

БЕЛОК АКТИВАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ АЛЬФА (FAP α) КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ФИБРОЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ОЦЕНКЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2025 г.

Д. А. БУТУЗОВА[#], М. А. КУЛЕБЯКИНА[#],
Н. А. БАСАЛОВА, А. Ю. ЕФИМЕНКО

МГУ имени М.В. Ломоносова, Медицинский научно-образовательный институт, Москва

I. Введение. II. Строение и свойства FAP α . Ферментативная активность и субстратная специфичность FAP α . III. Субстраты для измерения и визуализации ферментативной активности FAP α . IV. Ингибиторы FAP α . V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом в мире растёт число больных неинфекционными заболеваниями, среди которых особое значение занимают патологии, ассоциированные с изменением стромы: злокачественные новообразования, фиброз и воспалительные процессы [1]. Данные заболевания имеют сложный и не до конца изученный патогенез, в ходе которого активное участие принимают стромальные клетки [2]. Для разработки эффективных методов диагностики таких заболеваний и новых терапевтических подходов необходимо детальное выяснение механизмов их развития, для чего активно используются молекулы, позволяющие визуализировать патологические изменения стромы. Белок активации фибробластов альфа, или FAP α (Fibroblast Activation Protein alpha), трансмембранная сериновая пептидаза, экспрессирующаяся на активированных стромальных клетках – одна из таких молекул [3–5]. FAP α является маркером фибробластов, ассоциированных с опухолью (ФАО), а также фибробластов, ассоциированных с фиброзом (ФАФ), которые играют активную роль в прогрессии опухоли и фиброза, соответственно [6–8].

Список сокращений: ИК – инфракрасный, BNP – мозговой натрийуретический пептид, BoroPro – боропролин, СВТ – 2-циано-6-аминобензотиазол; CCL4 – CC-хемокина лиганд 4, CL – хемилюминесцентный краситель на основе адамантантилиден-1,2-диоксэтана, CXCL2 – CXС-хемокина лиганд 2, CV – крезильовый фиолетовый, Cy – цианиновые флуоресцентные красители, Cy_{NIR} – цианиновый краситель, флуоресцирующий в ближней ИК области, DPP-4 – дипептидилпептидаза 4, FAP α – белок активации фибробластов альфа, GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1, NPY – нейропептид Y, PREP – пролилэндопептидаза, PYY – пептид YY, SDF-1 – фактор стромального происхождения 1, SP – вещество P, TMN – (E)-2-(3-(4-аминостирил)-5,5-диметилциклогекс-2-ен-1-илиден) малонитрил, tBu – терт-бутилтиолат, XCy – ксантен-цианиновый флуорогенный краситель.

[#] – равный вклад

Адрес для корреспонденции: da.butuzova@gmail.com

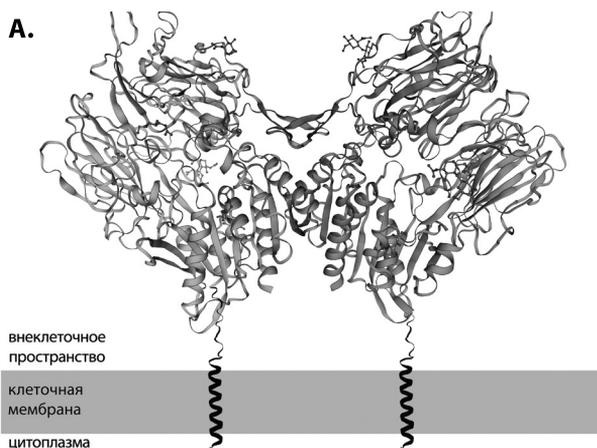
К настоящему времени создан ряд подходов к визуализации FAP α -экспрессирующих клеток и оценки ферментативной активности FAP α , которые применяются для выявления опухолевых образований в организме пациента. Однако в последние годы по мере изучения свойств этого белка и вклада FAP α -экспрессирующих клеток в патогенез различных заболеваний накапливаются данные о том, что FAP α – не только маркер, но и участник ряда патологических процессов, происходящих в строме [6, 9]. Более того, существует ряд физиологических эффектов FAP α , не связанных с его специфической ферментативной активностью и, напротив, некоторые функции этого белка сводятся к его ферментативной активности [10, 11]. В связи с этим для изучения роли FAP α в развитии патологических процессов в строме *in vivo* требуются инструменты, позволяющие прицельно визуализировать и оценивать специфическую ферментативную активность FAP α . В настоящем обзоре будут рассмотрены существующие подходы к визуализации и управлению ферментативной активностью FAP α .

II. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА FAP α . ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ FAP α

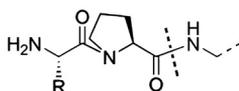
FAP α , или сепсаза, является пролин-специфической пептидазой и представляет собой трансмембранный гликопротеин, существующий преимущественно в виде гомодимера двух субъединиц массой 97 кДа каждая (рис. 1 А) [12–15]. Наряду с мембранносвязанной формой FAP α , в крови человека и мыши обнаруживается укороченный вариант этого белка, образующийся в результате шеддинга (высвобождения внеклеточного фрагмента, отщепленного от мембранного белка в результате действия протеаз, во внеклеточное пространство). Данная форма носит название антиплазмин-расщепляющего фермента (antiplasmin-cleaving enzyme, APCE). [16, 17]. В норме во всех тканях взрослого организма уровень экспрессии FAP α низкий, однако при состояниях, сопровождающихся активной пролиферацией клеток и ремоделированием внеклеточного матрикса, таких как развитие опухолей, фиброз легких, цирроз печени, постинфарктный склероз, образование келоидных рубцов и ревматоидный артрит, экспрессия FAP α значительно возрастает [18]. При этих патологиях FAP α преимущественно экспрессируется в клетках мезенхимального происхождения (мезенхимальные стромальные клетки, фибробласты, синовиоциты и др.) [19], где локализован в основном в инвадоподиях [17].

FAP α обладает как экзопептидазной (дипептидилпептидазной), так и эндопептидазной активностью. В обоих случаях гидролизуемая пептидная связь образована карбоксильной группой остатка пролина (рис. 1 Б, В). К субстратам дипептидилпептидазной активности FAP α относятся нейропептид Y (NPY), пептид YY (PYY), вещество P (SP) и натрийуретический пептид В-типа (BNP) [12, 21, 22]. Среди субстратов эндопептидазной активности FAP α основными являются денатурированный и частично расщепленный коллаген I и III типа, фактор роста фибробластов 21 (FGF-21) и альфа-2-антиплазмин [4, 23, 24].

