de eficientes compostos seletivos e seguros. Estratégias importantes, como alta taxa de triagem química, dinâmica combinatória e rastreamento sílico, têm sido explorados para o desenvolvimento de inibidores eficientes.<sup>13</sup>

A busca de inibidores para as catepsinas representa uma intervenção terapêutica de suma importância e imensa contribuição para a saúde humana. Essas enzimas têm sido intensamente estudadas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.<sup>14</sup> Diversos produtos naturais têm sido descritos como potentes inibidores de catepsinas.<sup>15</sup> Recentemente, apresentamos pela primeira vez a utilização de alcaloides acridônicos como inibidores competitivos para a catepsina V.<sup>16</sup> Além disso, nosso grupo publicou flavonas,<sup>17</sup> N-aril quinolononas e alcaloides acridônicos sintéticos<sup>18</sup> como potentes inibidores das catepsinas V e L. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial

\*e-mail: richeleps@ufg.br

de inibição e a seletividade de uma série de alcaloides acridônicos isolados de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae) frente à catepsina L.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Constituintes químicos

Neste trabalho foram avaliados os alcaloides acridônicos 1,3,5-tri-hidroxi-4-metoxi-10-metil-2,8-bis(3-metilbut-2-enil)acridin-9(10H)-ona (**1**); 1,3,5-tri-hidroxi-2,8-bis(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridinona (**2**); glicocitrina-IV (**3**); glicocitrina-I (**4**); citrusinina-II (**5**); citrusinina-I (**6**); citibrasina (**7**); 5-hidroxinoracronicina(**8**); piranofolina (**9**); 2,3-di-hidro-4,9-di-hidroxi-2-(2-hidroxi-propan-2-il)-11-metoxi-10-metilfuro[3,2-b]acridin-5(10H)-ona (**10**); 3,4-di-hidro-3,5,8-tri-hidroxi-6-metoxi-2,2,7-trimetil-2H-pirano[2,3-a]acridin-12(7H)-ona (**11**), isolados do extrato metanólico das cascas de caule de *Swinglea glutinosa* (Rutaceae). As informações do isolamento e caracterização destes alcaloides foram descritas anteriormente.<sup>19</sup>

### Ensaio cinéticos enzimáticos

A catepsina L recombinante humana foi expressa e purificada como descrito previamente<sup>20</sup> e a concentração molar da enzima foi determinada por titulação do sítio ativo com o inibidor E-64.<sup>21</sup> Todos os reagentes empregados foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co e os experimentos foram realizados em um equipamento Molecular Devices Spectra - modelo MAX GEMINI XS. Os compostos avaliados frente à catepsina L foram preparados em DMSO na concentração estoque de 1 mmol L<sup>-1</sup> e inicialmente testados na concentração de 25 µmol L<sup>-1</sup>. A atividade da protease foi medida em triplicata em placas de Elisa preta de 96 poços de acordo com a metodologia previamente descrita.<sup>16,20</sup> A mistura reacional do ensaio *in vitro* foi composta por 192 µL de tampão acetato de sódio 100 mmol L<sup>-1</sup> (5 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 5 mmol L<sup>-1</sup> de DTE, pH 5,5), 2 µL do substrato Z-FR-MCA (1 mmol L<sup>-1</sup>), 5 µL de solução estoque das amostras avaliadas (em diferentes concentrações) e 1 µL de catepsina L (20 nmol L<sup>-1</sup>). A enzima foi ativada por 5 minutos em tampão contendo DTE a 27 °C e posteriormente incubada com os possíveis inibidores por mais 5 minutos. Em seguida o substrato fluorogênico foi adicionado e a fluorescência do 4-metil-7-cumaril-amida (liberado na forma de MCA) foi medida em λ<sub>Ex</sub> 355 nm e λ<sub>Em</sub> 460 nm. O controle negativo foi realizado com 5 µL de DMSO e o controle positivo com 10 µmol L<sup>-1</sup> do inibidor irreversível E-64 (1 mmol L<sup>-1</sup>). Os valores de potência (IC<sub>50</sub>) foram determinados a partir da regressão não linear dos dados das medidas de, pelo menos, sete diferentes concentrações de inibidor (considerando a faixa de inibição de 20-85%), mantendo-se a concentração de substrato fixa no valor de K<sub>m</sub> (3,1 µmol L<sup>-1</sup>). Os mecanismos de inibição foram determinados utilizando três concentrações de inibidores (levando em consideração o valor de IC<sub>50</sub> de cada um dos inibidores) e sete concentrações de substrato (0,8-39,0 mmol L<sup>-1</sup>). Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir do programa SigmaPlot. A metodologia utilizada para os ensaios frente à catepsina V foram previamente reportados por Severino e colaboradores.<sup>16</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação do valor de potência (IC<sub>50</sub>) e seletividade (S)

