УДК 577.151

НЕЙТРАЛЬНАЯ ЭНДОПЕПТИДАЗА (НЕПРИЛИЗИН) В ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКЕ: «ИНЬ И ЯН»

Обзор

© 2019 Е.Э. Фейгина^{1,2*,**}, А.Г. Катруха^{1,3**}, А.Г. Семенов^{1,2**}

HyTest Ltd., Турку, Финляндия; электронная почта: Evgeniya. Feygina@hytest.fi
 НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.06.2019 После доработки 02.08.2019 Принята к публикации 19.08.2019

Неприлизин (пергilysin, NEP) — это цинк-зависимая мембраносвязанная эндопептидаза, представленная в организме в трансмембранной и растворимой формах. Фермент имеет широкий спектр субстратов, вовлеченных в регуляцию сердечно-сосудистой, нервной и других систем организма. В данном обзоре мы останавливаемся на некоторых биохимических функциях NEP и на его физиологической роли. В центре внимания данной работы находится использование NEP как терапевтической мишени: история и разнообразные физиологические аспекты применения ингибиторов NEP для лечения сердечной недостаточности, попытки увеличения активности NEP для лечения болезни Альцгеймера с использованием подходов генной и клеточной терапии. Другим важным вопросом, который мы рассматриваем в данном обзоре, является роль NEP как потенциального маркера для предсказания риска осложнений при сердечно-сосудистых заболеваниях. Приведены данные исследований предсказательной силы растворимой формы NEP при различных типах сердечной недостаточности. Мы также обсуждаем измерение активности NEP для прогностических и диагностических целей, методы и подходы, которые могут быть использованы для этого, а также возможную новую роль натрийуретических пептидов — субстратов NEP — в области сердечно-сосудистой диагностики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: неприлизин, натрийуретические пептиды, АРНи, сердечная недостаточность, болезнь Альцгеймера, биомаркеры, иммунохимический анализ.

DOI: 10.1134/S0320972519110101

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПРИЛИЗИНА

В последние годы неприлизин (NEP, нейтральная эндопептидаза, EC 3.4.24.11) оказался объектом пристального внимания исследователей. Причиной этого стало появление в 2014 году

Принятые сокращения: ANP — натрийуретический пептид A-типа; APP — предшественник амилоидного пептида; BNP — натрийуретический пептид B-типа; CNP — натрийуретический пептид C-типа; NEP — неприлизин; sAPP — растворимый фрагмент белка предшественника амилоидного пептида; sNEP — растворимая форма неприлизина; $A\beta$ — бета-амилоидный пептид; $A\Pi\Phi$ — ангиотензин-превращающий фермент; APHu — ангиотензиновых рецепторов и неприлизина ингибитор; BA — болезнь BA — геймера; BA — натрийуретические пептиды; BA — ренин-ангиотензин-альдостероновая система; CH — сердечная недостаточность.

препарата для лечения сердечной недостаточности (СН) LCZ696 (Энтрестотм, зарегистрирован в РФ как Юпериотм) [1]. Данный препарат производства «Новартис Фарма» сочетает в себе блокатор рецептора ангиотензина II первого типа — валсартан, и ингибитор NEP — сакубитрил. Этот препарат открыл новую эру в сфере терапии сердечной недостаточности и с момента своего появления на рынке находится в центре внимания исследователей вместе с NEP — одной из своих мишеней. Однако исследования NEP, а также попытки использовать фермент как терапевтическую мишень, начались гораздо раньше.

NEP был впервые обнаружен в 1973 г. при исследовании функции и свойств почечной щеточной каемки: фермент был выделен из щеточной каемки проксимального почечного канальца кролика вместе с несколькими другими гидролазами [2]. Локализация фермента указывала на его участие в метаболизме пептидов почечно-

^{*} Адресат для корреспонденции.

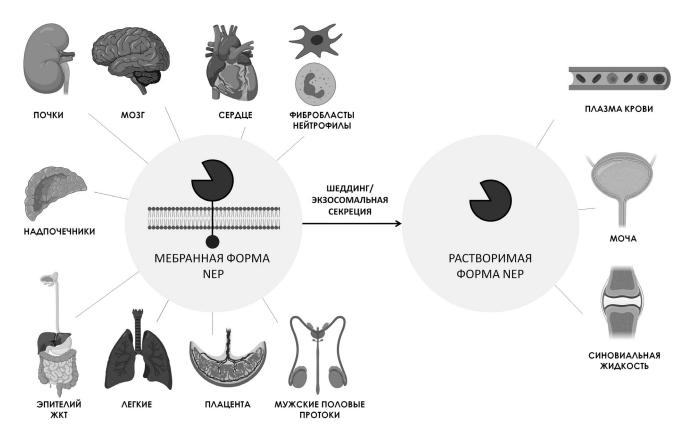
^{**} Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

го фильтрата. Позднее было показано, что фермент идентичен обнаруженной ранее в мозге энкефалиназе, метаболизирующей эндогенные опиоиды [3, 4]. NEP также стал известен как общий антиген острого лимфобластного лейкоза (CALLA) и дифференцировочный антиген нейтрофилов CD10 [5]. NEP млекопитающих высококонсервативен. Последовательности NEP человека и грызунов (мыши, крысы), а также человека и кролика идентичны на 94%, последовательности NEP человека и свиньи – на 93%. Учитывая синонимичность ряда замен, сходство последовательностей NEP человека и перечисленных животных достигает 97%. Для свиньи описано существование нековалентно ассоциированных гомодимеров NEP [6].

NEP относится к семейству цинк-зависимых металлопротеиназ. Он является мембраносвязанной эндопептидазой, включающей 749 а.о., и относится к мембранным белкам второго типа [7, 8]. Фермент состоит из С-концевого каталитически активного эктодомена, связывающего один ион цинка с участием типичного мотива His-Glu-X-X-His (на месте X может располагаться Thr или гидрофобный а.о.), трансмембранной спирали и небольшого N-концевого внутриклеточного домена. NEP был обнаружен

во множестве тканей: в первую очередь в почках, а также в мозге, сердце, легких, надпочечниках, эпителии желудочно-кишечного тракта, щитовидной железе, мужских половых протоках, плаценте, на поверхности фибробластов и нейтрофилов (рис. 1) [9–13]. Существует также растворимая форма NEP (sNEP), образующаяся, предположительно, в результате шеддинга эктодомена фермента или секреции фермента из клеток с участием экзосом [14]. Каталитически активный sNEP был обнаружен в кровотоке, моче, а также в синовиальной жидкости (рис. 1) [15, 16]. Мембраносвязанный и растворимый NEP демонстрируют сходства в отношении аффинности к ингибиторам, оптимальном рН работы, а также $K_{\rm m}$, однако максимальная скорость (V_{max}) sNEP значительно уступает таковой у мембраносвязанной формы [15, 16]. В связи с этим предполагают, что ферментативная активность NEP в организме преимущественно связана с тканевой формой протеазы.

Среди других протеаз, входящих вместе с NEP в семейство цинк-зависимых металлопротеиназ, белок NEP2 демонстрирует высокую степень гомологии с NEP. Этот фермент у человека имеет два варианта, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Один из



Puc. 1. Распространенность NEP в тканях организма. Создано с использованием BioRender

вариантов NEP2 может присутствовать на клеточной мембране в качестве трансмембранного белка, а также, подобно NEP, присутствовать в растворимой форме, ранее известной под названием SEP (soluble secreted endopeptidase). NEP и NEP2 демонстрируют во многих случаях сходную, но не одинаковую, субстратную специфичность [17, 18]. Присутствие в организме NEP2, близкого гомолога NEP, осложняет исследование функциональной роли последнего.

Доступ к гидрофильной каталитической щели NEP пространственно ограничен, что, как считается, обусловливает субстратную специфичность фермента: NEP способен расщеплять небольшие пептиды массой ~3000 Да [19]. Протеаза расщепляет пептидную связь с *N*-конца гидрофобных а.о., преимущественно Phe и Leu [20]. Субстраты NEP разнообразны; среди них вазоактивные пептиды: натрийуретические пептиды A-, B- и C-типа (ANP, BNP и CNP) [21, 22], брадикинин [23], субстанция P [24], ангиотензины I-го и II-го типов, адреномедуллин [25], эндотелин [26], соматостатин [27], также β-амилоид (Аβ), ассоциированный с развитием болезни Альцгеймера (БА) [28, 29].