Хорошо известно, что ферментативная (в первую очередь, экзопептидазная) активность FAP α вносит важный вклад в развитие онкологических заболеваний, фиброза и некоторых других патологических состояний [6, 8, 25, 26]. Однако в последние годы появляется всё больше данных о том, что механизмы участия FAP α в патогенезе данных состояний не ограничиваются его ферментативной активностью. Так, по данным нескольких коллективов, мутантная форма белка FAP α , лишенная ферментативной активности, тем не менее участвует в процессах миграции, инвазии и выживаемости клеток



Б. Дипептидилпептидазная активность



В. Эндопептидазная активность

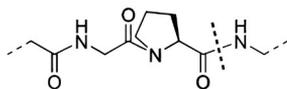


Рис. 1. А. Строение молекулы FAP α (по [12, 20], с изм.). Расщепляемые связи в молекулах субстратов экзопептидазной (Б) и эндопептидазной (В) активности FAP α .

[11, 27, 28], а использование высокоселективного ингибитора ферментативной активности FAP α для ингибирования прогрессии опухоли в мышинной модели рака поджелудочной железы, вопреки ожиданиям, не показало свою эффективность по результатам доклинических исследований [29]. Эти данные указывают на важность отдельного исследования функций FAP α , не связанных с ферментативной активностью, в различных (в первую очередь, стромальных) клетках, а также на необходимость создания инструментов для специфической визуализации ферментативной активности FAP α . Ниже будут рассмотрены основные существующие подходы к решению этих задач.

III. СУБСТРАТЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ FAP α

Основные известные на данный момент субстраты для визуализации ферментативной активности FAP α приведены в таблице 1, а их структурные формулы отображены на рис. 2. В настоящее время коммерчески доступны несколько флуорогенных субстратов для определения активности FAP α , такие как Ala-Pro-AMC и Z-Gly-Pro-AMC, гидролиз

Таблица 1. Известные субстраты для визуализации и количественной оценки ферментативной активности FAPa

Название	Вид сигнала	Применение для визуализации активности FAPa			Не гидролизуется		Ссылка
		<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>	<i>in vivo</i>	DPP-4	PREP	
Ala-Pro-AMC	флуоресценция	+	-	-	-	+	[53, 54]
aP (HiLyte Fluor 488-Val-D-Ala-Pro-Ser-Gln-Gly-Lys-QXL520)		+	-	-	+	+	[52]
ARI-3144-AMC (N-(4-карбоксихинолин)-D-Ala-L-Pro-AMC)		+	-	-	+	-	[46]
Z-Gly-Pro-Cys(StBu)-Lys(кумарин)-CBT		+	-	+	+	-	[51]
CV-FAP (Z-Gly-Pro-CV)		+	+	+	+	-	[50]
Сy-FAP (Val-Pro-XCy)		+	+	+	+	-	[49]
N-(4-карбоксихинолин)-D-Ala-L-(4,4-дифтор)Pro-AMC		+	-	-	+	+	[47]
Ac-Gly-Pro-TMN		+	+	-	-	+	[48]
Z-GlyPro-AMC		+	-	-	+	-	[30]
ANP _{FAP} (Ac-Lys(QSY21)-Gly-Pro-Gly-Pro-Asn-Gln-Cys-Cy5.5)	флуоресценция в ближней ИК области	+	-	+	+	-	[55]
Z-FNP1 (Z-Gly-Pro-п-амино-Z-N,N'-диметилендиамин-C(O)-OCy _{NIR})		+	+	+	+	-	[56]
Gly-Thr-Asp-Thr-Lys-Thr-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Val-Phe-ePhe-Cys(Cy)-Thr-Asp-Thr-Gly		-	+	+	+	-	[57]
HCFP (Ac-Gly-Pro-XCy)		+	+	+	+	-	[58]
BL-FAP (Ac-Gly-Pro-аминолюциферин)	хемилюминесценция	+	+	+	+	+	[59]
CFCL (Z-Gly-Pro-п-аминобензил-CL)		+	+	+	+	+	[60]
Cy5.5-Lys-Gly-Pro-Asn-Gln-Cys		+	+	-	+	-	[61]
N-(4-карбоксихинолин)-Gly-L-Pro-4-гидрокси-1-нафтиламид	колориметрия	+	+	-	+	+	[47]

* отсутствие кросс-специфичности к DPP-4 (экзопептидазе) либо PREP (эндопептидазе) можно предположить, исходя из структурной формулы данного субстрата.

** требует присутствия люциферазы в системе.

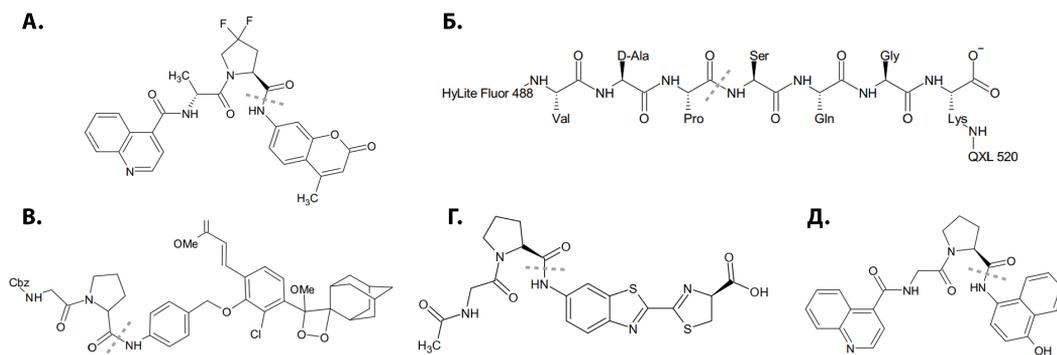


Рис. 2. Структурные формулы субстратов для визуализации специфической ферментативной активности FAP α . Гидролизуемые связи обозначены пунктиром. А) N-(4-карбоксихинолин)-D-Ala-L-(4,4-дифтор)Pro-AMC; Б) aP; В) CFCL; Г) BL-FAP α ; Д) N-(4-карбоксихинолин)-Gly-L-Pro-4-гидрокси-1-нафтиламид.

пептидной связи в которых приводит к высвобождению флуорофора 7-амино-4-метилкумарина. Однако все эти субстраты не являются селективными: их применение не позволяет отличить пептидазную активность FAP α от активности двух других родственных пептидаз – DPP-4 либо PREP. Так, Ala-Pro-AMC, гидролиз пептидной связи в котором приводит к высвобождению флуорофора 7-амино-4-метилкумарина, является флуорогенным субстратом как для FAP α , так и для DPP-4, а Z-Gly-Pro-AMC является субстратом для FAP α и PREP [30].

