

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.151.042:577.152.34

НЕПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФУРИНА НА ОСНОВЕ АМИДИНОГИДРАЗОНОВ ДИАРИЛАЛЬДЕГИДОВ

В. К. КИБИРЕВ¹, Т. В. ОСАДЧУК², А. П. КОЗАЧЕНКО²,
О. Б. ВАДЗЮК¹, В. С. БРОВАРЕЦ²

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев

При взаимодействии диальдегидов (производных эфиров этилендиэтилванилина) с бикарбонатом аминоксидина синтезированы соответствующие диамидиногидразоны, содержащие два ароматических кольца, соединенных 1,2-этиленовым, 1,4-бутиленовым или 1,4-диметиленбензолным «мостиком». Показано, что эти соединения являются ингибиторами фурина. Найдено, что их антифуриновая активность возрастает с увеличением длины (или гидрофобности) соединительного мостика. Значение K_i наиболее активного соединения, содержащего в мостике липофильное бензолное кольцо, равно 0,51 мкМ.

Ключевые слова: фурин, диамидиногидразоны диальдегидов, ингибиторы фурина.

Фурин (3.4.21.75) является внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой сериновой эндопроотеиназой, которая обнаруживается во всех изученных тканях и клеточных линиях. Он относится к семейству пропротеинконвертаз (ПК), которые осуществляют посттрансляционную активацию первоначально синтезируемых неактивных предшественников протеинов. ПК, тем самым, превращают их в биологически активные продукты, образующиеся за счет ограниченного расщепления пептидных связей в исходном пропротеине [см. обзоры 1–4].

Фурин играет важную роль в эмбриогенезе, гомеостазе и других биологических процессах, так как вовлекается в процессинг широкого круга предшественников гормонов и нейропептидов, факторов роста и дифференцировки, рецепторных протеинов плазматической мембраны, факторов свертывания крови и адгезивных молекул [1–5]. Его обычно рассматривают как перспективную мишень для создания новых терапевтических средств на основе селективных ингибиторов энзима [1–3, 6–9]. Это обусловлено участием фурина в активации различных бактериальных токсинов, например, сибирской язвы, дифтерии и токсинов родов *Shiga* или *Bordetella* [1, 2], а также гликопротеинов вирусов-возбудителей таких инфекций, как ВИЧ-1, птичий грипп,

корь, геморрагическая лихорадка Эбола, цитомегаловирусные заболевания и т.д. [1–4]. Более того, фурин, как и другие ПК, участвует в развитии и течении таких заболеваний, как атеросклероз, рак и метастазирование, нейродегенеративные заболевания (например, болезнь Альцгеймера), нарушение метаболизма (ожирение и диабет) и др. [2, 6–9].

При дизайне ингибиторов фурина исходят из того факта, что в своих природных субстратах энзим узнает кластер положительно заряженных аминокислот на участке строения: $-(Lys/Arg)-(X)_n-(Lys/Arg)-$, где $n = 0, 2, 4$ или 6 , а X – любая аминокислота, кроме Cys [5, 10]. Протеолиз полипептидной цепи осуществляется после пары остатков основных аминокислот: $-Arg-Arg-$ или $-Lys-Arg-$ [5]. Таким образом, в природных субстратах фурина положительно заряженными группами, которые взаимодействуют со связывающим центром энзима, являются гуанидиновая группа аргинина и ϵ -аминогруппа лизина. При синтезе специфичных и эффективных ингибиторов энзимов широко используют различные миметики гуанидиновой группы аргинина [11].

К настоящему времени опубликовано ряд обзоров [13–16], посвященных синтезу ингибиторов фурина не только пептидной, но и псевдопептидной или непептидной природы. В структуре этих соединений могут содержаться

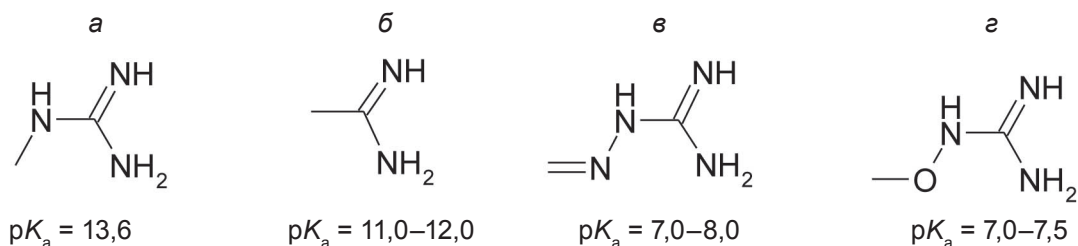


Рис. 1. Некоторые миметики гуанидиновой группы аргинина [11]: а – гуанидиновая группа; б – амидиновая; в – амидиногидразоновая; г – оксигуанидиновая [12]