Оптимальное для активности NEP значение рН находится в нейтральной области (~6,0), что отражено в названии фермента [30]. Ингибиторами NEP являются соединения, способные хелатировать необходимый для каталитической активности протеазы ион цинка, в том числе ЭДТА [31, 32]. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе матрикса для работы с ферментативно-активным NEP.

Первым специфическим синтетическим ингибитором NEP стал тиорфан ([dl-3-mercapto-2-benzylpropanoyl]-glycine) ($K_i = 2,3$ нМ). Для исследовательских целей широко применяется другой ингибитор — фосфорамидон. Эндогенными ингибиторами NEP являются пептиды семейства опиорфинов [33, 34].

Широкое распространение NEP в различных органах и тканях организма и разнообразная субстратная специфичность определяют вовлеченность фермента в самые разнообразные метаболические пути и, как следствие, участие в патологических механизмах, лежащих в основе ряда заболеваний. Среди них СН, БА, различные виды рака, в том числе рак предстательной железы и рак молочной железы [35, 36]. Благодаря этому разнообразными оказались также и варианты использования NEP в биомедицинских исследованиях: за то время, что фермент известен, предпринимались попытки использовать его как в роли терапевтической мишени, так и биомаркера. В исследованиях патогенеза СН и БА NEP оказался особенно важен.

НЕПРИЛИЗИН КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

Сердечная недостаточность. NEP в регуляции сердечно-сосудистой системы. На протяжении развития представлений о патологических механизмах, лежащих в основе развития СН, неприлизин неоднократно привлекал внимание исследователей благодаря многогранности физиологических эффектов, опосредуемых его субстратами. В развитии СН важную роль играют три регуляторные системы. Это вегетативная нервная система, ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) и система натрийуретических пептидов (НП) [37, 38]. При этом РААС и система НП являются фактически антагонистами: ангиотензин II и альдостерон, основные активные игроки РААС, стимулируют реабсорбцию натрия в почках, повышение объема циркулирующей крови, а также сужение сосудов, что в целом приводит к увеличению системного артериального давления (рис. 2). НП напротив способствуют повышению натрийуреза и диуреза, расширению сосудов и снижают системное артериальное давление, уменьшая нагрузку на миокард и реализуя, таким образом, благоприятные для сердца эффекты на фоне СН [39]. Входящие в состав РААС ангиотензин I и ангиотензин II являются субстратами NEP [40]. В свою очередь, ANP и BNP также деградируют под действием NEP; делая протеазу своеобразным двуликим Янусом сердечнососудистой регуляции. Помимо игроков РААС и системы НП, другие субстраты NEP (эндотелин, адреномедуллин, субстанция Р, брадикинин) также являются антагонистами относительно эффектов сужения или расширения сосудов, увеличения или снижения объема циркулирующей крови, артериального давления, регуляции оттока жидкости в ткани из сосудистого русла [41].

NEP и натрийуретические пептиды. Картина вовлеченности NEP в регуляцию сердечно-сосудистой системы дополнительно усложняется различиями в сродстве NEP к своим субстратам. По данным, полученным для реакций расщепления ANP, BNP и CNP человека под действием очищенного NEP человека, $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ составляют: 7,85 (для CNP), >5,12 (для ANP) и >0,53 (для BNP) [22]. Как было упомянуто выше, другие вазоактивные пептиды также являются субстратами NEP. Среди них как сосудорасширяющие (брадикинин, субстанция Р, адреномедуллин), так и обладающие сосудосуживающим действием (ангиотензин II, эндотелин I). Сродство к данным субстратам также различается, что обусловлено, как принято считать, доступностью ка-

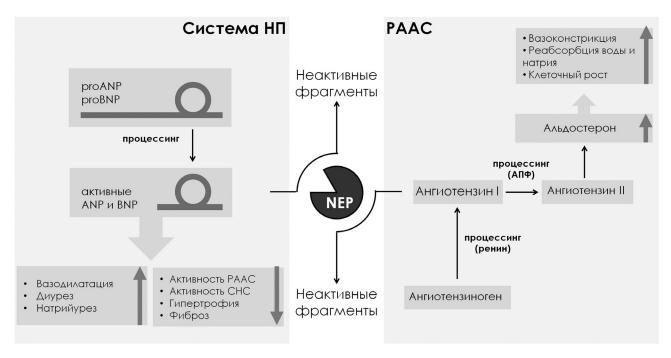


Рис. 2. Вовлеченность NEP в регуляцию системы НП и PAAC. ProANP, ProBNP — предшественники натрийуретических пептидов ANP и BNP. CHC — симпатическая нервная система

талитической щели NEP для пептидов различных размеров [21, 42].

Возвращаясь к натрийуретическим пептидам, важно отметить, что ANP считается одним из «лучших» субстратов NEP, который вместе с инсулин-деградирующим ферментом является, как принято считать, основной протеазой, отвечающей за деградацию ANP в кровотоке [43–46]. С другой стороны, ВNР долгое время ошибочно считали не подверженным расщеплению под действием NEP [47]. В настоящее время установлено, что BNP эффективно расщепляется NEP, однако со значительно меньшей скоростью, чем ANP или CNP [22, 48]. Известно несколько сайтов протеолитического расщепления натрийуретических пептидов NEP [22]. Скорость расщепления сайтов неодинаковая: для BNP сайт 4-5 а.о. считается наиболее подверженным протеолизу под действием NEP, затем идут сайты 17-18 и 21-22 a.o. Для ANP и CNP наиболее подверженным расщеплению считаются сайты 7-8 и 6-7 а.о. соответственно, непосредственно примыкающие к дисульфидной связи, ограничивающей кольцевую часть молекулы. Устойчивость аналогичной пептидной связи в составе молекулы BNP к протеолизу NEP считают одной из возможных причин большей стабильности BNP к опосредуемой NEP деградации по сравнению с ANP и CNP [22]. Помимо указанных выше основных участков протеолиза НП, в молекулах присутствуют и более «медленные» сайты (рис. 3) [22, 49, 50].

Необходимо отметить, что натрийуретические пептиды секретируются в кровь в виде неактивных предшественников, которые затем в результате процессинга и отщепления N-концевого пептида превращаются в активную форму [39, 51, 52]. Так, например, нерасщепленный предшественник BNP (proBNP), а также отщепляемый при процессинге *N*-концевой фрагмент proBNP (NT-proBNP) присутствуют в кровотоке, наряду с активным ВNР [53, 54]. Уровень proBNP в кровяном русле в несколько раз превышает концентрацию BNP и, таким образом, именно на долю неактивного предшественника приходится основная иммунореактивность BNP, определяемая в крови иммунохимическими методами [55, 56]. NT-proBNP и BNP являются широко используемыми маркерами для диагностики СН, а также для предсказания риска развития осложнений СН [57].

Предшественники НП не способны расщепляться NEP, который, таким образом, разлагает исключительно активные ANP, BNP и CNP [49, 50]. Физиологические эффекты ANP и BNP, экспрессируемых в кардиомиоцитах, включают расширение сосудов, повышение натрийуреза и следующего за ним диуреза, снижение гипертонической нагрузки на миокард и регуляцию сердечного ремоделинга. CNP, экспрессируемый в мозге, хондроцитах и клетках эндотелия, реали-

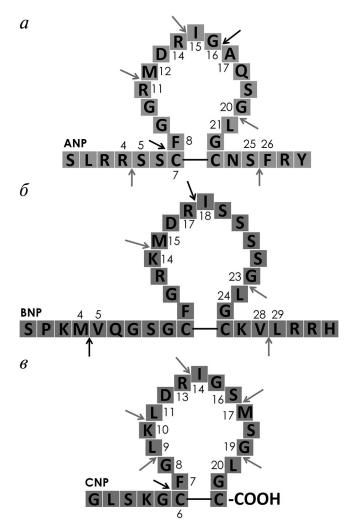


Рис. 3. Сайты расщепления ANP (a), BNP (δ) и CNP (ϵ) под действием NEP. Темными стрелками показаны участки, которые NEP атакует в первую очередь. Светлыми стрелками — более «медленные» сайты расщепления

зует преимущественно паракринный сосудорасширяющий эффект [39].