Дипептидилпептидаза-4 (DPP-4, CD26) – мембранная сериновая экзопептидаза, каталитически активная в виде димера (молекулярная масса димера – 110–130 кДа). Несмотря на сходство структуры (52% последовательности DPP-4 и FAP α идентичны) и наличие ряда общих субстратов (таких как NPY, PYY, SP, BNP, GLP-1), функции DPP-4 и FAP α в организме существенно различаются [16, 31, 32]. В отличие от FAP α , DPP-4 не обладает эндопептидазной активностью, но за счёт своей экзопептидазной активности способна расщеплять и инактивировать некоторые хемокины, включая CXCL2, CCL4, SDF-1 и др [33]. Кроме того, в отличие от FAP α , DPP-4 в норме экспрессируется во многих тканях, включая легкие, печень, почки, кишечник, тимус, поджелудочную железу, жировую ткань [34, 35].

Пролилэндопептидаза (PREP, также известная как пролилполипептидаза, или POP) – эндопептидаза с молекулярной массой около 60 кДа, экспрессирующаяся в норме практически во всех тканях и наиболее высокопредставленная в центральной нервной системе [36]. Ранее PREP считалась преимущественно цитозольным ферментом, но сравнительно недавно была открыта также её мембранно-ассоциированная форма (получившая название mPOP), а также было показано наличие специфической для PREP активности в крови, ликворе и бронхоальвеолярном лаваже [37–39]. По сравнению с FAP α пролилэндопептидаза характеризуется меньшей избирательностью по отношению к аминокислотным остаткам, располагающимся у расщепляемой пептидной связи [12]. Изменения экспрессии и активности PREP связывают не только с канцерогенезом, но и

с воспалительными процессами, а также с рядом неврологических и психических расстройств [40–43].

Поскольку коммерчески доступные субстраты ферментативной активности FAP α являются одновременно субстратами DPP-4 либо PREP, то использовать данные соединения для измерения активности FAP α возможно только совместно со специфическими ингибиторами DPP-4 (например, P32/98 [44]) либо PREP (например, Z-Pro-Prolinal (ZPPal)) [45]. Однако такой подход усложняет схему эксперимента за счёт необходимости введения дополнительных контролей, а иногда в принципе не применим. Поэтому в настоящее время предпринято много попыток создать субстраты FAP α , пептидная связь в которых бы не подвергалась гидролизу под воздействием других близкородственных пептидаз.

Среди субстратов для оценки ферментативной активности FAP α , синтезированных на базе исследовательских лабораторий, наиболее широко представлены флуорогенные субстраты. Молекулы таких соединений обычно содержат амидную связь, гидролизующую FAP α . Гидролиз этой связи позволяет пространственно разделить флуорофор и тушитель флуоресценции и высвободить флуорогенный фрагмент молекулы. В числе первых таких субстратов синтезировано вещество ARI-3144-AMC [46], которое, однако, оказалось также субстратом PREP [47]. Для субстрата Ac-Gly-Pro-TMN, который благодаря характеристикам генерируемого флуоресцентного сигнала возможно применять для визуализации опухолей *ex vivo*, отсутствует информация о том, способно ли оно подвергаться гидролизу под воздействием DPP-4 [48]. Субстрат Cy-FAP, предложенный к применению *in situ* (для микроскопии клеточных культур) и *in vivo* (в формате подкожных инъекций для визуализации меланомы), также не охарактеризован на предмет того, способна ли PREP гидролизовать данное соединение [49]. Для CV-FAP – субстрата FAP α , отличающегося необычайно высокой чувствительностью (предел чувствительности – 5,3 ng/mL) – также не приведено данных о том, является ли данное вещество субстратом PREP [50]. Gao и соавторы предложили подход, в котором флуорогенный субстрат Z-Gly-Pro-Cys(StBu)-Lys(coumarin)-CBT после гидролиза в реакции, катализируемой FAP α , может формировать эксимеры, характеризующиеся высоким уровнем сигнала и временем удержания в тканях, что позволяет локализовать расположение клеток, экспрессирующих FAP α , с высокой точностью [51]. Тем не менее, для данного субстрата способность гидролизываться под воздействием PREP также не проверена. Наиболее хорошо охарактеризовано с этой точки зрения соединение, синтезированное на основе ингибитора FAP α UAMC-1110 (N-(4-карбоксихинолин)-D-Ala-L-(4,4-дифтор)Pro-AMC, Таблица 1; [47]), а также aP – производное флуорогенного субстрата на основе фрагмента FGF21 – природного субстрата эндопептидазной активности FAP α [52]. Структурные формулы указанных веществ приведены на рис. 2 А, Б. Данные субстраты позволяют количественно оценивать ферментативную активность FAP α , однако, ввиду быстрой диффузии генерируемого флуорофора в растворе, не могут быть применены для ответа на вопрос о локализации FAP α в экспериментах *in situ* и *in vivo*.

Отдельно следует упомянуть субстраты для детекции ферментативной активности FAP α методом измерения флуоресценции в ближней инфракрасной области. Благодаря сравнительно низкому уровню автофлуоресценции тканей в этой области спектра детекция сигнала от таких флуорогенов возможна в глубоких слоях ткани. Одним из первых таких субстратов было синтезировано вещество ANP_{FAP}, которое в тестах *in vivo* демонстрировало интенсивное накопление в опухоли, инъекционной мышам, и благодаря

этому было успешно применено для визуализации опухоли *in vivo* [55]. Однако, как и в случае многих других субстратов, ANP_{FAP} оказался также субстратом PREP [52]. В 2020 году Xing и соавторы сообщили о синтезе субстрата HCFP (Ac-Gly-Pro-X-Cy), который возможно применять для получения изображений методом флуоресцентной микроскопии, в дополнение к *in vitro* оценке ферментативной активности FAP α в растворе и *in vivo* визуализации крупных скоплений FAP α^+ клеток. Название данного вещества (Ac-Gly-Pro-X-Cy) позволяет предположить, что он не будет являться субстратом экзопептидазной активности DPP-4, однако вопрос о том, способна ли PREP гидролизовать HCFP, остается не изученным [58].

Предложен также подход к визуализации ферментативной активности FAP α с использованием субстрата, формирующего после гидролиза агрегаты из нановолокон, что способствует усиленному накоплению сигнала вокруг FAP α -положительных клеток [57], однако для данного субстрата также не исследована возможность гидролиза под действием PREP. Miao с соавторами создали субстрат FNP1, эффективный для применения в различных приложениях, включая *in vivo* идентификацию сравнительно небольших (200000 клеток) подкожных скоплений FAP α -положительных келоидных фибробластов. Тем не менее, не уточняется, способна ли PREP гидролизовать данный субстрат [56].