As catepsinas L e V apresentam alta homologia estrutural, com 78% de similaridade na sequência de amino ácidos. Também apresentam genes de codificação próximos, assim como a organização

dos seus cromossomos. No geral, as similaridades na sequência e na organização genômica sugerem que a catepsina L e V divergiram na evolução. Entretanto, apesar da semelhança, elas diferem na especificidade dos substratos e na distribuição tecidual. A catepsina L apresenta a mínima atividade proteolítica para a degradação da elastina insolúvel quando comparado com a catepsina V que é a mais potente elastase.<sup>9</sup>

Na busca por inibidores seletivos para catepsinas, uma série de 11 alcaloides acridônicos naturais foi avaliada frente às catepsinas K, L, V e S, sendo os dados para catepsina V já reportados por Severino e colaboradores.<sup>16</sup> Os compostos **1** a **11**, quando avaliados na concentração de 25 µmol L<sup>-1</sup>, apresentaram inibição inferior a 20% das catepsinas K e S e, portanto, não foram estudados nas etapas posteriores para determinação de suas potências e modos de inibições. Devido à potência observada para as catepsinas L e V e a similaridade entre estas enzimas, o estudo da seletividade desses inibidores passou a ser um grande desafio, pois estes compostos podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

A porcentagem de inibição foi determinada de acordo com equação: % inibição = 100 x (1 - V<sub>i</sub>/V<sub>0</sub>); em que, V<sub>i</sub> e V<sub>0</sub> são velocidades iniciais, referentes à atividade enzimática determinadas em presença e na ausência de inibidor, respectivamente.

A seletividade enzimática foi obtida a partir da razão entre os valores de IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub><sup>cat L</sup>/IC<sub>50</sub><sup>cat V</sup>) para a qual valores iguais à unidade indicam a inexistência de seletividade, valores maiores que 1 indicam seletividade frente a catepsina V e valores menores que 1, seletividade frente a catepsina L. Os valores de potência (IC<sub>50</sub>) e seletividade (S) obtidos para a série dos alcaloides acridônicos estão apresentados na Tabela 1.

A presença de inibidores nas faixas de alta, moderada e baixa potência é desejada quando se requer informações mais detalhadas sobre a natureza das relações entre estrutura e atividade (SAR) de uma série de compostos. O fator de potência deste pequeno grupo de compostos pode ser representado pela razão entre os valores maiores e menores de potência (IC<sub>50</sub><sup>maior potência</sup>/IC<sub>50</sub><sup>menor potência</sup>), sendo de aproximadamente 71 para a catepsina L e de 40 para a catepsina V. Embora os dados não representem uma ampla faixa de distribuição, as potências verificadas sugerem os alcaloides acridônicos como potentes inibidores para as catepsinas L e V.

