

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-АМИНО-4-АЦИЛАМИНО-1H-ПИРАЗОЛА В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ФУРИНА

В. К. КИБИРЕВ¹, Т. В. ОСАДЧУК¹, О. Б. ВАДЗЮК²,
О. В. ШАБЛЫКИН¹, А. П. КОЗАЧЕНКО¹, С. А. ЧУМАЧЕНКО¹,
С. В. ПОПИЛЬНИЧЕНКО¹, В. С. БРОВАРЕЦ¹

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

Синтезирован ряд производных 5-амино-1H-пиразола с целью исследования в качестве ингибиторов фурина. Найдено, что наиболее эффективное соединение — 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1H-пиразол — снижает активность фурина по механизму смешанного ингибирования с K_i 288 мкМ. Результаты проведенной работы позволяют наметить пути химической модификации структуры производных 5-амино-1H-пиразолов для создания более мощных ингибиторов фурина непептидной природы.

Ключевые слова: фурин, ингибиторы фурина, производные 5-амино-1H-пиразола.

Фурин животных (ЕС 3.4.21.75) является кальцийзависимой сериновой эндопротеазой, принадлежащей к семейству пропротеинконвертаз (ПК), которые осуществляют специфическое расщепление первоначально синтезируемых неактивных предшественников протеинов, превращая их в «зрелые» активные продукты. Фурин, как и другие ПК вовлекается в процессинг широкого круга протеинов-предшественников: гормонов и нейропептидов, факторов роста и дифференциации, рецепторных протеинов плазматической мембраны, факторов свертывания крови и адгезивных молекул [1–4]. В связи с этим фурин играет важную роль в эмбриогенезе, гомеостазе и других биологических процессах. Кроме того, он способен активировать патологические агенты различных бактерий, например, токсины дифтерии, сибирской язвы, дизентерии, коклюша и возбудителей других заболеваний. Расщепление фурином гликопротеинов вирусов необходимо для распространения таких инфекций, как ВИЧ-1, лихорадка Эбола, птичий грипп H5N1, корь и т.д. [1–4]. Энзим участвует также в развитии таких заболеваний, как рак, болезнь Альцгеймера и ряд патологий обмена веществ. В связи с той ролью, которую фурин играет в патофизиологии человека, энзим рассматривают как важную фармакологическую мишень для синтеза соответствующих эффективных и специфических ингибиторов — препаратов, потенциально об-

ладающих ценными клиническими и терапевтическими характеристиками [1–4].

При дизайне ингибиторов фурина обычно исходят из того факта, что протеолиз субстратов, ускоряемый энзимом, протекает по С-концу пары остатков основных аминокислот -Arg-Arg- или -Lys-Arg- (ниже отмечено стрелкой), которые локализируются на участке полипептидной цепи, содержащей кластер аминокислот с положительно заряженными боковыми радикалами: -(Lys/Arg)-(X)_n-(Lys/Arg)-↓, где n = 0, 2, 4 или 6, а X — любая обычная аминокислота, кроме Cys [5]. К настоящему времени опубликовано несколько обзоров [4–6], посвященных созданию протеиновых и пептидных ингибиторов фурина; синтезу псевдопептидов, содержащих на С-конце пару остатков основных аминокислот и соединений непептидной природы, а также изучению их способности подавлять патологические процессы, указанные выше. Для пропротеинконвертаз идентифицировано всего несколько эндогенных протеиновых ингибиторов и созданы ингибиторы, которые представляют собой биоинженерные варианты различных серпинов [1–6].

Необратимыми синтетическими ингибиторами фурина являются пептидил-хлорметилкетоны. Например, Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CO-CH₂-Cl, будучи весьма активным, но неспецифическим ингибитором фурина, блокирует расщепление энзимом ВИЧ gp160. Соз-

даны также обратимые ингибиторы пептидной и псевдопептидной природы и пептиды, на С-конце которых присутствуют непротеиногенные аминокислоты. Например, в работе [6] сообщается о фенилацетил-аргинил-валил-аргинил-4-амидинобензиламиде, который содержит в P_1 декарбокситированный миметик аргинина. Это соединение ингибирует фурин с K_i 0,81 нМ и является, по-видимому, наиболее мощным синтетическим ингибитором данного энзима [6]. Обратимыми ингибиторами фурина являются полиаргинины, среди которых наиболее эффективным оказался нона-D-аргининамид (K_i 1,3 нМ), защищающий клетки RAW 264.7 от сибирской язвы [7].