Для визуализации активности FAP α перспективными также считаются люминесцентные субстраты, поскольку для них характерно высокое соотношение сигнал/шум [60]. Одним из таких субстратов является CFCL (структурная формула приведена на рис. 2 В), применение которого *in vitro* в присутствии FAP α даёт в 33 и в 121 более сильный сигнал по сравнению с PREP и DPP-4, соответственно [60]. В работе Zhang и соавт. описано получение соединения BL-FAP α , которое в присутствии FAP α генерирует сигнал, более чем в 50000 раз превышающий сигнал данного вещества в присутствии DPP-4 и PREP. Структурная формула данного соединения приведена на рис. 2 Г. BL-FAP α в реакции, катализируемой FAP α , даёт продукт D-аминолюциферин, который, в свою очередь, является субстратом люциферазы [59]. Необходимость присутствия люциферазы в системе, таким образом, накладывает ограничения на использование этого соединения в качестве люминогенного субстрата для FAP α в работе с пациентами. Предложен также способ визуализации активности FAP α в растворе и в прикрепленных культурах клеток на основе резонансного переноса энергии послесвечения. Субстрат, используемый в данной методике, не гидролизуется под действием DPP-4, однако данных о способности PREP гидролизовать данный субстрат не приведено. [61].

Наконец, отметим, что разработан высокоспецифический субстрат для колориметрической детекции активности FAP α . Это вещество, синтезированное в работе de Decker и соавт. [47] на основе ингибитора UAMC1110 (полное название приведено в Таблице 1, структурная формула соединения отображена на рис. 2 Д). Авторами показана возможность применения данного субстрата для визуализации активности FAP α *in situ*.

Следует отметить, что для оценки ферментативной активности FAP α также возможно применять метод желатиновой зимографии, совмещённой с предварительной иммунопреципитацией FAP α из образца. Данный метод оценки ферментативной активности FAP α можно назвать «золотым стандартом» с точки зрения специфичности. Однако такой подход, ввиду необходимости предварительной иммунопреципитации FAP α из образца, не может быть адаптирован для экспериментов *in situ* и *in vivo*. Кроме того, он является полуколичественным, что накладывает соответствующие ограничения

на дизайн экспериментов. Важно добавить, что экзопептидазная активность FAP α не может быть измерена данным методом. Наконец, к недостаткам метода можно отнести необходимость наработки исходного материала в большом количестве (не менее 1 млн фибробластов кожи человека, по нашим данным), что, по всей видимости, связано со сравнительно низкой желатиназной активностью FAP α .

Далее будут рассмотрены основные текущие направления разработки специфических ингибиторов FAP α .

IV. ИНГИБИТОРЫ FAP α

Сходство строения активного центра FAP α с пептидазами DPP-4 и PREP усложняет создание высокоспецифических ингибиторов. Основные известные на данный момент ингибиторы FAP α и их кинетические параметры ингибирования (концентрация полуингибирования и/или константа ингибирования) приведены в таблице 2. Среди них имеются ранее известные ингибиторы других пептидаз, которые продемонстрировали способность ингибировать ферментативную активность FAP α . Подобным свойством обладает вещество талабостат (PT-100, Val-BoroPro) – конкурентный ингибитор DPP-4 и ряда других дипептидилпептидаз [62, 63]. И, напротив, в результате разработки многих ингибиторов FAP α созданы вещества, эффективно ингибирующие как FAP α , так и PREP и/или DPP-4. К таким ингибиторам относятся, в частности, вещества BR102910 [64] и Ac-Gly-BoroPro [65], псевдопептидный ингибитор M83 [66]. Вместе с тем, у некоторых из них сродство к FAP α существенно выше, чем сродство к PREP и DPP-4. Среди них есть эффективный ингибитор FAP α , созданный Jansen и соавт. на основе линаглиптина – производного ксантина, обладающего способностью ингибировать DPP-4 [67]. Высоким сродством к FAP α обладает и псевдопептидный ингибитор IOCB22-AP446, для которого показана стабильность к деградации в плазме крови, а также низкая цитотоксичность [68]. Вещество ARI-3099 более чем в 350 раз эффективнее ингибирует FAP α по сравнению с PREP и практически не обладает сродством к дипептидилпептидазам [69]. На основе физиологического субстрата растворимой формы FAP α создан ингибитор (Phe-Arg-(8-амино-3,6-диоксооктановая кислота)-Gly-(R)-фторпирролидин), сродство которого к FAP α многократно превышает сродство к DPP-4 [70].

Наиболее полно охарактеризованным и широко используемым ингибитором FAP α является соединение UAMC-1110 [76]. Отметим, что UAMC-1110 также является ингибитором PREP, но при этом его сродство к PREP более чем в 500 раз ниже, чем сродство к FAP α .

На основе данного ингибитора Van Rymenant и соавторы разработали флуорогенные зонды для молекулы FAP α , пригодные для использования *in vitro* и *in situ* [77]. Более того, созданы радиоактивно меченные производные UAMC-1110 для диагностики и таргетной терапии опухолей. К ним относится, в частности, ⁶⁸Ga-FAPI, диагностическая ценность которого была показана, в том числе в клинической практике, для таких видов рака, как первичный рак неизвестного происхождения, саркома, рак пищевода, рак молочной железы и холангиокарцинома [78, 79].

На основании накопленных знаний о строении и функционировании FAP α можно предложить ещё один способ подавления ферментативной активности данного белка. Показано, что экзопептидазная активность требует димеризации FAP α [80]. Следовательно, теоретически возможно создание пептида или малой молекулы, которые бы

Таблица 2. Основные известные ингибиторы FAPa и их кинетические параметры ингибирования