Para a catepsina L encontraram-se valores de IC<sub>50</sub> entre 0,8 e 57 µmol L<sup>-1</sup>, sendo os compostos **1**, **2** e **7** os mais potentes da série, com IC<sub>50</sub> de 0,9, 0,8 e 1,5 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já para a catepsina V os valores de IC<sub>50</sub> foram entre 1,2 e 48,0 µmol L<sup>-1</sup>, sendo os compostos **3**, **6** e **7** os mais potentes, com IC<sub>50</sub> de 2,2, 2,2 e 1,2 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A seletividade verificada nesta pequena série de compostos foi muito baixa, sugerindo que estes inibidores não são capazes de inibir seletivamente as catepsinas L e V. A presença do grupo substituinte prenila em C-8 no anel A não interfere na potência destes compostos quando se comparam os compostos **1** e **3**; o mesmo também ocorre com a presença de um grupo metoxila em C-4, quando comparados os compostos **1** e **2**. Analisando os compostos **3** e **4**, verifica-se que a presença do grupo prenila em C-4 do anel B diminui o valor de potência por um fator de aproximadamente 12 vezes; a ausência do grupo prenila em C-2 do anel B no composto **5** sugere que este grupo é importante para a afinidade com estas catepsinas. A ciclização intramolecular do grupo prenila (**8**, **9**, **10** e **11**) diminui significativamente as potências dos compostos quando comparados com os alcaloides prenilados (**1**, **2**, **3** e **4**), sugerindo que a formação de um quarto anel dificulta a interação do inibidor com o sítio catalítico. Os dados sugerem que os alcaloides acridônicos posicionam-se satisfatoriamente na região do sítio catalítico das enzimas, possibilitando interações intermoleculares importantes para o reconhecimento molecular. Os anéis aromáticos A e B podem favorecer interações

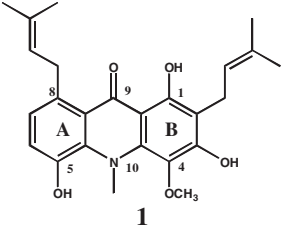
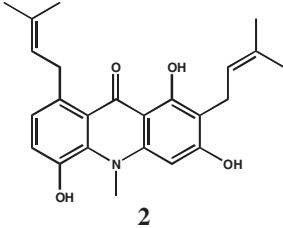
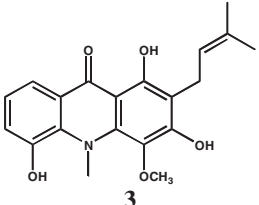
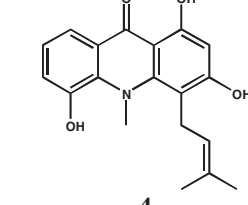
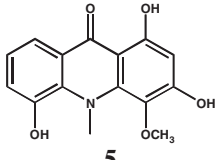
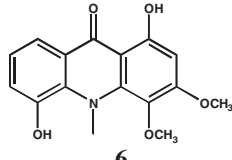
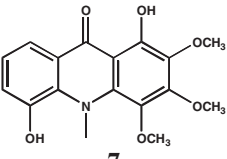
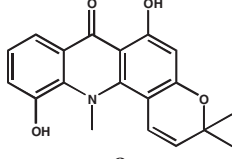
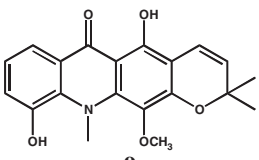
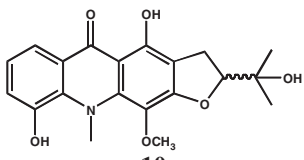
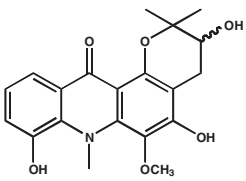
hidrofóbicas e de van der Waals, sendo este efeito menos pronunciado no caso dos compostos tetracíclicos que dificultam a planaridade da molécula e, conseqüentemente, a interação hidrofóbica.