Для фурина известны также непептидные ингибиторы: незаряженный андрографолид, выделенный из растения *Andrographis paniculata*, и его О-гликозилированные или О-сукциноилированные производные [8]; ряд гетероциклических соединений — производных пиридина, способных создавать комплексы с ионами меди или цинка [9], а также производные 2,5-дидезоксистрептамина, содержащие в своей структуре от двух до шести гуанидиновых групп [10]. Недавно было обнаружено, что производные дикумарола и ряда гетероциклических соединений, относящихся к разным классам органических соединений, ингибируют фурин конкурентно или неконкурентно с K_i в пределах 1–185 мкМ [11]. Ингибиторами фурина являются некоторые флавоноиды, которые, хотя и не содержат в своей молекуле групп с положительным зарядом, но, тем не менее, ингибируют энзим конкурентно [12, 13]. По последним данным ряд амидиногидразонов также ингибирует фурин (K_i 0,46–376 мкМ) [14].

В активном центре фурина содержится 16 отрицательно заряженных остатков аминокислот, т.е. наибольшее число их по сравнению с другими пропротеинконвертазами [15]. Расчетные методы и компьютерное моделирование показало, что различия в строении участков полипептидной цепи ПК за пределами связывающего участка активного центра более значительны, чем в районе активного центра [16]. Поэтому можно предположить, что низкомолекулярные соединения, которые способны взаимодействовать с фурином за пределами его активного центра, окажутся более специфичными, чем пептиды, взаимодействующие лишь с зоной активного центра энзима.

Ранее нами было обнаружено, что некоторые азолы в условиях эксперимента могут подавлять активность фурина [17, 18]. Было бы

весьма интересно расширить круг изучаемых гетероциклов и исследовать новые производные в качестве ингибиторов фурина.

Целью настоящей работы является синтез и исследование антифуриновой активности ряда производных 5-амино-4-ациламино-1H-пиразола.

Материалы и методы

В работе использовали фурин (2000 ед/мл, New England BioLabs, Англия) и флуорогенный субстрат Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (Bachem, США). За одну единицу активности фурина принимали такое количество энзима, которое в указанных условиях отщепляет 1 пкМ AMC от флуорогенного субстрата за 1 мин. Коммерческими препаратами являются также ЭДТА (Serva, Германия), β-меркаптоэтанол, Нерес и Brij 35 (Sigma, США), Тритон X-100 (Fluka, Швейцария). Остальные реагенты — отечественного производства квалификации хч или чда.

Синтез производных 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов. Все исследуемые соединения были получены из соответствующих 2-ациламино-3,3-дихлоракрилонитрилов методами, представленными на схеме 1.

Определение активности фурина. Аликвоту фурина, соответствующую отщеплению от субстрата ~ 300 пкМ/час 7-амино-4-метилкумарина (AMC), инкубировали с Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC, (конечная концентрация 75–250 мкМ) в буфере рН 7,2 (100 мМ Нерес, 1 мМ CaCl₂, 0,5% Тритон X-100 и 1 мМ β-меркаптоэтанол) в течение 1 часа при 37 °С в пробе объемом 150 мкл.

Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл ЭДТА (исходной концентрации 5 мМ). Относительную флуоресценцию измеряли в условных единицах флуоресценции на спектрофлуориметре Signe-4M (производство Латвии) при длине волны возбуждения 380 нм и испускания 460 нм.

Способность исследуемых соединений ингибировать фурин определяли в том же буфере рН 7,2. Для этого аликвоту энзима выдерживали с 5–10 мкл изучаемого соединения в ДМСО (исходной концентрации 300–600 мкМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли субстрат до конечной концентрации 100 или 200 мкМ (общий объем смеси 150 мкл) и энзиматическую реакцию проводили в течение 1 часа при температуре 37 °С. Расщепление флуорогенного субстрата останавливали добавлением раствора ЭДТА, и количество выделившегося AMC

определяли, как указано выше, вычитая при этом величины собственной флуоресценции исследуемых соединений.