Таким образом, попытки использовать NEP, как терапевтическую мишень для лечения СН, в первую очередь направлены на снижение расщепления НП под действием NEP, потенциально приводящего к усилению благоприятных эффектов НП на состояние сердечно-сосудистой системы [58].

Ингибирование NEP. Первые попытки терапевтического ингибирования NEP у людей, предпринятые в 1990-х годах, с использованием специфических ингибиторов, таких как кандоксатрил и рацекадотрил, приводили к увеличению концентрации ANP и повышению натрийуреза [59, 60]. Однако положительное воздействие наблюдалось только для мягких экспериментальных форм CH, когда отсутствовало

вовлечение РААС в развитие патологии. В остальных случаях применение кандоксатрила не приводило к устойчивому положительному гемодинамическому эффекту: ингибирование NEP влекло за собой повышение концентрации ангиотензина II (см. выше) и усиление неблагоприятного влияния РААС на сердечно-сосудистую систему при СН [61–63].

Отсутствие положительного результата при ингибировании NEP, как единичной мишени, привели к пониманию необходимости одновременного воздействия на систему НП и РААС. Для подавления неблагоприятных эффектов РААС широко применяются препараты-ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента $(A\Pi\Phi)$, которые успешно снижают частоту повторной госпитализации и риск смерти у пациентов с СН [64, 65]. Таким образом, в начале 2000-х годов логичной стратегией стало создание препарата с двойным ингибиторным эффектом. Им стал омапатрилат, включающий единственное одноименное действующее вещество, способное блокировать одновременно активность NEP и АПФ [66-68]. Эффективность нового препарата анализировали в ходе клинического исследования, получившего название OVERTURE (Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events) [69]. Однако несмотря на снижение частоты неблагоприятных событий, связанных с осложнениями СН у больных, в группе пациентов, получавших омапатрилат, наблюдалось значительное повышение частоты развития ангионевротического отека. Объяснением этого эффекта является способность как NEP, так и АПФ расщеплять брадикинин; ингибирование обоих ферментов омапатрилатом приводило к драматическому росту концентрации брадикинина, что вызывало усиленный отток жидкости в ткани и приводило в конечном счете к развитию отека [69-71]. Таким образом, менее чем через десятилетие после проведения первых клинических исследований разработки препаратов на основе двойного ингибирования NEP и АПФ были прекращены.

Однако поиски способа безопасного одновременного воздействия на РААС и систему НП продолжались. Результатом этого стало появление в 2014 г. препарата Энтресто^{тм} (в России зарегистрирован как Юперио^{тм}) — первого в новом классе АРНи (Ангиотензиновых рецепторов и Неприлизина ингибитор), выпущенного компанией «Новартис». Препарат включает два компонента: валсартан — блокатор ангиотезинового рецептора, и сакубитрил — специфический ингибитор NEP. Таким образом, АРНи способен одновременно подавлять РААС и активи-

ровать систему НП, при этом отсутствует опасное в случае омапатрилата повышение уровня брадикинина и риск развития отека. Эффективность Энтресто™ в сравнении с ингибитором АПФ эналаприлом анализировали в ходе клинического исследования PARADIGM-HF (Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure) [1, 72]. Применение препарата позволило на 20% снизить частоту повторных госпитализаций и смертей у больных хронической СН со сниженной фракцией выброса по сравнению с ингибитором АПФ эналаприлом. Эффективность Энтресто™ также была показана для пациентов, перенесших эпизод острой декомпенсации СН [73]; в настоящее время проводится исследование возможности применения Энтресто™ для больных хронической СН с сохранной фракцией выброса [74, 75].

Таким образом, стратегия одновременного ингибирования PAAC и повышения уровня активных натрийуретических пептидов путем ингибирования NEP, как и ожидалось, оказалась эффективной для терапии различных форм СН. Учитывая успешность применения Энтрестот, ставшего первым в своем классе лекарственным препаратом, можно предполагать, что вслед за ним появятся и другие представители АРНи, включающие помимо ингибиторов NEP дополнительные компоненты и способные воздействовать на еще более широкий спектр мишеней.

Болезнь Альцгеймера. Помимо вазоактивных пептидов субстратом NEP также является амилоид β — пептид, вовлеченный в патогенез болезни Альцгеймера [76—78]. Этот факт делает БА, наряду с CH, патологией, ассоциированной с NEP и его функциональной активностью.

БА — это тяжелое нейродегенеративное заболевание, приводящее к развитию серьезных поведенческих и когнитивных нарушений, а также потере памяти [79]. Согласно амилоидной гипотезе патогенеза БА, в центре развития заболевания находятся продукция и накопление АВ во внутриклеточном и межклеточном пространстве [80]. При процессинге трансмембранного белка-предшественника АВ (amyloid precursor protein, APP) его внеклеточная и внутримембранная части расщепляются, соответственно, под действием β- и γ-секретаз (амилоидогенный путь) с образованием АВ различной длины. Основные формы $A\beta - A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ – благодаря наличию гидрофобных а.о. способны к олигомеризации с образованием олигомеров и фибрил разного размера и в конечном счете амилоидных бляшек (рис. 4) [81]. В настоящее время считается, что наибольшей токсичностью, вызывающей клеточную гибель, обладают растворимые олигомеры $A\beta$, а не амилоидные бляшки, как предполагали ранее [82].

Важно подчеркнуть, что в норме Аβ также образуется в организме и, возможно, обладает нормальными физиологическими функциями [83]. Таким образом, считается, что с патогене-

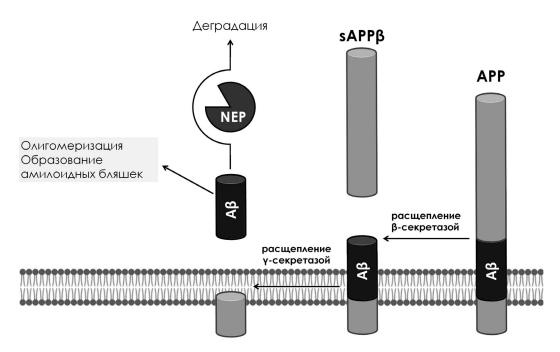


Рис. 4. Амилоидогенный путь расщепления APP и формирование амилоидных бляшек. $sAPP\beta$ — soluble APP, растворимый фрагмент APP, образующийся при действии β -секретазы. Создано с использованием BioRender

зом БА связано именно аномальное накопление и агрегация Аβ. По оценкам, скорость образования АВ в центральной нервной системе здорового человека примерно равна скорости его выведения [84], что предотвращает накопление амилоида. Тем не менее в случае БА с поздним началом (после 65 лет, в отсутствии наследственной предрасположенности к накоплению Ав) скорость выведения Аβ снижается примерно в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой [85]. Помимо NEP за деградацию Аβ отвечают различные ферменты, включая АПФ и инсулиндеградирующий фермент, но в ткани мозга основным амилоид-деградирующим ферментом является NEP [28]. Это, в частности, было подтверждено в исследованиях с использованием радиоактивно-меченного $A\beta_{42}$, вводимого в гиппокамп крыс [77]. В исследованиях на мышах и крысах применение ингибиторов NEP в значительной степени повышало накопление амилоидных бляшек в мозге. Нокаут гена *NEP* при моделировании БА v мышей приводил к аналогичному эффекту [86–88]. Важная роль NEP в катаболизме АВ дополнительно подтверждается данными о снижении уровня фермента в мозге больных БА по сравнению со здоровыми индивидами того же возраста [89].

В связи с этим, в случае БА, NEP также является потенциальной терапевтической мишенью, однако, в отличие от СН, с противоположной целью: увеличение активности NEP может приводить к снижению содержания АВ, уменьшению отложения амилоидных бляшек и, возможно, к замедлению прогресса заболевания. Повышение уровня экспрессии NEP методами генной терапии потенциально является стратегией снижения уровня АВ. В ряде доклинических исследований было показано, что введение гена NEP мышам, оверэкспрессирующим АРР человека, с использованием лентивирусной и герпесвирусной инфекции, а также аденоассоциированного вируса приводило к снижению отложения амилоидных бляшек [90–92]. Аналогичного эффекта, а также улучшения когнитивной функции у мышей удавалось добиться с использованием сочетания клеточной и генной терапии: введением фибробластов, трансдуцированных лентивирусом, экспрессирующим растворимую форму NEP [93]. Другим методом повышения уровня экспрессии NEP стала доставка мРНК, кодирующей NEP, в составе наномицелл [94, 95].