### Determinação do mecanismo de inibição e constante de afinidade ( $K_i$ ) frente à catepsina L

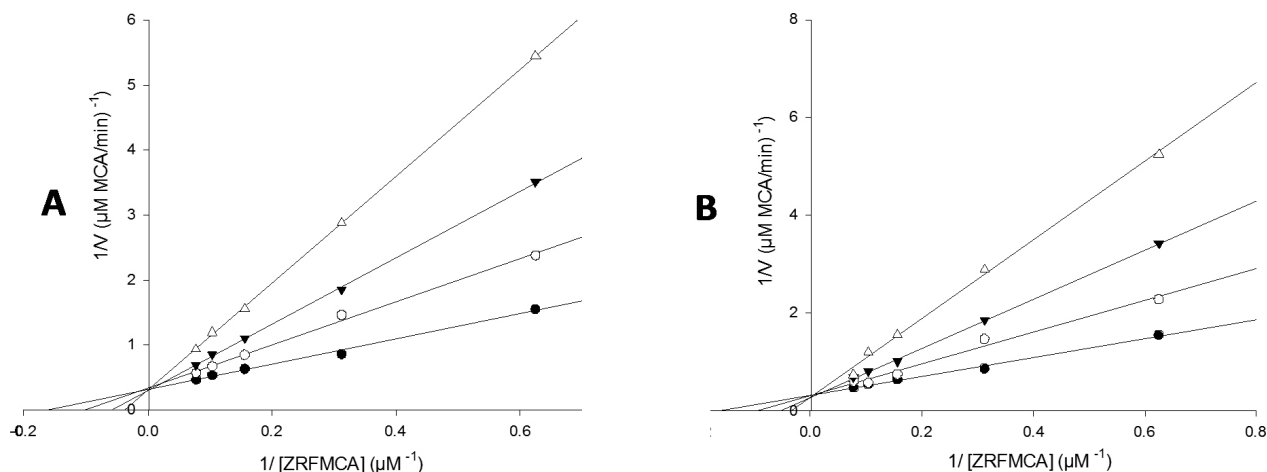
Considerando que o estudo foi realizado para uma série homóloga de alcaloides acridônicos, selecionaram-se os compostos **1** e **3** para a determinação do mecanismo de inibição e a constante de afinidade frente à catepsina L, em relação ao substrato Z-FR-MCA. A determinação do mecanismo de inibição deu-se a partir de procedimento cinético que gera um gráfico de duplo recíproco para cada inibidor, conhecido como gráfico de Lineweaver-Burk, a partir do

qual se obtém um perfil que possibilita especificar o tipo de inibição existente. Neste trabalho os alcaloides naturais mostraram-se como inibidores reversíveis que se ligam à enzima de modo não covalente e sem produzir mudanças na estrutura da enzima. O perfil gráfico representado na Figura 1 (painel A e B) é característico de inibidor competitivo que se liga à enzima livre de forma rápida e reversível de maneira que impede a ligação do substrato (Z-FR-MCA) à catepsina L. Este tipo de inibição requer competição entre substrato e inibidor pela ligação ao sítio ativo da enzima; as intersecções com o eixo y fornecem valores de recíproco da velocidade máxima ( $1/V_{max}$ ), os quais não são alterados em presença do inibidor competitivo; já as intersecções com o eixo x fornecem valores de recíproco do  $K_m$  aparente ( $-1/K_m$ ), que aumentam com o aumento da concentração de um inibidor competitivo por um fator igual a  $(1+[I]/K_i)$ .

**Tabela 1.** Valores de potência e seletividade dos alcaloides acridônicos frente às catepsinas L e V

Estrutura	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)*	S	Estrutura	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	S
	Cat <sub>L</sub> 0,9 $\pm$ 0,1 Cat <sub>V</sub> 2,5 $\pm$ 0,2	0,4		Cat <sub>L</sub> 0,8 $\pm$ 0,1 Cat <sub>V</sub> 3,9 $\pm$ 0,9	0,2
	Cat <sub>L</sub> 1,7 $\pm$ 0,2 Cat <sub>V</sub> 2,2 $\pm$ 0,2	0,8		Cat <sub>L</sub> 23,0 $\pm$ 2,0 Cat <sub>V</sub> 25,0 $\pm$ 5,0	0,9
	Cat <sub>L</sub> 19,0 $\pm$ 2,0 Cat <sub>V</sub> 10,0 $\pm$ 1,0	1,9		Cat <sub>L</sub> 1,9 $\pm$ 0,2 Cat <sub>V</sub> 2,2 $\pm$ 0,6	0,9
	Cat <sub>L</sub> 1,5 $\pm$ 0,2 Cat <sub>V</sub> 1,2 $\pm$ 0,1	1,2		Cat <sub>L</sub> 62,0 $\pm$ 5,0 Cat <sub>V</sub> 48,0 $\pm$ 5,0	1,3
	Cat <sub>L</sub> 57,0 $\pm$ 5,0 Cat <sub>V</sub> 44,0 $\pm$ 3,0	1,3		Cat <sub>L</sub> 16,0 $\pm$ 0,9 Cat <sub>V</sub> 5,2 $\pm$ 0,2	3,1
	Cat <sub>L</sub> 7,0 $\pm$ 0,5 Cat <sub>V</sub> 2,8 $\pm$ 0,7	2,5			