Название	IC ₅₀ , nM			K _i , nM			Ссылка
	FAP	DPP-4	PREP	FAP	DPP-4	PREP	
Talabostat (PT100, Val-BoroPro)	560	< 4	390	–	0,18	–	[71, 72]
UAMC-1110 (N-(4-карбоксихинолин)-D-Ala-L-4,4-дифторпирролидин-2-карбонитрил)	3,2	>1*10 ⁵	1800	–	–	–	[73]
Ac-Gly-BoroPro	–	–	–	23	377	211	[65]
M83 (ацетил-аргинил-8-амино-3,6-диоксаоктаноил-D-Ala-L-BoroPro)	–	–	–	5,7	>10 ⁴	7,4	[66, 74]
13f (7-(бут-2-инил)-3-метил-1-((4-метилхиназолин-2-ил)метил)-8-(3-оксопиперазин-1-ил)-1H-пурин2,6(3H,7H)-дион)	1900	>50000	>1*10 ⁵	–	–	–	[67]
ЮСВ22-AP446 ((S)-N-(2-(2-(2-((3,4-диметоксибензил)амино)-2-оксоацетил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)хинолин-4-карбоксамид)	0,089	>3000	0,26	–	–	–	[68]
BR102910 (N-(2-(3,4-дихлорбензил)-тиазол-4-карбоксо)-Gly-L-4,4-дифторпирролидин-2-карбонитрил)	2	>1*10 ⁵	49000	–	–	–	[64]
ARI-3099 (N-(4-карбоксопипридин)-D-Ala-D-BoroPro)	36	>1*10 ⁵	13000	9	–	3100	[69]
18a ((2S,4S)-1-({(2S,4S)-4-[2-(1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)-2-оксоэтил]-5-оксопирролидин-2-ил}карбонил)-4-фторпирролидин-2-карбонитрил)	20	>1*10 ⁵	–	–	–	–	[75]
Phe-Arg-(8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота)-Gly-(R)-фторпирролидин	91000	–	–	54*10 ³	>2*10 ⁶	–	[70]

препятствовали димеризации FAP α . Использование таких молекул позволило бы прицельно ингибировать экзопептидазную активность FAP α , сохранив при этом эндопептидазную.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно ведётся разработка различных способов оценки, визуализации и подавления ферментативной активности FAP α с помощью малых молекул. Предложены несколько вариантов ингибирования FAP α и измерения ферментативной активности данного белка, обсужденные в настоящем обзоре. Тем не менее, можно сделать вывод о недостаточном разнообразии доступных на сегодняшний день специфических ингибиторов FAP α , а также меток и субстратов с различными способами детекции, которые позволили бы отличить активность FAP α , обычно повышающуюся при разных патологических состояниях, от фоновой активности близкородственных пептидаз – в первую очередь, DPP-4 и PREP, активность которых в норме наблюдается во многих тканях. Учитывая важную роль FAP α в патогенезе и диагностике многих социально значимых заболеваний, актуальной задачей является дальнейшая разработка молекулярных инструментов для детекции и направленной модификации функциональной активности этого белка.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Islam, S.M.S., Purnat, T.D., Phuong, N.T.A., Mwingira, U., Schacht, K., Fröschl, G. (2014). Non-Communicable Diseases (NCDs) in developing countries: A symposium report, *Globalization and Health*, **10**(1), 81.
2. Kopp, W. (2022). Pathogenesis of (smoking-related) non-communicable diseases—Evidence for a common underlying pathophysiological pattern, *Frontiers in Physiology*, **13**.
3. Han, C., Liu, T., Yin, R. (2020). Biomarkers for cancer-associated fibroblasts, *Biomarker Research*, **8**(1), 64.
4. Tarín-Nieto, A., Solano-Iturri, J.D., Arrieta-Aguirre, I., Valdivia, A., Etxezarraga, M.C., Loizate, A., López, J.I., Larrinaga, G. (2023). Fibroblast Activation Protein- α (FAP) Identifies Stromal Invasion in Colorectal Neoplasia, *The American Journal of Surgical Pathology*, **47**(9), 1027–1033.
5. Zhao, L., Chen, J., Pang, Y., Fu, K., Shang, Q., Wu, H., Sun, L., Lin, Q., Chen, H. (2022). Fibroblast activation protein-based theranostics in cancer research: A state-of-the-art review, *Theranostics*, **12**(4), 1557–1569.
6. Basalova, N., Alexandrushkina, N., Grigorieva, O., Kulebyakina, M., Efimenko, A. (2023). Fibroblast Activation Protein Alpha (FAP α) in Fibrosis: Beyond a Perspective Marker for Activated Stromal Cells? *Biomolecules*, **13**(12), Article 12.

7. Xin, L., Gao, J., Zheng, Z., Chen, Y., Lv, S., Zhao, Z., Yu, C., Yang, X., Zhang, R. (2021). Fibroblast Activation Protein- α as a Target in the Bench-to-Bedside Diagnosis and Treatment of Tumors: A Narrative Review, *Frontiers in Oncology*, **11**.
8. Fitzgerald, A.A., Weiner, L.M. (2020). The role of fibroblast activation protein in health and malignancy, *Cancer and Metastasis Reviews*, **39**(3), 783–803.
9. Li, M., Deng, Z., Xie, C., Chen, J., Yuan, Z., Rahhal, O., Tang, Z. (2023). Fibroblast activating protein promotes the proliferation, migration, and activation of fibroblasts in oral submucous fibrosis, *Oral Diseases*.
10. Sun, Y., Ma, M., Cao, D., Zheng, A., Zhang, Y., Su, Y., Wang, J., Xu, Y., Zhou, M., Tang, Y., Liu, Y., Ma, T., Fan, A., Zhang, X., Zhu, Q., Qin, J., Mo, C., Xu, Y., Zhang, L., Xu, D., Yue, R. (2023). Inhibition of Fap Promotes Cardiac Repair by Stabilizing BNP, *Circulation Research*, **132**(5), 586–600.
11. Huang, Y., Simms, A.E., Mazur, A., Wang, S., León, N.R., Jones, B., Aziz, N., Kelly, T. (2011). Fibroblast activation protein- α promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions, *Clinical Experimental Metastasis*, **28**(6), 567–579.
12. Šimková, A., Bušek, P., Šedo, A., Konvalinka, J. (2020). Molecular recognition of fibroblast activation protein for diagnostic and therapeutic applications, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **1868**(7), 140409.
13. Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G.P., Jennings, A., Prasad, G.S., Zhang, Y., Kraus, M.L., Salakian, S., Sridhar, V., Wijnands, R., Tennant, M.G. (2005). Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**(20), 19441–19444.
14. Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts, *The Journal of Biological Chemistry*, **274**(51), 36505–36512.
15. Goldstein, L.A., Ghersi, G., Piñeiro-Sánchez, M.L., Monica Salamone, Yeh, Y., Flessate, D., Chen, W.-T. (1997). Molecular cloning of seprase: A serine integral membrane protease from human melanoma, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1361**(1), 11–19.
16. Vliegen, G., Kehoe, K., Bracke, A., De Hert, E., Verkerk, R., Franssen, E., Jongers, B.'s, Peters, E., Lambeir, A.-M., Kumar-Singh, S., Pickkers, P., Jorens, P.G., De Meester, I. (2020). Dys-regulated activities of proline-specific enzymes in septic shock patients (sepsis-2), *PLoS One*, **15**(4), e0231555.
17. Hamson, E.J., Keane, F.M., Tholen, S., Schilling, O., Gorrell, M.D. (2014). Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy, *PROTEOMICS – Clinical Applications*, **8**(5–6), 454–463.
18. Dienus, K., Bayat, A., Gilmore, B.F., Seifert, O. (2010). Increased expression of fibroblast activation protein-alpha in keloid fibroblasts: Implications for development of a novel treatment option, *Archives of Dermatological Research*, **302**(10), 725–731.
19. Greimelmaier, K., Klopp, N., Mairinger, E., Wessolly, M., Borchert, S., Steinborn, J., Schmid, K.W., Wohlschlaeger, J., Mairinger, F.D. (2023). Fibroblast activation protein- α expression in fibroblasts is common in the tumor microenvironment of colorectal cancer and may serve as a therapeutic target, *Pathology and Oncology Research*, **29**, 1611163.
20. FAP - Prolyl endopeptidase FAP - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. (n.d.).
21. Wong, P.F., Gall, M.G., Bachovchin, W.W., McCaughan, G.W., Keane, F.M., Gorrell, M.D. (2016). Neuropeptide Y is a physiological substrate of fibroblast activation protein: Enzyme kinetics in blood plasma and expression of Y2R and Y5R in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Peptides*, **75**, 80–95.