Ограничениями в случае использования вирусной доставки гена *NEP* являются сложность контроля точного количества экспрессируемого вирусного продукта и времени экспрессии, а также возможная токсичность вируса и развитие воспалительной реакции. В качестве альтерна-

тивного подхода было предложено использовать рекомбинантный растворимый NEP. При использовании модели на мышах было показано, что введение рекомбинантного фермента снижало уровень апоптотической гибели клеток гиппокампа, опосредованной Аβ, повышало выживаемость клеток *in vitro*, а также улучшало память животных при проведении поведенческих тестов [96].

Несмотря на многочисленные разработки в области повышения активности NEP при БА, ни один из подходов пока не введен в клиническую практику. На сегодняшний день не существует препаратов для терапии БА, использующих NEP как терапевтическую мишень, однако исследования такой возможности продолжаются (для обзора см. [95]).

СН и БА: по разные стороны баррикад? Как было сказано выше, в случае СН желаемый терапевтический эффект заключается в ингибировании NEP, тогда как в случае терапии БА стоит противоположная задача - повышение активности NEP. Из этого следует потенциальная опасность использования ингибиторов NEP при СН [97]. В исследовании распределения компонента Энтресто™ сакубитрила между плазмой крови и спинномозговой жидкостью у здоровых волонтеров было показано, что сакубитрил присутствует в спинномозговой жидкости в концентрации, достаточной для ингибирования активности NEP [98]. Возрастная группа риска развития БА близка к таковой для больных СН, в связи с чем нарушение скорости деградации АВ и, как следствие, накопление его в токсических концентрациях в ткани мозга на фоне терапии Энтрестотм или его аналогов представляется возможным сценарием.

Необходимо отметить, что больные, страдающие БА, не были включены в клинические исследования Энтресто™ [72]. При анализе когнитивных функций участников PARADIGM-HF в течение максимального срока 4,3 г. никаких достоверных ухудшений по сравнению с контрольной группой не наблюдалось, однако в случае БА необходим анализ динамики в течение более продолжительного времени [99]. Также озабоченность вызывает тот факт, что доля больных СН младше 40 лет в настоящее время возрастает [100, 101]. Период приема препаратов на основе ингибиторов NEP для таких пациентов окажется больше, чем для старших возрастных групп, что потенциально повышает риск развития БА в более раннем возрасте. Таким образом, при длительном использовании препаратов на основе ингибиторов NEP необходимо пристальное наблюдение за когнитивными функциями пациентов и процессами амилоидогенеза.

NEP KAK MAPKEP

В силу вовлеченности NEP в такие важнейшие регуляторные системы, как PAAC и система НП, предметом исследования стала потенциальная возможность использовать NEP как маркер для предсказания риска осложнений СН [102].

Измерение уровня sNEP. Иммунохимическое измерение концентрации растворимой формы NEP с использованием пары антител в крови больных СН со сниженной фракцией выброса показало, что высокий уровень sNEP ассоциирован с повышенным риском развития неблагоприятных событий у пациентов. Отношение рисков составило 1,18 (p = 0.001) для риска повторной госпитализации из-за осложнения СН и $1,18 \ (p=0,006)$ для риска смерти из-за болезни сердечно-сосудистой системы [103]. Статистически достоверную ассоциацию sNEP с госпитализациями и смертью из-за осложнений СН также наблюдали в мультипараметрическом исследовании, включавшем оценку уровней ряда прогностических маркеров [104]. Было показано, что sNEP является независимым прогностическим маркером, и его уровень не коррелирует с концентрацией NT-proBNP. Уровень sNEP оказался менее зависим от сопутствующих патологий, таких как ожирение и диабет, в отличие от NT-proBNP [104]. Указанное авторами отношение рисков составило 1,14 (p = 0.03) для составной конечной точки и 1,15 (p = 0.04) в случае риска смерти из-за болезни сердечно-сосудистой системы.

В случае СН с сохранной фракцией выброса, однако, высокие уровни sNEP не демонстрировали корреляции с прогнозом риска осложнений [105]. Исследование группы из 350 пациентов, страдающих острой СН, как и в случае хронической СН со сниженной фракцией выброса, показало прогностическую ценность sNEP (отношение рисков в долгосрочном прогнозе составило 1,21 (p = 0,01) для составных конечных точек) [106].

Таким образом, данные о возможности прогностического использования sNEP достаточно противоречивы. Важно отметить тот факт, что механизм появления sNEP в кровотоке до сих пор не установлен. Шеддинг внеклеточной части трансмембранных белков происходит неспецифически; в этом случае сложно предполагать регулирование уровня sNEP в кровотоке, связанное с патогенезом СН. Измерение sNEP связано также с рядом аналитических затруднений: имеющиеся на рынке системы иммунохимической детекции плохо коррелируют друг с другом, измерения не стандарти-

зованы [107]. Таким образом, данные о предсказательной силе уровня sNEP требуют осторожной интерпретации.

Измерение активности NEP. Измерение активности NEP, а не концентрации его растворимой формы, выглядит более обоснованным с той точки зрения, что именно ферментативная функция NEP вовлечена в регуляцию метаболизма и патогенез СН. Такие попытки также предпринимались: в ряде работ авторы оценивали активность sNEP в образцах плазмы крови больных СН с использованием флуорогенного субстрата [108, 109]. Серьезным ограничением этих исследований стало использования в качестве матрикса для измерения активности sNEP ЭДТА-плазмы: так как NEP является цинк-зависимой металлопротеиназой, присутствие ЭДТА препятствует физиологическому функционированию фермента. Имеющиеся на данный момент флуорогенные субстраты NEP, в свою очередь, не могут обеспечивать достаточной специфичности, что дополнительно затрудняет измерения подобного рода.

Попытки анализировать активность sNEP плазмы крови предпринимались не только в случае СН, но также в связи с БА. С использованием флуорогенного субстрата было показано, что у больных удельная активность sNEP в плазме в среднем на 42% ниже, чем у контрольной группы $(1,028 \pm 0,086$ нмоль субстрата/мг белка × мин против $1,770 \pm 0,124$ нмоль субстрата/мг белка × мин) [110].

Важным является тот факт, что при измерении активности NEP в образце крови с использованием искусственных субстратов исследователи имеют дело с активностью исключительно присутствующего в образце sNEP [111, 112]. Можно предположить, что активность sNEP составляет лишь малую часть общей активности NEP организма. Это обстоятельство, а также отсутствие ясности в механизме шеддинга фермента указывают, что клинический интерес может представлять измерение интегральной активности тканевого NEP. Для этой цели возможно использовать эндогенные субстраты NEP, проводя измерения специфических продуктов, образующихся в результате расщепления.

Возвращаясь к СН, помимо использования активности NEP для предсказания риска развития неблагоприятных событий на фоне СН, появление АРНи ставит вопрос и о другом потенциальном применении такого параметра: выбор пациентов, для которых применение АРНи окажется наиболее эффективным. Учитывая имеющиеся побочные эффекты АРНи, неизученное до конца потенциальное влияние препарата на

когнитивные функции, а также высокая стоимость препарата, возможность подбора терапии индивидуально для каждого пациента представляется крайне важной.

Возможным механизмом благоприятного воздействия АРНи на гемодинамику пациентов с СН является повышение уровня активных форм ANP и BNP в кровотоке благодаря ингибированию NEP, играющего важнейшую роль в их деградации. Можно предположить, что АРНи будет более эффективен для пациентов с высокой активностью NEP, то есть для тех, у кого вклад NEP в истощение пула активных НП в кровотоке велик. С другой стороны, уровень продукции НП также должен быть достаточно высок, в противном случае ингибирование NEP не приведет к значительному изменению концентрации активных форм пептидов в кровотоке. Таким образом, при сочетании эффективной продукции НП и высокой активности NEP ингибирование фермента под действием АРНи может привести к смещению равновесия в сторону активных форм ANP и BNP и усилению опосредуемых ими положительных эффектов (см. схему на рис. 5). Для определения таких пациентов было предложено измерять уровень циркулирующих продуктов расщепления натрийуретических пептидов NEP [113].