\*Valores de IC<sub>50</sub> para catepsina V foram reportados por Severino e colaboradores.<sup>16</sup>



**Figura 1.** Perfil gráfico de inibidor competitivo obtido para o composto **1** (A) e o composto **3** (B) frente a catepsina L. A atividade cinética foi realizada com o aumento da concentração dos inibidores. Gráfico A:  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\Delta$ ),  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\blacktriangledown$ ) and  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\circ$ ). Gráfico B:  $7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\Delta$ ),  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\blacktriangledown$ ) and  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\circ$ ). A ausência de inibidor está representada por ( $\bullet$ )

O valor de  $V_{\text{max}}$  é constante para todas as concentrações de inibidor, porém, o valor de  $V_{\text{max}}$  aparente, o qual é definido como  $K_m(1 + [I]/K_i)$ , aumenta com o aumento da concentração do inibidor. Esse efeito característico do modo de ação dos inibidores competitivos ocorre, pois maior quantidade de substrato é requerida para manter a metade do valor de  $V_{\text{max}}$ . Os valores de  $V_{\text{max}}$  permanecem inalterados devido à capacidade do substrato de deslocar totalmente o equilíbrio em condições de saturação, uma vez que competem pelo mesmo sítio da enzima.<sup>22</sup> Os inibidores e o substrato podem ligar-se separadamente aos sítios da enzima, com concorrência direta dos dois ligantes pelo sítio ativo em comum.

Os resultados obtidos por experimentos de duplo recíproco, além de possibilitarem a verificação gráfica do tipo de mecanismo de inibição, também permitem extrair informações referentes aos valores de  $K_m$  e  $V_{\text{max}}$ . O gráfico da razão  $V_{\text{max}}/K_m$  versus  $[I]$  leva à obtenção do valor de dissociação do complexo Enzima-Inibidor ( $K_i$ ), que representa a intersecção da reta ao eixo x. Os valores de  $K_i$  obtidos para os compostos **1** e **3** foram respectivamente  $1,31$  e  $1,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mostrando que estes compostos têm igual afinidade pela catepsina L. Vale ressaltar que para catepsina V os compostos **1** e **3** apresentaram valores de  $K_i$  de  $0,5$  e  $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente.<sup>16</sup>

## CONCLUSÃO

Considerando o grande desafio de encontrar inibidores enzimáticos seletivos, os produtos naturais avaliados frente à catepsina L tiveram sua potência, afinidade e mecanismo de ação elucidados, originando uma base de dados complementar para o estudo de alcaloides acridônicos como inibidores de catepsinas. Mesmo com a baixa seletividade apresentada frente às catepsinas L e V, as informações obtidas com esta série de compostos são altamente relevantes, pois tratam-se de moléculas aleatórias que podem servir como subsídio para o planejamento de compostos análogos que apresentem maiores valores de potência e seletividade frente as enzimas estudadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelos auxílios financeiros concedidos e ao D. Bromme da University of British Columbia pelo fornecimento das enzimas.