22. Keane, F.M., Nadvi, N.A., Yao, T.-W., Gorrell, M.D. (2011). Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- α , *The FEBS Journal*, **278**(8), 1316–1332.
23. Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Dolence, E.K., McKee, P.A. (2011). Enhancement of fibrinolysis by inhibiting enzymatic cleavage of precursor α 2-antiplasmin, *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, **9**(5), 987–996.
24. Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Lee, C.S., Chun, J.-G., McKee, P.A. (2006). Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein, *Blood*, **107**(4), 1397–1404.
25. Yang, A.-T., Kim, Y.-O., Yan, X.-Z., Abe, H., Aslam, M., Park, K.-S., Zhao, X.-Y., Jia, J.-D., Klein, T., You, H., Schuppan, D. (2023). Fibroblast Activation Protein Activates Macrophages and Promotes Parenchymal Liver Inflammation and Fibrosis, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **15**(4), 841–867.
26. Juillerat-Jeanneret, L., Tafelmeyer, P., Golshayan, D. (2017). Fibroblast activation protein- α in fibrogenic disorders and cancer: More than a prolyl-specific peptidase? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **21**(10), 977–991.
27. Li, B., Ding, Z., Calbay, O., Li, Y., Li, T., Jin, L., Huang, S. (2023). FAP is critical for ovarian cancer cell survival by sustaining NF- κ B activation through recruitment of PRKDC in lipid rafts, *Cancer Gene Therapy*, **30**(4), 608–621.
28. Jia, J., Martin, T.A., Ye, L., Jiang, W.G. (2014). FAP- α (Fibroblast activation protein- α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway, *BMC Cell Biology*, **15**(1), 16.
29. Gunderson, A.J., Yamazaki, T., McCarty, K., Phillips, M., Alice, A., Bambina, S., Zebertavage, L., Friedman, D., Cottam, B., Newell, P., Gough, M.J., Crittenden, M.R., Van der Veken, P., Young, K.H. (2019). Blockade of fibroblast activation protein in combination with radiation treatment in murine models of pancreatic adenocarcinoma, *PLoS One*, **14**(2), e0211117.
30. Bracke, A., Van Elzen, R., Van Der Veken, P., Augustyns, K., De Meester, I., Lambeir, A.-M. (2019). The development and validation of a combined kinetic fluorometric activity assay for fibroblast activation protein alpha and prolyl oligopeptidase in plasma, *Clinica Chimica Acta*, **495**, 154–160.
31. Wallborg, E.F., Tsuchida, S., Weeden, D.S., Thomas, M.W., Barrick, A., McEntire, K.D., Allison, J.P., Hixson, D.C. (1985). Identification of dipeptidyl peptidase IV as a protein shared by the plasma membrane of hepatocytes and liver biomatrix, *Experimental Cell Research*, **158**(2), 509–518.
32. Püschel, G., Mentlein, R., Heymann, E. (1982). Isolation and Characterization of Dipeptidyl Peptidase IV from Human Placenta, *European Journal of Biochemistry*, **126**(2), 359–365.
33. Mortier, A., Gouwy, M., Van Damme, J., Proost, P., Struyf, S. (2016). CD26/dipeptidylpeptidase IV—chemokine interactions: Double-edged regulation of inflammation and tumor biology, *Journal of Leukocyte Biology*, **99**(6), 955–969.
34. McKillop, A.M., Stevenson, C.L., Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R. (2018). Tissue expression of DPP-IV in obesity-diabetes and modulatory effects on peptide regulation of insulin secretion, *Peptides*, **100**, 165–172.
35. Lambeir, A.-M., Durinx, C., Scharpé, S., De Meester, I. (2003). Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside: An Update on Structural Properties, Functions, and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **40**(3), 209–294.
36. García-Horsman, J.A., Männistö, P.T., Venäläinen, J.I. (2007). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease, *Neuropeptides*, **41**(1), 1–24.