Значения $[I]_{50}$ определяли с использованием линейного графика зависимости величины ингибирования от концентрации исследуемого вещества (рис. 1). При этом применяли достаточно высокие концентрации исследуемых соединений для того, чтобы ингибиторный эффект гетероциклов находился в пределах ~20–80%. Активность энзима, найденная в среде инкубации в отсутствие указанных соединений, принимали за 100%. Эффективность ингибирования вычисляли по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = [(F_0 - F)/F_0] \times 100,$$

где F_0 – относительная флуоресценция реакционной смеси в отсутствие исследуемого вещества; F – флуоресценция в присутствии исследуемого вещества. Найдено, что $[I]_{50}$ для аминопиразола **5** составляет, например, 670 мкМ, а для соединения **6** – 325 мкМ.

Обработку результатов измерений и построение графиков осуществляли с помощью программ Origin 5.0 Professional и 8.0 (OriginLab). Ошибка эксперимента не превышала 10% измеряемой величины.

Результаты и обсуждение

Синтез и исследование свойств низкомолекулярных ингибиторов фурина может дать ценную информацию не только для выяснения важных теоретических вопросов, связанных с

функциями этого энзима, но и для решения практических задач по созданию новых лекарственных препаратов на основе синтетических ингибиторов фурина [4, 5].

Синтез исследуемых пиразолов проводили по схеме 1.

По предварительным данным они являются малотоксичными. Например, LD_{50} для пиразола **5** составляет на мышах 898 ± 71 мг/кг.

В таблице представлены данные скрининга изученных гетероциклов в качестве ингибиторов фурина. Согласно полученным данным, среди 5-аминопиразолов наиболее эффективными ингибиторами являются соединения **3**, **6**, **8** и **13**, которые в условиях эксперимента ингибируют фурин на 73–98%.

Сравнение структуры гетероциклов **6** и **8** позволяет сделать вывод о том, что замена ацетиламинного фрагмента, находящегося в 4-ом положении пиразола, на более объемную бензоиламиногруппу обуславливает снижение ингибиторной активности фурина на 25%. Та же тенденция реализуется в ряду соединений **13**–**15**. Уменьшение данного эффекта наблюдается также в том случае, если в заместителе, находящемся в 3-ем положении пиразола, вместо NH-группы (соединение **6**), способной давать водородную связь, ввести сульфидную группу (пиразолы **1** и **2**), которая, возможно, не образует соответствующей водородной связи.

Сопоставляя значения активности соединений **3**, **7**, **8** легко сделать вывод о том, что введение более липофильных заместителей