Один из таких продуктов образуется в результате расщепления BNP по сайту 17-18 a.o. (см. выше). Протеолиз приводит к размыканию кольцевой структуры ВNР и образованию двух эпитопов в составе пептида, отсутствовавших в интактной молекуле - так называемых неоэпитопов neo17 (содержит С-концевой остаток Arg17) и neo18 (содержит N-концевой остаток Ile18). Нео-эпитопы могут быть использованы для специфического определения содержащих их пептидов иммунохимическими методами. Формы BNP, содержащие neo17-эпитоп, получили общее название BNP-neo17. В нашем исследовании в кровоток крыс вводили BNP человека, а затем проводили измерение содержашихся в образцах плазмы животных форм BNP через различные промежутки времени после инъекции [113]. Эксперимент проводили у крыс на фоне специфического ингибирования эндогенного NEP сакубитрилом, а также без такового. Сравнение состава форм BNP у крысы до и после ингибирования NEP показало, что BNP-neo17 образуется и накапливается в кровотоке животных только в отсутствии сакубитрила; ингибирование NEP блокировало образование BNP-neo17. Данный результат доказывает, что BNP-neo17 является продуктом специфического расщепления BNP NEP. На следую-

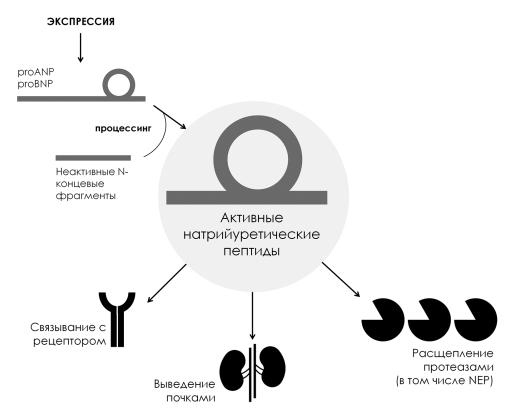


Рис. 5. Механизмы пополнения и истощения пула активных НП в кровотоке

щем этапе работы присутствие BNP-neo17 было продемонстрировано в плазме крови пациентов, больных СН. Так как уровень BNP-neo17 очевидным образом зависит от уровня продукции активного BNP, субстрата реакции с NEP, а также от интегральной активности NEP организма, можно предположить, что BNP-neo17 является потенциальным биомаркером, отражающим возможную эффективность терапии СН с использованием ингибиторов NEP, в частности АРНи.

Помимо BNP, в роли субстрата для образования продуктов-маркеров может выступать и ANP. Исследование сайтов специфического расщепления ANP NEP и образующихся в результате такого протеолиза фрагментов ANP, анализ их состава и присутствия в кровотоке может пролить свет на новые потенциальные ANP-зависимые биомаркеры для предсказания эффективности терапии на основе ингибирования NEP.

Наряду с НП в качестве источников для образования циркулирующих продуктов расщепления NEP могут быть потенциально использованы и другие молекулы. Несмотря на то что предпочтительными субстратами NEP являются короткие пептиды, существуют данные о способности NEP отщеплять от фибриногена N-концевой пептид из 18 а.о., а также расщеплять фактор роста фибробластов 2 (ФГФ-2) с отщеплением от C-конца белка фрагмента из 20 а.о. [114]. Изучение возможности использования таких фрагментов для оценки общей активности NEP организма и, как следствие, подбора индивидуальной терапии CH представляет большой интерес.

Альтернативным подходом для измерения интегральной активности NEP организма может стать внутривенное введение экзогенного субстрата фермента с последующим измерением концентрации специфических продуктов расщепления. Несомненным преимуществом такого подхода является возможность использовать концентрации субстрата, значительно превышающие таковые для эндогенных субстратов, что позволит решить аналитические сложности измерения низких уровней продуктов протеолитической реакции.

Долгая история исследований, связанных с NEP, является ярким примером того, как фундаментальные научные изыскания оказались тесно сплетены с развитием прикладных направлений, таких как терапия сердечной недостаточности, разработка методов лечения болезни Альцгеймера, изучение возможностей для диагностического применения NEP. Особенный ин-

терес представляют наметившиеся перспективы для персонализированной диагностики: возможность подбирать терапию СН на основе измерения активности NEP по специфическим продуктам расщепления. В современной клинической практике, когда все больше внимания уделяется индивидуальному подходу к каждому пациенту и учету нюансов патологического механизма, важность подобной сопутствующей диагностики выходит на первый план.

Невольная аналогия, возникающая при размышлении об истории изучения и использования NEP, — это концепция «инь и ян», берущая начало в китайской философии. В основе данной концепции лежит представление о единстве и неделимости противоположных начал, как модели всего сущего. Так и в случае NEP, двойственность оказывается неотъемлемым свойством фермента: вовлеченность в регуляцию как РААС, так и системы НП; роль как маркера и как терапевтической мишени; необходимость ингибирования при СН и активации при БА. Продолжая это философское построение, можно утверждать, что успешное практическое применение NEP возможно только при учете этой двойственности.

Вовлеченность NEP и продуктов его протеолитической активности в самые разнообразные регуляторные метаболические пути за счет широкой субстратной специфичности и распространенности в многочисленных тканях обусловили невероятную сложность изучения роли этого фермента в функционировании живого организма. Тем более выдающимися представляются успехи в прикладном применении NEP. И тем более обширными выглядят перспективы для дальнейшей работы: поиск новых субстратов фермента, анализ механизмов регуляции его активности и шеддинга, изучение биомаркерного и терапевтического потенциала как самого NEP, так и его мишеней. Не будет преувеличением сказать, что находящийся на перекрестке важнейших метаболических путей NEP — это иллюстрация необходимости комплексного подхода как в диагностике и терапии, так и в фундаментальных исследовани-

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McMurray, J.J., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R., and PARADIGM-HF Committees and Investigators (2013) Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF), Eur. J. Heart Fail., 15, 1062–1073.
- 2. George, S.G., and Kenny, J. (1973) Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney, *Biochem. J.*, **134**, 43–57.
- 3. Malfroy, B., and Guyon, A. (1978) High-affinity degrading peptidase in brain is increased after morphine, *Nature*, **276**, 523–526.
- Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., Soroca, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens, C., and Schwartz, J.C. (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice, *Nature.*, 288, 286–288.
- Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V., and McInnes, R.R. (1988) Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase, *J. Exp. Med.*, 168, 1247–1253.
- Fulcher, I.S., and Kenny, A.J. (1983) Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys, *Biochem. J.*, 211, 743–753.
- 7. Oefner, C., D'Arcy, A., Hennig, M., Winkler, F.K., and Dale, G.E. (2000) Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon, *J. Mol. Biol.*, **296**, 341–349.
- 8. Beaumont, A., Le Moual, H., Boileau, G., Crine, P., and Roques, B.P. (1991) Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11), *J. Biol. Chem.*, **266**, 214–220.
- 9. Erdos, E.G., and Skidgel, R.A. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones, *FASEB J.*, **3**, 145–151.
- tide hormones, FASEB J., 3, 145–151.

 10. Ronco, P., Pollard, H., Galceran, M., Delauche, M., Schwartz, J.C., and Verroust, P. (1988) Distribution of enkephalinase (membrane metalloendopeptidase, E.C. 3.4.24.11) in rat organs. Detection using a monoclonal antibody, Lab. Invest., 58, 210–217.
- 11. Mapp, P.I., Walsh, D.A., Kidd, B.L., Cruwys, S.C., Polak, J.M., and Blake, D.R. (1992) Localization of the enzyme neutral endopeptidase to the human synovium, *J. Rheumatol.*, **19**, 1838–1844.
- Bowes, M.A., and Kenny, A.J. (1986) Endopeptidase-24.11 in pig lymph nodes. Purification and immunocytochemical localization in reticular cells, *Biochem. J.*, 236, 801–810.
- Connelly, J.C., Skidgel, R.A., Schulz, W.W., Johnson, A.R., and Erdos, E.G. (1985) Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8737–8741.
- 14. Kuruppu, S., Rajapakse, N.W., Minond, D., and Smith, A.I. (2014) Production of soluble Neprilysin by endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**, 423–427.
- Spillantini, M.G., Sicuteri, F., Salmon, S., and Malfroy, B. (1990) Characterization of endopeptidase 3.4.24.11 ("enkephalinase") activity in human plasma and cerebrospinal fluid, *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1353–1356.