## REFERÊNCIAS

- Rates, S. M. K.; *Toxicol* **2001**, *39*, 603; Cragg, G. M.; Newman, D. J.; *Biochem. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670; Rouhi, M. A.; *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 77.
- Copeland, R. A.; *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*, Wiley: New York **2005**.
- Barret, A.; Kirschke, H.; *Methods Enzymol.* **1981**, *80*, 189.
- Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D.; *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 68; Brömme, D.; Kaleta, J.; *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 99; Buhling, F.; Fengler, A.; Brandt, W.; Welte, T.; Ansoerge, S.; Nagler, D. K.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *477*, 241; Turk, B.; Turk, D.; Turk, V.; *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, *1477*, 98; Mcgrath, M. E.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 181; Lopez-Otin, C.; Overall, C. M.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 509; Kuester, D.; Lippert, H.; Roessner, A.; Krueger S.; *Pathol., Res. Pract.* **2008**, *204*, 491; Mohamed, M. M.; Sloane, B. F.; *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 764; Palermo, C.; Joyce, J. A.; *Cell Press.* **2007**, *29*, 22; Cataldo, A. M.; Nixon, R. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 3861; Yasuda, Y.; Li, Z.; Greenbaum, D.; Bogbo, M.; Weber, E.; Bromme, D.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36761.
- Vasiljeva, T.; Reinheckel, C.; Peters, D.; Turk, V.; Turk, B.; *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 387.
- Kuester, D.; Lippert, H.; Roessner, A.; Krueger S.; *Pathol. Res. Pract.* **2008**, *204*, 491.
- Lankelma, J. M.; Voorend, D. M.; Barwari, T.; Koetsveld, J.; Van Der Spek, A. H.; De Porto, A. P.; Van Rooijen, G.; Van Noorden, C. J.; *Life Sci.* **2010**, *86*, 225.
- Fiebiger, E.; Maehr, R.; Villadangos, J.; *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1263.
- Lutgens, S. P. M.; Cleutjens, K. B. J. M.; Daemen, M. J. A. P.; Heeneman, S.; *FASEB J.* **2007**, *21*, 3029; Xin, D.; Chen, N. L. H.; Wong, A.; Craik, C. S.; Bromme, D.; *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 34871.
- Leto, G.; Sepporta, M. V.; Crescimanno, M.; Flandina, C.; Tumminello, F. M.; *Biol. Chem.* **2010**, *391*, 655.
- Ishidoh, K.; Ominami, E.; *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 131.
- Cox, J. L.; Sexton, P. S.; Green, T. J.; Darmani, N. A.; *Melanoma Res.* **1999**, *9*, 369; Ervin, H.; Cox, J. L.; *Cancer Cell Int.* **2005**, *5*, 14.
- Brömme, D.; Lecaille, F.; *Expert Opin. Invest. Drugs* **2011**, *18*, 585.
- Turk, D.; Guncar, G.; *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 203; Turk, B.; *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 785.
- Mihelic, M.; Dobersek, A.; Guncar, G.; Turk, D.; *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14453; Ong, P. C.; McGowan, S.; Pearce, M. C.; Irving, J. A.; Kan,

- W. T.; Grigoryev, S. A.; Turk, B.; Silverman, G. A.; Brix, K.; Bottomley, S. P.; Whisstock, J. C.; Pike, R. N.; *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 36980; Sabotic, J.; Popovic, T.; Puizdar, V.; Brzin, J.; *FEBS J.* **2009**, *276*, 4334; Frizler, M.; Lohr, F.; Furtmann, N.; Kläs, J.; Gütschow, M.; *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 396; Kumar, G. D. K.; Chavarria, G. E.; Charlton-Sevcik, A. K.; Yoo, G. K.; Song, J.; Strecker, T. E.; Siim, B. G.; Chaplin, D. J.; Trawick, M. L.; Pinney Bioorg. K. G.; *Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6610.
16. Severino, R. P.; Guido, R. V. C.; Marques, E. F.; Bromme, D.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Andricopulo, A. D.; Vieira, P. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1477.
17. Alvim, J.; Severino, R. P.; Marques, E. F.; Martinelli, A. M.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Corrêa, A. G.; *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 687.
18. Marques, E. F.; Bueno, M. A.; Duarte, P. D.; Silva, L. R. P. S.; Martinelli, A. M.; dos Santos, C. Y.; Severino, R. P.; Brömme, D.; Vieira, P. C.; Corrêa, A. G.; *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 10.
19. Dos Santos, D. A. P.; Braga, P. A. C.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Magalhaes, A. F.; Magalhaes, E. G.; Marsaioli, A. J.; Moraes, V. R. S.; Rattray, L.; Croft, S. L.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 644.
20. Brömme, D.; Li, Z.; Barnes, M.; Mehler, E.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 2377.
21. Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K.; *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189.
22. Sabotic, J.; Popovic, T.; Puizdar, V.; Brzin, J.; *FEBS J.* **2009**, *276*, 4334