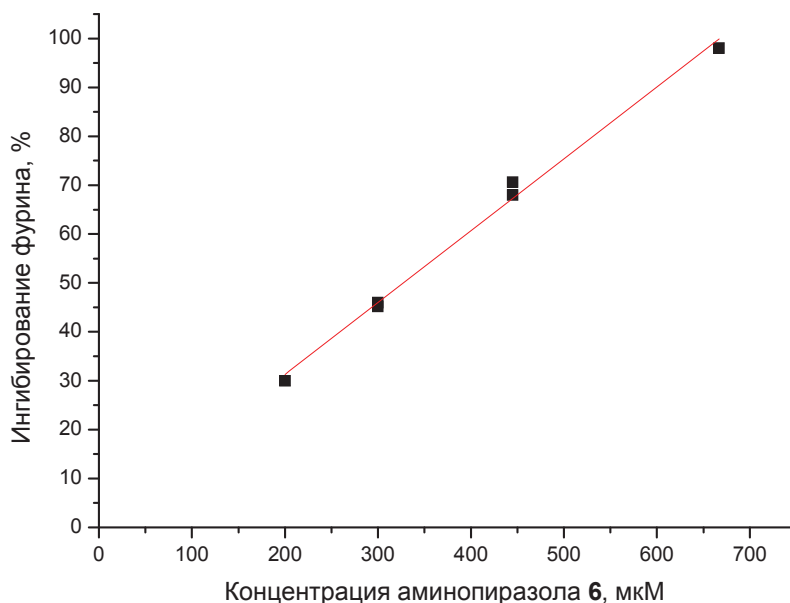
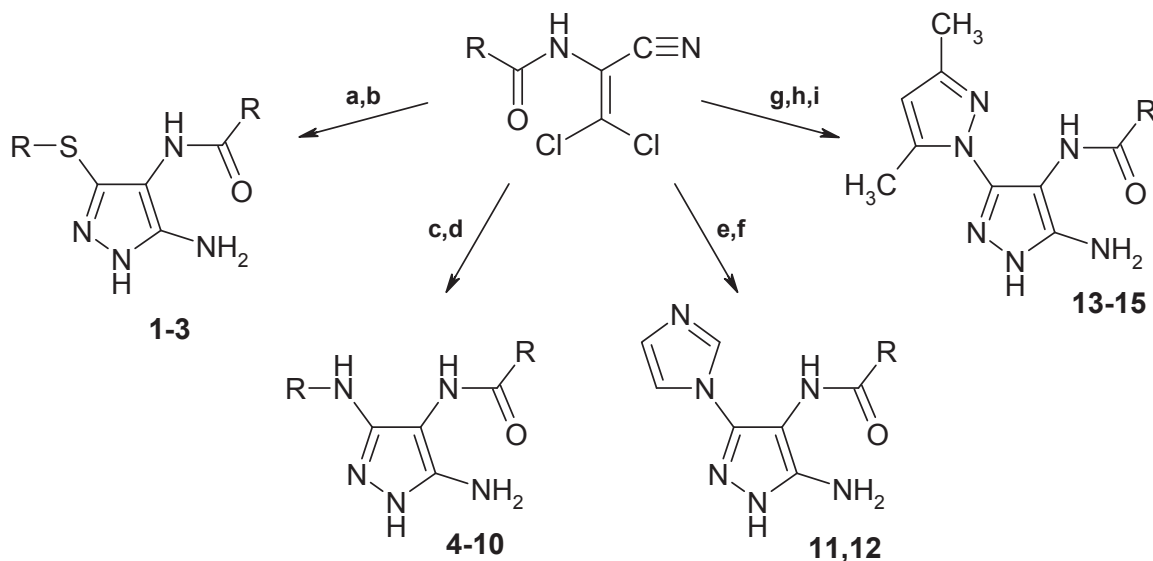


Рис. 1. График для определения $[I]_{50}$ 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1H-пиразола **6**



Условия: **1–3 a)** RSH, Et₃N, MeCN, 20–25 °С, 6 ч; **b)** N₂H₄·H₂O, EtOH, 80 °С, 2 ч [19]; **4–10 c)** RNH₂, ДМФА, 20–25 °С, 100 ч; **d)** N₂H₄·H₂O, (CH₂)₂(OH)₂, 160 °С, 3 ч [20]; **11,12 e)** имидазол, THF, 70 °С, 8 ч; **f)** N₂H₄·H₂O, THF, 70 °С, 6 ч [21]; **13–15 g)** N₂H₄·H₂O, EtOH, 20–25 °С, 6 ч; **h)** (CH₃CO)₂CH₂, EtOH, 80 °С, 2 ч; **i)** N₂H₄·H₂O, EtOH, 80 °С, 5 ч [22]

Схема 1. Синтез производных 5-амино-1H-пиразола

(атом хлора или метильная группа) в бензольное кольцо ариламиного фрагмента в 3-ем положении пиразола, обуславливает повышение ингибиторной активности. В противоположность этому наличие метильного заместителя в ароматическом ядре 4-бензоиламиногруппы аминопиразола ведет к снижению ингибиторной активности (соединения **7** и **9**).

Построением графиков Лайнуивера-Берка для пиразола **6**, т.е. для самого активного производного исследуемого ряда гетероциклов, определяли механизм его действия на фурин. Исходя из данных рис. 2, можно заключить, что оно ингибирует фермент по механизму смешанного ингибирования [23, 24] (схема 2). Физический смысл символов, представленных на