- Yandle, T., Richards, M., Smith, M., Charles, C., Livesey, J., and Espiner, E. (1992) Assay of endopeptidase-24.11 activity in plasma applied to *in vivo* studies of endopeptidase inhibitors, *Clin. Chem.*, 38, 1785–1791.
- 17. Whyteside, A.R., and Turner, A.J. (2008) Human neprilysin-2 (NEP2) and NEP display distinct subcellular localisations and substrate preferences, *FEBS Lett.*, **582**, 2382–2386.
- 18. Raharjo, S.B., Emoto, N., Ikeda, K., Sato, R., Yokoyama, M., and Matsuo, M. (2001) Alternative splicing regulates the endoplasmic reticulum localization or secretion of soluble secreted endopeptidase, *J. Biol. Chem.*, **276**, 25612–25620.
- Pankow, K., Schwiebs, A., Becker, M., Siems, W.E., Krause, G., and Walther, T. (2009) Structural substrate conditions required for neutral endopeptidase-mediated natriuretic peptide degradation, *J. Mol. Biol.*, 393, 496–503.
- Shipp, M.A., Tarr, G.E., Chen, C.Y., Switzer, S.N., Hersh, L.B., Stein, H., Sunday, M.E., and Reinherz, E.L. (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10662–10666.
- Kenny, A.J., Bourne, A., and Ingram, J. (1993) Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11, *Biochem. J.*, 291, 83–88.
- 22. Watanabe, Y., Nakajima, K., Shimamori, Y., and Fujimoto, Y. (1997) Comparison of the hydrolysis of the three types of natriuretic peptides by human kidney neutral endopeptidase 24.11, *Biochem. Mol. Med.*, **61**, 47–51.
- Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., and Worthy, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, *Pharmacol. Rev.*, 44, 1–80.
- 24. Matsas, R., Rattray, M., Kenny, A.J., and Turner, A.J. (1985) The metabolism of neuropeptides. Endopeptidase-24.11 in human synaptic membrane preparations hydrolyses substance P, *Biochem. J.*, **228**, 487–492.
- Wilkinson, I.B., McEniery, C.M., Bongaerts, K.H., MacCallum, H., Webb, D.J., and Cockcroft, J.R. (2001) Adrenomedullin (ADM) in the human forearm vascular bed: effect of neutral endopeptidase inhibition and comparison with proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide (PAMP), Br. J. Clin. Pharmacol., 52, 159–164.
- McDowell, G., Coutie, W., Shaw, C., Buchanan, K.D., Struthers, A.D., and Nicholls, D.P. (1997) The effect of the neutral endopeptidase inhibitor drug, candoxatril, on circulating levels of two of the most potent vasoactive peptides, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 43, 329–332.
- 27. Barnes, K., Doherty, S., and Turner, A.J. (1995) Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus, *J. Neurochem.*, **64**, 1826–1832.
- 28. Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., Zhuravin, I.A., and Turner, A.J. (2012) The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2012**, 383796.
- Singh, J.S.S., Burrell, L.M., Cherif, M., Squire, I.B., Clark, A.L., and Lang, C.C. (2017) Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides, *Heart*, 103, 1569–1577.
- 30. Schulz, R., Sakane, Y., Berry, C., and Ghai, R. (1991) Characterisation of neutral endopeptidase 3.4.24.11 (NEP) in the kidney: comparison between normotensive, genetically hypertensive and experimentally hypertensive rats, *J. Enzyme Inhib.*, **4**, 347–358.
- 31. Koehn, J.A., Norman, J.A., Jones, B.N., LeSueur, L., Sakane, Y., and Ghai, R.D. (1987) Degradation of atrial

- natriuretic factor by kidney cortex membranes. Isolation and characterization of the primary proteolytic product, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11623–11627.
- 32. Olins, G.M., Spear, K.L., Siegel, N.R., and Zurcher-Neely, H.A. (1987) Inactivation of atrial natriuretic factor by the renal brush border, *Biochim. Biophys. Acta*, **901**, 97–100.
- Nawarskas, J., Rajan, V., and Frishman, W.H. (2001) Vasopeptidase inhibitors, neutral endopeptidase inhibitors, and dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase, *Heart Dis.*, 3, 378–385.
- 34. Nishimura, K., and Hazato, T. (1993) Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 713–719.
- Shen, R., Sumitomo, M., Dai, J., Harris, A., Kaminetzky, D., Gao, M., Burnstein, K.L., and Nanus, D.M. (2000) Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells is mediated by increased levels of neutral endopeptidase, *Endocrinology*, 141, 1699–1704.
- Stephen, H.M., Khoury, R.J., Majmudar, P.R., Blaylock, T., Hawkins, K., Salama, M.S., Scott, M.D., Cosminsky, B., Utreja, N.K., Britt, J., and Conway, R.E. (2016) Epigenetic suppression of neprilysin regulates breast cancer invasion, *Oncogenesis*, 5, e207.
- Jhund, P.S., and McMurray, J.J. (2016) The neprilysin pathway in heart failure: a review and guide on the use of sacubitril/valsartan, *Heart*, 102, 1342–1347.
- 38. Volpe, M., Carnovali, M., and Mastromarino, V. (2016) The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment, *Clin. Sci.* (*Lond.*), **130**, 57–77.
- 39. Potter, L.R., Yoder, A.R., Flora, D.R., Antos, L.K., and Dickey, D.M. (2009) Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **191**, 341–366.
- 40. Yamamoto, K., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., and Ferrario, C.M. (1992) In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **19**, 692–696.
- 41. Rossi, F., Mascolo, A., and Mollace, V. (2017) The pathophysiological role of natriuretic peptide-RAAS cross talk in heart failure, *Int. J. Cardiol.*, **226**, 121–125.
- 42. D'Elia, E., Iacovoni, A., Vaduganathan, M., Lorini, F.L., Perlini, S., and Senni, M. (2017) Neprilysin inhibition in heart failure: mechanisms and substrates beyond modulating natriuretic peptides, *Eur. J. Heart Fail.*, 19, 710–717.
- Sonnenberg, J.L., Sakane, Y., Jeng, A.Y., Koehn, J.A., Ansell, J.A., Wennogle, L.P., and Ghai, R.D. (1988) Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney, *Peptides*, 9, 173–180.
- 44. Vanneste, Y., Michel, A., Dimaline, R., Najdovski, T., and Deschodt-Lanckman, M. (1988) Hydrolysis of alphahuman atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site, *Biochem. J.*, 254, 531–537.
- 45. Ralat, L.A., Guo, Q., Ren, M., Funke, T., Dickey, D.M., Potter, L.R., and Tang, W.J. (2011) Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4670–4679.
- 46. Muller, D., Schulze, C., Baumeister, H., Buck, F., and Richter, D. (1992) Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP, and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry, *Biochemistry*, **31**, 11138–11143.
- 47. Dickey, D.M., and Potter, L.R. (2010) Human B-type