37. Männistö, P.T., García-Horsman, J.A. (2017). Mechanism of Action of Prolyl Oligopeptidase (PREP) in Degenerative Brain Diseases: Has Peptidase Activity Only a Modulatory Role on the Interactions of PREP with Proteins? *Frontiers in Aging Neuroscience*, **9**, 27.
38. Jambunathan, K., Watson, D.S., Endsley, A.N., Kodukula, K., Galande, A.K. (2012). Comparative analysis of the substrate preferences of two post-proline cleaving endopeptidases, prolyl oligopeptidase and fibroblast activation protein α , *FEBS Letters*, **586**(16), 2507–2512.
39. O’Leary, R.M., Gallagher, S.P., O’Connor, B. (1996). Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain, *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, **28**(4), 441–449.
40. Larrinaga, G., Perez, I., Blanco, L., López, JI., Andrés, L., Etxezarraga, C., Santaolalla, F., Zabala, A., Varona, A., Irazusta, J. (2010). Increased prolyl endopeptidase activity in human neoplasia, *Regulatory Peptides*, **163**(1), 102–106.
41. Tenorio-Laranga, J., Coret-Ferrer, F., Casanova-Estruch, B., Burgal, M., García-Horsman, J.A. (2010). Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Journal of Neuroinflammation*, **7**(1), 23.
42. Gaggar, A., Jackson, P.L., Noerager, B.D., O’Reilly, P.J., McQuaid, D.B., Rowe, S.M., Clancy, J.P., Blalock, J.E. (2008). A Novel Proteolytic Cascade Generates an Extracellular Matrix-Derived Chemoattractant in Chronic Neutrophilic Inflammation¹², *The Journal of Immunology*, **180**(8), 5662–5669.
43. Maes, M., Monteleone, P., Bencivenga, R., Goossens, F., Maj, M., van West, D., Bosmans, E., Scharpe, S. (2001). Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa, *Psychoneuroendocrinology*, **26**(1), 17–26.
44. Pederson, R.A., White, H.A., Schlenzig, D., Pauly, R.P., McIntosh, C.H., Demuth, H.U. (1998). Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide, *Diabetes*, **47**(8), 1253–1258.
45. Wilk, S., Orlowski, M. (1983). Inhibition of Rabbit Brain Prolyl Endopeptidase by N-Benzyloxycarbonyl-Prolyl-Prolinal, a Transition State Aldehyde Inhibitor, *Journal of Neurochemistry*, **41**(1), 69–75.
46. Keane, F.M., Yao, T.-W., Seelk, S., Gall, M.G., Chowdhury, S., Poplawski, S.E., Lai, J.H., Li, Y., Wu, W., Farrell, P., Vieira de Ribeiro, A.J., Osborne, B., Yu, D. M. T., Seth, D., Rahman, K., Haber, P., Topaloglu, A.K., Wang, C., Thomson, S., Hennessy, A., Prins, J., Twigg, S.M., McLennan, S.V., McCaughan, G.W., Bachovchin, W.W., Gorrell, M.D. (2014). Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs, *FEBS Open Bio*, **4**(1), 43–54.
47. De Decker, A., Vliegen, G., Van Rompaey, D., Peeraer, A., Bracke, A., Verckist, L., Jansen, K., Geiss-Friedlander, R., Augustyns, K., De Winter, H., De Meester, I., Lambeir, A.-M., Van der Veken, P. (2019). Novel Small Molecule-Derived, Highly Selective Substrates for Fibroblast Activation Protein (FAP), *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **10**(8), 1173–1179.
48. Fan, C.-Y., Gao, X., Wang, H., Xiong, Y., Zou, X., Liu, S.-Y. (2023). Rapid tumor detection via a fibroblast activation protein- α activated fluorogenic probe, *Dyes and Pigments*, **219**, 111606.
49. Wu, C., Mao, Y., Zhang, F., Wang, X., Fan, N., Zhang, W., Zhang, W., Li, P., Tang, B. (2023). Uncovering the mechanism of cancer-associated fibroblasts induced immune evasion of hepatocellular carcinoma cells via in situ fluorescence imaging, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **389**, 133891.
50. Liu, S.-Y., Wang, H., Nie, G. (2022). Ultrasensitive Fibroblast Activation Protein- α -Activated Fluorogenic Probe Enables Selective Imaging and Killing of Melanoma In Vivo. *ACS Sensors*, **7**(7), 1837–1846.

51. Gao, G., Sun, X., Liu, X., Tang, R., Wang, M., Zhan, W., Zheng, J., Liang, G. (2022). FAP- α -Instructed Coumarin Excimer Formation for High Contrast Fluorescence Imaging of Tumor, *Nano Letters*, **22**(16), 6782–6786.
52. Bainbridge, T.W., Dunshee, D.R., Kljavin, N.M., Skelton, N.J., Sonoda, J., Ernst, J.A. (2017). Selective Homogeneous Assay for Circulating Endopeptidase Fibroblast Activation Protein (FAP), *Scientific Reports*, **7**(1), Article 1.
53. Frerker, N., Wagner, L., Wolf, R., Heiser, U., Hoffmann, T., Rahfeld, J.-U., Schade, J., Karl, T., Naim, H.Y., Alfalah, M., Demuth, H.-U., von Hörsten, S. (2007). Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: Structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4, *Peptides*, **28**(2), 257–268.
54. Bauvois, B. (1988). A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV, *The Biochemical Journal*, **252**(3), 723–731.
55. Li, J., Chen, K., Liu, H., Cheng, K., Yang, M., Zhang, J., Cheng, J. D., Zhang, Y., Cheng, Z. (2012). Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe for In Vivo Imaging of Fibroblast Activation Protein- α , *Bioconjugate Chemistry*, **23**(8), 1704–1711.
56. Miao, Q., Yeo, D. C., Wiraja, C., Zhang, J., Ning, X., Xu, C., Pu, K. (2018). Near-Infrared Fluorescent Molecular Probe for Sensitive Imaging of Keloid, *Angewandte Chemie International Edition*, **57**(5), 1256–1260.
57. Zhao, X.-X., Li, L.-L., Zhao, Y., An, H.-W., Cai, Q., Lang, J.-Y., Han, X.-X., Peng, B., Fei, Y., Liu, H., Qin, H., Nie, G., Wang, H. (2019). In Situ Self-Assembled Nanofibers Precisely Target Cancer-Associated Fibroblasts for Improved Tumor Imaging, *Angewandte Chemie*, **131**(43), 15431–15438.
58. Xing, J., Gong, Q., Zou, R., Li, Z., Xia, Y., Yu, Z., Ye, Y., Xiang, L., Wu, A. (2018). A novel fibroblast activation protein-targeted near-infrared fluorescent off–on probe for cancer cell detection, in vitro and in vivo imaging, *Journal of Materials Chemistry B*, **6**(10), 1449–1451.
59. Zhang, L., Ying, W., Sheng, Z., Lv, L., Gao, J., Xue, Y., Liu, L. (2022). Bioluminescence imaging of fibroblast activation protein- α in vivo and human plasma with highly sensitive probe, *Analytical Biochemistry*, **655**, 114859.
60. Fu, A., Wang, H., Huo, T., Li, X., Fu, W., Huang, R., Cao, Z. (2021). A Novel Chemiluminescence Probe for Sensitive Detection of Fibroblast Activation Protein- α In Vitro and in Living Systems, *Analytical Chemistry*, **93**(16), 6501–6507.
61. Feng, F., Chen, X., Li, G., Liang, S., Hong, Z., Wang, H.-F. (2018). Afterglow Resonance Energy Transfer Inhibition for Fibroblast Activation Protein- α Assay, *ACS Sensors*, **3**(9), 1846–1854.
62. Cunningham, C.C. (2007). Talabostat, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **16**(9), 1459–1465.
63. Scanlan, M.J., Raj, B.K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M.P., Healey, J.H., Old, L.J., Rettig, W.J. (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(12), 5657–5661.
64. Jung, H.J., Nam, E.H., Park, J.Y., Ghosh, P., Kim, I.S. (2021). Identification of BR102910 as a selective fibroblast activation protein (FAP) inhibitor, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **37**, 127846.
65. Edosada, C.Y., Quan, C., Wiesmann, C., Tran, T., Sutherlin, D., Reynolds, M., Elliott, J. M., Raab, H., Fairbrother, W., Wolf, B.B. (2006). Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity, *Journal of Biological Chemistry*, **281**(11), 7437–7444.
66. Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Yadav, V.R., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Awasthi, V., Zhang, R.R., McKee, P.A. (2015). Suppression of Tumor Growth in Mice by Rationally