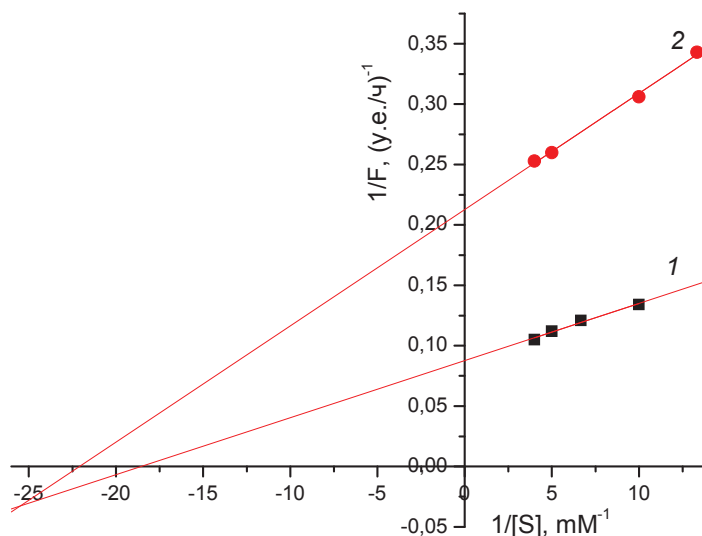


Рис. 2. График Лайнуивера-Берка смешанного ингибирования фурина 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1H-пиразолом **6** при pH 7,2 и температуре 37 °С: 1 – без ингибитора, 2 – с добавлением соединения **6** (300 мкМ)

Скрининг производных 5-амино-4-ациламино-1H-пиразолов в качестве ингибиторов фурина

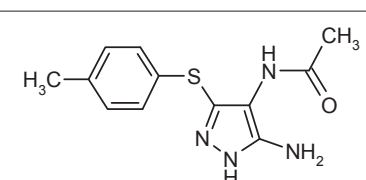
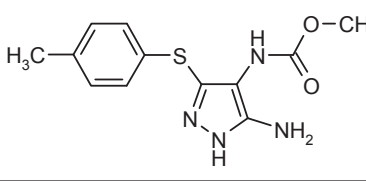
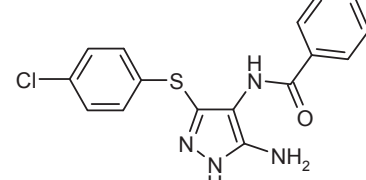
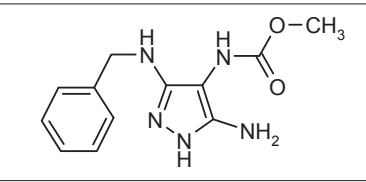
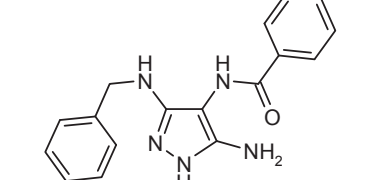
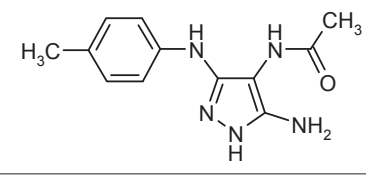
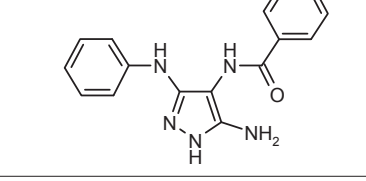
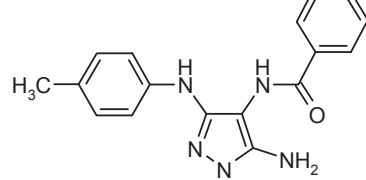
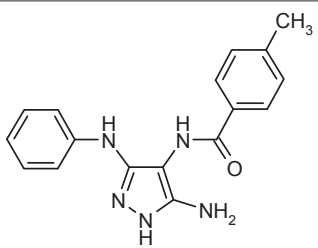
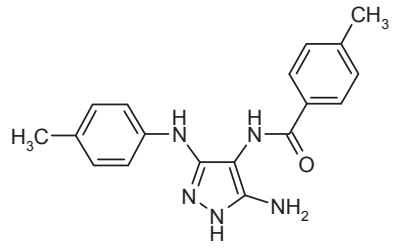
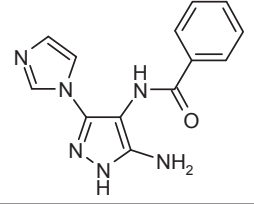
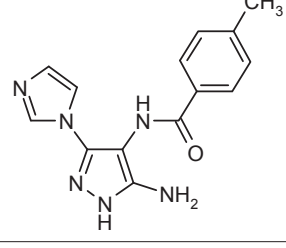
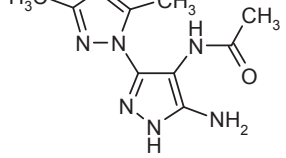
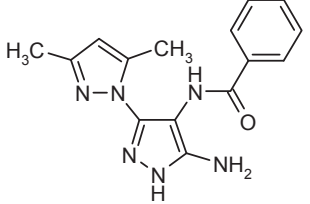
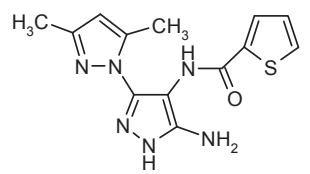
№ соединения	Формула соединения	Ингибиторный эффект, %
1		60
2		61
3		81
4		51
5		51
6		98
7		61
8		73