- natriuretic peptide is not degraded by meprin A, *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1007–1011.
- 48. Norman, J.A., Little, D., Bolgar, M., and Di Donato, G. (1991) Degradation of brain natriuretic peptide by neutral endopeptidase: species specific sites of proteolysis determined by mass spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 22–30.
- 49. Semenov, A.G., and Katrukha, A.G. (2016) Different susceptibility of B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and BNP Precursor (proBNP) to cleavage by neprilysin: the *N*-terminal part does matter, *Clin. Chem.*, **62**, 617–622.
- Semenov, A.G., Feygina, E.E., Tamm, N.N., Serebryanaya, D.V., and Katrukha, A.G. (2017) Abstract 15828: Pro-Atrial Natriuretic Peptide (proANP) as a stable circulating ANP form that is not affected by neprilysinmediated cleavage, *Circulation*, 136, A15828.
- 51. Yan, W., Wu, F., Morser, J., and Wu, Q. (2000) Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8525–8529.
- 52. Yan, W., Sheng, N., Seto, M., Morser, J., and Wu, Q. (1999) Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart, *J. Biol. Chem.*, **274**, 14926–14935.
- Semenov, A.G., Tamm, N.N., Seferian, K.R., Postnikov, A.B., Karpova, N.S., Serebryanaya, D.V., Koshkina, E.V., Krasnoselsky, M.I., and Katrukha, A.G. (2010) Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases, *Clin. Chem.*, 56, 1166–1176.
- 54. Semenov, A.G., Seferian, K.R., Tamm, N.N., Artem'eva, M.M., Postnikov, A.B., Bereznikova, A.V., Kara, A.N., Medvedeva, N.A., and Katrukha, A.G. (2011) Human pro-B-type natriuretic peptide is processed in the circulation in a rat model, *Clin. Chem.*, 57, 883–890.
- 55. Yandle, T.G., Richards, A.M., Gilbert, A., Fisher, S., Holmes, S., and Espiner, E.A. (1993) Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76, 832–838.
- Seferian, K.R., Tamm, N.N., Semenov, A.G., Mukharyamova, K. S., Tolstaya, A.A., Koshkina, E.V., Kara, A.N., Krasnoselsky, M.I., Apple, F.S., Esakova, T.V., Filatov, V. L., and Katrukha, A.G. (2007) The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure, *Clin. Chem.*, 53, 866–873.
- 57. Semenov, A.G., and Feygina, E.E. (2018) Standardization of BNP and NT-proBNP immunoassays in light of the diverse and complex nature of circulating BNP-related peptides, *Adv. Clin. Chem.*, **85**, 1–30.
- Yandrapalli, S., Aronow, W.S., Mondal, P., and Chabbott, D.R. (2017) The evolution of natriuretic peptide augmentation in management of heart failure and the role of sacubitril/valsartan, *Arch. Med. Sci.*, 13, 1207–1216.
- Northridge, D.B., Jardine, A.G., Alabaster, C.T., Barclay, P.L., Connell, J.M., Dargie, H.J., Dilly, S.G., Findlay, I.N., Lever, A.F., and Samuels, G.M. (1989) Effects of UK 69 578: a novel atriopeptidase inhibitor, *Lancet*, 2, 591–593.
- Gros, C., Souque, A., Schwartz, J.C., Duchier, J., Cournot, A., Baumer, P., and Lecomte, J.M. (1989) Protection of atrial natriuretic factor against degradation: diuretic and natriuretic responses after in vivo inhibition of enkephalinase (EC 3.4.24.11) by acetorphan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 7580–7584.
- 61. Bevan, E.G., Connell, J.M., Doyle, J., Carmichael, H.A., Davies, D.L., Lorimer, A.R., and McInnes, G.T. (1992) Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy

- and tolerability in essential hypertension, *J. Hypertens.*, **10**, 607–613.
- 62. Richards, A.M., Wittert, G.A., Espiner, E.A., Yandle, T.G., Ikram, H., and Frampton, C. (1992) Effect of inhibition of endopeptidase 24.11 on responses to angiotensin II in human volunteers, *Circ. Res.*, 71, 1501–1507.
- 63. Ferro, C.J., Spratt, J.C., Haynes, W.G., and Webb, D.J. (1998) Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels *in vivo*, *Circulation*, **97**, 2323–2330.
- CONSENSUS Trial Study Group (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS), N. Engl. J. Med., 316, 1429–1435.
- SOLVD Investigators, Yusuf, S., Pitt, B., Davis, C.E., Hood, W.B., and Cohn, J.N. (1991) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure, *N. Engl. J. Med.*, 325, 293–302.
- 66. Trippodo, N.C., Robl, J.A., Asaad, M.M., Bird, J.E., Panchal, B.C., Schaeffer, T.R., Fox, M., Giancarli, M.R., and Cheung, H.S. (1995) Cardiovascular effects of the novel dual inhibitor of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme BMS-182657 in experimental hypertension and heart failure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 745–752.
- 67. McClean, D.R., Ikram, H., Garlick, A.H., Richards, A.M., Nicholls, M.G., and Crozier, I.G. (2000) The clinical, cardiac, renal, arterial and neurohormonal effects of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, in patients with chronic heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **36**, 479–486.
- Rouleau, J.L., Pfeffer, M.A., Stewart, D.J., Isaac, D., Sestier, F., Kerut, E.K., Porter, C.B., Proulx, G., Qian, C., and Block, A.J. (2000) Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial, *Lancet*, 356, 615–620.
- Packer, M., Califf, R.M., Konstam, M.A., Krum, H., McMurray, J.J., Rouleau, J.L., and Swedberg, K. (2002) Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE), Circulation, 106, 920–926.
- Kostis, J.B., Packer, M., Black, H.R., Schmieder, R., Henry, D., and Levy, E. (2004) Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial, Am. J. Hypertens, 17, 103–111.
- Fryer, R.M., Segreti, J., Banfor, P.N., Widomski, D.L., Backes, B.J., Lin, C.W., Ballaron, S.J., Cox, B.F., Trevillyan, J.M., Reinhart, G.A., and von Geldern, T.W. (2008) Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema, *Br. J. Pharmacol.*, 153, 947–955.
- McMurray, J.J., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R., PARADIGM-HF Investigators, and Committees (2014) Angiotensinneprilysin inhibition versus enalapril in heart failure, *N. Engl. J. Med.*, 371, 993–1004.
- Velazquez, E.J., Morrow, D.A., DeVore, A.D., Duffy, C.I., Ambrosy, A.P., McCague, K., Rocha, R., Braunwald, E., and PIONEER-HF Investigators (2019) Angiotensinneprilysin inhibition in acute decompensated heart failure, N. Engl. J. Med., 380, 539–548.
- Solomon, S.D., Rizkala, A.R., Gong, J., Wang, W., Anand, I.S., Ge, J., Lam, C.S.P., Maggioni, A.P., Martinez, F.,

- Packer, M., Pfeffer, M.A., Pieske, B., Redfield, M.M., Rouleau, J.L., Van Veldhuisen, D.J., Zannad, F., Zile, M.R., Desai, A.S., Shi, V.C., Lefkowitz, M.P., and McMurray, J.J. V. (2017) Angiotensin receptor neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction: rationale and design of the PARAGON-HF trial, *JACC Heart Fail.*, 5, 471–482.
- 75. Solomon, S.D., Rizkala, A.R., Lefkowitz, M.P., Shi, V.C., Gong, J., et al. (2018) Baseline characteristics of patients with heart failure and preserved ejection fraction in the PARAGON-HF trial, *Circ. Heart Fail.*, 11, e004962.
- 76. Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995) Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism, *Peptides*, **16**, 647–652.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T.C. (2000) Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition, *Nat. Med.*, 6, 143–150.
- 78. Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Lee, H.J., Shirotani, K., and Saido, T.C. (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain, *J. Biochem.*, **128**, 897–902.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.*, 8, 595–608.
- 80. Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, **256**, 184–185.
- 81. Hernandez-Zimbron, L.F., and Rivas-Arancibia, S. (2014) Deciphering an interplay of proteins associated with amyloid beta 1-42 peptide and molecular mechanisms of Alzheimer's disease, *Rev. Neurosci.*, **25**, 773–783.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6448–6453.
- 83. Yoon, S.S., and Jo, S.A. (2012) Mechanisms of amyloid-beta peptide clearance: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease, *Biomol. Ther.* (Seoul.), **20**, 245–255.
- 84. Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., and Holtzman, D.M. (2006) Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid *in vivo*, *Nat. Med.*, **12**, 856–861.
- 85. Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease, *Science*, **330**, 1774.
- 86. Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013) Neprilysin and abeta clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, 5, 98.
- 87. Eckman, E.A., Adams, S.K., Troendle, F.J., Stodola, B.A., Kahn, M.A., Fauq, A.H., Xiao, H.D., Bernstein, K.E., and Eckman, C.B. (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30471–30478.
- 88. Madani, R., Poirier, R., Wolfer, D.P., Welzl, H., Groscurth, P., Lipp, H.P., Lu, B., El Mouedden, M., Mercken, M., Nitsch, R.M., and Mohajeri, M.H. (2006)

- Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit *in vivo*, *J. Neurosci. Res.*, **84**, 1871–1878.
- Caccamo, A., Oddo, S., Sugarman, M.C., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2005) Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders, *Neurobiol. Aging*, 26, 645–654.
- Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., and Saido, T.C. (2004) Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain, *J. Neurosci.*, 24, 991–998.
- Marr, R.A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M.S., Hersh, L.B., Gage, F. H., Verma, I.M., and Masliah, E. (2003) Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice, *J. Neurosci.*, 23, 1992–1996.
- 92. Hong, C.S., Goins, W.F., Goss, J.R., Burton, E.A., and Glorioso, J.C. (2006) Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide *in vivo*, *Gene Ther.*, 13, 1068–1079.
- 93. Hemming, M.L., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Lin, L., Isacson, O., and Selkoe, D.J. (2007) Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an Abeta-degrading protease: a novel therapeutic approach to Alzheimer's disease, *PLoS Med.*, **4**, e262.
- 94. Lin, C.Y., Perche, F., Ikegami, M., Uchida, S., Kataoka, K., and Itaka, K. (2016) Messenger RNA-based therapeutics for brain diseases: an animal study for augmenting clearance of beta-amyloid by intracerebral administration of neprilysin mRNA loaded in polyplex nanomicelles, *J. Control. Release*, 235, 268–275.
- Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy, *Br. J. Pharmacol.*, 176, 3447–3463, doi: 10.1111/bph.14593.
- Park, M.H., Lee, J.K., Choi, S., Ahn, J., Jin, H. K., Park, J.S., and Bae, J.S. (2013) Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice, *Brain. Res.*, 1529, 113–124.
- 97. Vodovar, N., Paquet, C., Mebazaa, A., Launay, J.M., Hugon, J., and Cohen-Solal, A. (2015) Neprilysin, cardiovascular, and Alzheimer's diseases: the therapeutic split? *Eur. Heart J.*, **36**, 902–905.
- 98. Langenickel, T.H., Tsubouchi, C., Ayalasomayajula, S., Pal, P., Valentin, M.A., Hinder, M., Jhee, S., Gevorkyan, H., and Rajman, I. (2016) The effect of LCZ696 (sacubitril/valsartan) on amyloid-beta concentrations in cerebrospinal fluid in healthy subjects, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **81**, 878–890.
- Cannon, J.A., Shen, L., Jhund, P.S., Kristensen, S.L., Kober, L., Chen, F., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Swedberg, K., Zile, M.R., Solomon, S.D., Packer, M., McMurray, J.J., PARADIGM-HF Investigators, and Committees (2017) Dementia-related adverse events in PARADIGM-HF and other trials in heart failure with reduced ejection fraction, *Eur. J. Heart Fail.*, 19, 129–137.
- 100. Karnik, A.A., Gopal, D.M., Ko, D., Benjamin, E.J., and Helm, R.H. (2019) Epidemiology of atrial fibrillation and heart failure: a growing and important problem, *Cardiol. Clin.*, 37, 119–129.
- 101. Savarese, G., and Lund, L.H. (2017) Global public health burden of heart failure, *Card. Fail. Rev.*, 3, 7–11.

- Seronde, M.F., and Mebazaa, A. (2015) Neprilysin: biotarget and biomarker in heart failure, *JACC Heart Fail.*, 3, 645–646.
- 103. Bayes-Genis, A., Barallat, J., Galan, A., de Antonio, M., Domingo, M., Zamora, E., Urrutia, A., and Lupon, J. (2015) Soluble neprilysin is predictive of cardiovascular death and heart failure hospitalization in heart failure patients, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 65, 657–665.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J., Galan, A., de Antonio, M., Domingo, M., Zamora, E., Gastelurrutia, P., Vila, J., Penafiel, J., Galvez-Monton, C., and Lupon, J. (2015) Multimarker strategy for heart failure prognostication. Value of neurohormonal biomarkers: neprilysin vs NT-proBNP, Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.), 68, 1075–1084.
 Goliasch, G., Pavo, N., Zotter-Tufaro, C., Kammerlander, A.,
- 105. Goliasch, G., Pavo, N., Zotter-Tufaro, C., Kammerlander, A., Duca, F., Mascherbauer, J., and Bonderman, D. (2016) Soluble neprilysin does not correlate with outcome in heart failure with preserved ejection fraction, *Eur. J. Heart Fail.*, 18, 89–93.
- 106. Bayes-Genis, A., Barallat, J., Pascual-Figal, D., Nunez, J., Minana, G., Sanchez-Mas, J., Galan, A., Sanchis, J., Zamora, E., Perez-Martinez, M. T., and Lupon, J. (2015) Prognostic value and kinetics of soluble neprilysin in acute heart failure: a pilot study, *JACC Heart Fail.*, 3, 641–644.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J., and Richards, A.M. (2016) A test in context: neprilysin: function, inhibition, and biomarker, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 68, 639–653.
- 108. Vodovar, N., Seronde, M.F., Laribi, S., Gayat, E., Lassus, J., Januzzi, J.L., Jr., Boukef, R., Nouira, S., Manivet, P., Samuel, J.L., Logeart, D., Cohen-Solal, A., Richards, A.M., Launay, J.M., Mebazaa, A., and Network, G. (2015) Elevated plasma B-type natriuretic peptide concentrations directly inhibit circulating neprilysin activity in heart failure, *JACC Heart Fail.*, 3, 629–636.
- 109. Emrich, I.E., Vodovar, N., Feuer, L., Untersteller, K., Nougue, H., Seiler-Mussler, S., Fliser, D., Launay, J.M., and Heine, G.H. (2019) Do plasma neprilysin activity and plasma neprilysin concentration predict cardiac events in chronic kidney disease patients? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 34, 100–108.
- 110. Zhuravin, I.A., Nalivaeva, N.N., Kozlova, D.I., Kochkina, E.G., Fedorova, Y.B., and Gavrilova, S.I. (2015) The activity of blood serum cholinesterases and neprilysin as potential biomarkers of mild-cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova*, 115, 110–117, doi: 10.17116/jnevro2015115112110-117.
- 111. Medeiros, M.A., Franca, M.S., Boileau, G., Juliano, L., and Carvalho, K.M. (1997) Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **30**, 1157–1162.
- 112. Takahashi, G., Tabata, M., Taguchi, K., and Chikuma, T. (2015) Fluorimetric assay for measuring neprilysin activity using HPLC, *Chromatographia*, **78**, 593–597.
- 113. Feygina, E.E., Artemieva, M., Postnikov, A.B., Tamm, N.N., Bloshchitsyna, M.N., Medvedeva, N.A., Katrukha, A.G., and Semenov, A.G. (2019) Detection of neprilysin-derived BNP fragments in the circulation: possible insights for targeted neprilysin inhibition therapy for heart failure, *Clin. Chem.*, doi: 10.1373/clinchem.2019. 303438.
- 114. Burrell, M., Henderson, S.J., Ravnefjord, A., Schweikart, F., Fowler, S.B., Witt, S., Hansson, K.M., and Webster, C.I. (2016) Neprilysin inhibits coagulation through proteolytic inactivation of fibrinogen, *PLoS One*, 11, e0158114.

NEUTRAL ENDOPEPTIDASE (NEPRILYSIN) IN THERAPY AND DIAGNOSTICS: "YIN AND YANG"

Review

E. E. Feygina^{1,2*,**}, A. G. Katrukha^{1,3**}, and A. G. Semenov^{1,2**}

HyTest Ltd., Turku, Finland; E-mail: Evgeniya. Feygina@hytest.fi
 Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia
 Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

Received June 7, 2019 Revised August 2, 2019 Accepted August 19, 2019

Neprilysin (NEP) is a zinc-dependent membrane-bound endopeptidase, which is present in an organism in transmembrane and soluble forms. The enzyme has a wide range of substrates involved in the cardiovascular and nervous systems regulation. In this review, we discuss some biochemical characteristics of NEP and its physiological function. The main focus of this work is the use of NEP as a therapeutic target: the history and various physiological aspects of NEP inhibitors implementation for heart failure treatment, attempts to increase NEP activity for treatment of Alzheimer's disease using gene and cell therapy approaches.

Another important issue considered in this review is the role of NEP as a potential marker for predicting the risk of cardiovascular disease complications. The results of analysis of the diagnostic and prognostic performance of the NEP soluble form in various types of heart failure are presented. Measurement of NEP activity for prognostic and diagnostic use, methods and approaches that can be used for this purpose, as well as the possible new role of natriuretic peptides — the substrates of NEP — in the field of cardiovascular diagnostics, are also discussed.

Keywords: neprilysin, natriuretic peptides, ARNi, heart failure, Alzheimer's disease, biomarkers, immunoanalysis