- Designed Pseudopeptide Inhibitors of Fibroblast Activation Protein and Prolyl Oligopeptidase, *Neoplasia*, **17**(1), 43–54.
67. Jansen, K., Winter, H.D., Heirbaut, L., Cheng, J.D., Joossens, J., Lambeir, A.-M., Meester, I.D., Augustyns, K., Veken, P.V. der. (2014). Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a xanthine scaffold, *MedChemComm*, **5**(11), 1700–1707.
68. Šimková, A., Ormsby, T., Sidej, N., Slavětínská, L.P., Brynda, J., Beranová, J., Šácha, P., Majer, P., Konvalinka, J. (2021). Structure-activity relationship and biochemical evaluation of novel fibroblast activation protein and prolyl endopeptidase inhibitors with α -ketoamide warheads, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **224**, 113717.
69. Poplawski, S.E., Lai, J.H., Li, Y., Jin, Z., Liu, Y., Wu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Sudmeier, J.L., Sanford, D.G., Bachovchin, W.W. (2013). Identification of Selective and Potent Inhibitors of Fibroblast Activation Protein and Prolyl Oligopeptidase, *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**(9), 3467–3477.
70. Lee, K.N., Jackson, K.W., Terzyan, S., Christiansen, V.J., McKee, P.A. (2009). Using Substrate Specificity of Antiplasmin-Cleaving Enzyme for Fibroblast Activation Protein Inhibitor Design, *Biochemistry*, **48**(23), 5149–5158.
71. Lankas, G.R., Leiting, B., Roy, R.S., Eiermann, G.J., Beconi, M.G., Biftu, T., Chan, C.-C., Edmondson, S., Feeney, W.P., He, H., Ippolito, D.E., Kim, D., Lyons, K.A., Ok, H.O., Patel, R.A., Petrov, A.N., Pryor, K.A., Qian, X., Reigle, L., Woods, A., Wu, J.K., Zaller, D., Zhang, X., Zhu, L., Weber, A.E., Thornberry, N.A. (2005). Dipeptidyl Peptidase IV Inhibition for the Treatment of Type 2 Diabetes: Potential Importance of Selectivity Over Dipeptidyl Peptidases 8 and 9, *Diabetes*, **54**(10), 2988–2994.
72. Connolly, B.A., Sanford, D.G., Chiluwal, A.K., Healey, S.E., Peters, D.E., Dimare, M.T., Wu, W., Liu, Y., Maw, H., Zhou, Y., Li, Y., Jin, Z., Sudmeier, J.L., Lai, J.H., Bachovchin, W.W. (2008). Dipeptide Boronic Acid Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase IV: Determinants of Potency and in Vivo Efficacy and Safety, *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**(19), 6005–6013.
73. Jansen, K., Heirbaut, L., Verkerk, R., Cheng, J.D., Joossens, J., Cos, P., Maes, L., Lambeir, A.-M., De Meester, I., Augustyns, K., Van der Veken, P. (2014). Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP), *Journal of Medicinal Chemistry*, **57**(7), 3053–3074.
74. Christiansen, V.J., Jackson, K.W., Lee, K.N., Downs, T.D., McKee, P.A. (2013). Targeting Inhibition of Fibroblast Activation Protein- α and Prolyl Oligopeptidase Activities on Cells Common to Metastatic Tumor Microenvironments, *Neoplasia*, **15**(4), 348–358.
75. Tsai, T.-Y., Yeh, T.-K., Chen, X., Hsu, T., Jao, Y.-C., Huang, C.-H., Song, J.-S., Huang, Y.-C., Chien, C.-H., Chiu, J.-H., Yen, S.-C., Tang, H.-K., Chao, Y.-S., Jiaang, W.-T. (2010). Substituted 4-Carboxymethylpyroglutamic Acid Diamides as Potent and Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein, *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**(18), 6572–6583.
76. Jansen, K., Heirbaut, L., Cheng, J. D., Joossens, J., Ryabtsova, O., Cos, P., Maes, L., Lambeir, A.-M., De Meester, I., Augustyns, K., Van der Veken, P. (2013). Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **4**(5), 491–496.
77. Van Rymenant, Y., Tanc, M., Van Elzen, R., Bracke, A., De Wever, O., Augustyns, K., Lambeir, A.-M., Kockx, M., De Meester, I., Van Der Veken, P. (2021). In Vitro and In Situ Activity-Based Labeling of Fibroblast Activation Protein with UAMC1110-Derived Probes, *Frontiers in Chemistry*, **9**, 640566.
78. Zboralski, D., Hoehne, A., Bredenbeck, A., Schumann, A., Nguyen, M., Schneider, E., Ungewiss, J., Paschke, M., Haase, C., von Hacht, J. L., Kwan, T., Lin, K. K., Lenore, J., Harding, T.C., Xiao, J., Simmons, A.D., Mohan, A.-M., Beindorff, N., Reineke, U., Smerling, C., Osterkamp, F. (2022). Preclinical evaluation of FAP-2286 for fibroblast activation protein

- targeted radionuclide imaging and therapy, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **49**(11), 3651–3667.
79. Kratochwil, C., Flechsig, P., Lindner, T., Abderrahim, L., Altmann, A., Mier, W., Adeberg, S., Rathke, H., Röhrich, M., Winter, H., Plinkert, P. K., Marme, F., Lang, M., Kauczor, H.-U., Jäger, D., Debus, J., Haberkorn, U., Giesel, F.L. (2019). ⁶⁸Ga-FAPI PET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer, *Journal of Nuclear Medicine*, **60**(6), 801–805.
80. Woganu, B., Berger, B.W. (2016). A specific, transmembrane interface regulates fibroblast activation protein (FAP) homodimerization, trafficking and exopeptidase activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **1858**(8), 1876–1882.