Таблица. Продолжение

9		54
10		58
11		69
12		64
13		79
14		63
15		45

Использовали следующие условия проведения реакции: содержание фурина в пробе 5 ед.; время предварительной инкубации фурина с исследуемыми соединениями (при концентрации 670 мкМ) 30 мин при комнатной температуре; после добавления флуорогенного субстрата Вос-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (конечная концентрация 100 мкМ) объем пробы равнялся 150 мкл; энзиматическая реакция длилась 1 ч при pH 7,2 и 37 °C

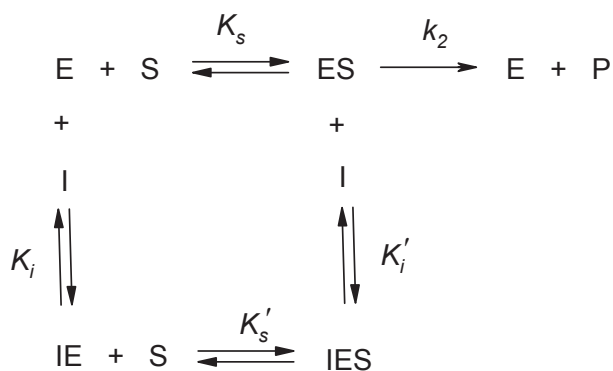


Схема 2. Влияние обратимых ингибиторов на двухстадийную ферментатическую реакцию

схеме 2, раскрыт в монографии Т. Келети [24]. В ней дан также способ расчета констант ингибирования по координатам точек пересечения графиков Лайнуивера-Берка с абсциссой и ординатой, а также по тангенсам угла наклона соответствующих прямых, что дало следующие кинетические параметры: K_i 288 мкМ и K_i' 210 мкМ.

Ранее нами было найдено, что в условиях эксперимента фурин ускоряет расщепление флуорогенного субстрата со значением K_m 54 мкМ. Таким образом, взаимодействие аминокпазола **6** с ферментом прототирует следующее присоединение к нему субстрата и наоборот. Изменение величины V_{max} (рис. 2) в присутствии соединения **6** обусловлено, по видимому, тем, что тройной комплекс фермент-субстрат-ингибитор способен частично распадаться на продукты реакции.

Хотя исследованные аминокпазолы проявляют низкую активность по сравнению с другими гетероциклами (например, с производными кумарина [11]), данные проведенной работы позволяют наметить пути химической модификации структуры 5-амино-1H-пипазолов для создания более мощных ингибиторов фурина. С этой целью необходимо синтезировать производные 5-аминопипазола с ациламино-группой небольшого объема в 4-ом положении гетероцикла; а заместитель в 3-ем положении должен содержать липофильные группировки.

Авторы глубоко признательны профессору И. В. Смирновой за постоянный интерес к работе и за помощь в приобретении фурина и других препаратов. Выражаем также благодарность проф. Запорожского национального университета Л. А. Омелянчик за определение токсичности ряда исследуемых нами соединений.

ВИВЧЕННЯ ПОХІДНИХ 5-АМІНО-4-АЦИЛАМІНО-1H-ПІРАЗОЛУ ЯК ІНГІБІТОРІВ ФУРИНУ

В. К. Кібіреві¹, Т. В. Осадчук¹,
О. Б. Вадзюк², О. В. Шаблікін¹,
О. П. Козаченко¹, С. А. Чумаченко¹,
С. В. Попільніченко¹, В. С. Броварець¹

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

Синтезована низка похідних 5-аміно-1H-пипазолу з метою вивчення їх як інгібіторів фурина. Знайдено, що найефективніша сполука — 5-аміно-4-ацетиламіно-3-(4-метилфеніламіно)-1H-пипазол — знижує активність фурина за механізмом змішаного інгібування з K_i 288 мкМ. Результати проведенної роботи дозволяють намітити шляхи хімічної модифікації структури похідних 5-аміно-1H-пипазолів для створення більш потужних інгібіторів фурина непептидної природи.

Ключові слова: фурин, інгібітори фурина, похідні 5-аміно-1H-пипазола.

STUDY ON DERIVATIVES OF 5-AMINO-4-ACYLAMINO-1H-PYRAZOLE AS INHIBITORS OF FURIN

V. K. Kibirev¹, T. V. Osadchuk¹,
O. B. Vadzyuk², O. V. Shablykin¹,
O. P. Kozachenko¹, S. A. Chumachenko¹,
S. V. Popilnichenko¹, V. S. Brovarets¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Summary

A series of 5-amino-1H-pyrazoles was synthesized and studied as inhibitors of furin. The most potent compound, 5-amino-4-acetyl-amino-3-(4-methylphenylamino)-1H-pyrazole, was found to retard the activity of furin by mixed-type inhibition with $K_i = 288 \mu\text{M}$. These findings permit to plan new ways for chemical modifications of the 5-amino-1H-pyrazole structure and design more potent furin inhibitors of non-peptide nature.

Key words: furin, inhibitors of furin, derivatives of 5-amino-1H-pyrazole.

1. Nakayama K. // *Biochem J.* – 1997. – **327**, N 3. – P. 625–635.
2. Thomas G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2002. – **3**, N 10. – P. 753–766.
3. Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Радавский Ю. Л. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 5–18.
4. Fugère M., Day R. // *TRENDS Pharmacol. Sci.* – 2005. – **26**, N 6. – P. 294–301.
5. Basak A. // *J. Mol. Med.* – 2005. – **83**, N 11. – P. 844–855.
6. Becker G. L., Sielaff F., Than M. E. et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – **53**, № 3. – P. 1067–1075.
7. Kacprzak M. M., Peinado J. R., Than M. E. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 35. – P. 36788–36794.
8. Basak A., Cooper S., Roberge A.G. et al. // *Biochem. J.* – 1999. – **338**, N 1. – P. 107–113.
9. Podsiadlo P., Komiyama T., Fuller R. S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 35. – P. 36219–36227.
10. Jiao G-S., Cregar L., Wang J. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2006. – **103**, N 52. – P. 19707–19712.
11. Komiyama T., Coppola J. M., Larsen M. J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 23. – P. 15729–15738.
12. Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Вадзюк О. Б. и др. // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 2. – С. 15–21.
13. Majumdar S., Mohanta B. C., Chowdhury D. R. et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – **17**, N 19. – P. 2049–2058.
14. Sielaff F., Than M. E., Bevec D. et al. // *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* – (2010), doi: 10.1016/j.bmcl. 2010.11.092.
15. Henrich S., Lindberg I., Bode W. et al. // *J. Mol. Biol.* – 2005. – **345**, N 2. – P. 211–227.
16. Cai X., Zhang Q., Ding D. // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2004. – **25**, N 12. – P. 1712–1718.
17. Кондратюк К. М., Головченко А. В., Осадчук Т. В. и др. // *ЖОХ.* – 2011. – (в печати).
18. Чумаченко С. А., Шаблыкин О. В., Козаченко А. П. и др. // *ХГС.* – 2011. – (в печати).
19. Попильниченко С. В., Пильо С. Г., Броварец В. С. и др. // *ЖОХ.* – 2005. – **75**, № 11. – С. 1902–1906.
20. Козаченко А. П., Шаблыкин О. В., Василенко А. Н. и др. // Там же. – 2010. – **80**, № 1. – С. 133–138.
21. Козаченко А. П., Шаблыкин О. В., Русанов Э. Б. и др. // Там же. – 2009. – **79**, № 5. – С. 824–828.
22. Шаблыкин О. В., Броварец В. С., Русанов Э. Б. и др. // Там же. – 2008. – **78**, № 4. – С. 674–679.
23. Березин И. В., Мартинек К. // *Мол. биология.* – 1971. – **5**, № 3. – С. 347–350.
24. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики.* – М.: Мир, 1990. – 348 с.

Получено 17.02.2011