положительно заряженные группировки, отличающиеся от гуанидиновой группы. Например, в работе Becker и др. [17] при синтезе псевдотетрапептидов использовали С-концевую 4-аминометилбензамидиновую группировку, что привело к созданию мощного синтетического ингибитора фурина ($K_i = 0,81$ нМ). Последующее введение в N-концевую часть молекулы положительно заряженной группировки дает псевдопептиды с чрезвычайно высокой антифуриновой активностью. Наиболее активные из них содержат на N-конце 4- или 3- (гуанидино)метилфенилацетильную группу и характеризуются значениями K_i 16 и, соответственно, 8 пМ [18].

Важнейшей положительно заряженной группировкой со сниженной основностью является амидиногидразоновая группа (рис. 1) – биоизостерный аналог гуанидиновой функции аргинина [19]. Действительно, наличие в молекуле амидиногидразонового заместителя обуславливает создание биологически активных соединений и лекарственных препаратов. Формулы некоторых из них представлены на рис. 2. Так, **CNI-1493** – препарат противовоспалительного и антипаразитарного действия – проходит II фазу клинических испытаний для лечения болезни Крона. Гуанабенз (**I**) – агонист α_2 -типа, используется для лечения гипертонии. Амбазон (**II**) представляет собой антисептик, применяемый для профилактики и лечения острых инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и горла. Показано, что соединения, родственные гуанобензу, являются ингибиторами биосинтеза альдостерона. Амидиногидразоны 1,5-дизамещенных 1,4-пентадиенона-3 (**III**) оказались пригодными для лечения малярии у теплокровных животных [20]. В 1995 г. синтезировано 22 амидиногидразона различных ароматических альдегидов в качестве агентов против трипаносом, в частности, против сонной болезни и болезни Шагаса [21]. В разные годы были

изучены производные амидиногидразонов, являющиеся ингибиторами S-аденозилметиониндекарбоксилазы или диаминооксидазы. Бисамидиногидразоны арильных и гетероарильных производных метилглиоксаля являются потенциальными противораковыми препаратами [22]. Амидиногидразоновые производные гидроиндена (например, **IV**) проявляют инотропное действие. Показано, что они являются ингибиторами Na^+, K^+ -АТФ-азы, не влияющими на сердечный ритм [23]. Создан ряд амидиногидразонов, являющихся ингибиторами некоторых сериновых протеиназ. Например, самое мощное соединение, тормозящее активность тромбина, характеризуется значением $K_i = 4,4$ нМ [19]. При скрининге многочисленных соединений различных классов было обнаружено, что амидиногидразон (**V**) способен ингибировать такую сериновую протеиназу, как фурин ($K_i = 11,8$ мкМ) [24]. В 2011 г. F. Sielaff и др. синтезировали более двух десятков амидиногидразоновых производных бензола и показали, что они ингибируют фурин. Оказалось, что при наличии в ароматическом кольце одной амидиногидразоновой группировки эти соединения слабо влияют на активность фурина ($K_i = 270-500$ мкМ) [25]. Присутствие двух амидиногидразоновых групп обуславливает рост сродства этих соединений к фурину примерно на два порядка. Наиболее эффективным оказалось соединение (**VI**), содержащее три заместителя с положительным зарядом ($K_i = 0,46$ мкМ). Наличие четырех амидиногидразоновых группировок (соед. **VII**) не приводит к дальнейшему росту антифуриновой активности ($K_i = 0,58$ мкМ) [25].

По данным рентгеноструктурного анализа [26] связывающий центр фурина напоминает по форме узкий и глубокий каньон, вдоль которого располагаются отрицательно заряженные остатки Glu и Asp. Можно предположить, что наилучшими ингибиторами фурина должны быть соединения, в структуре кото-

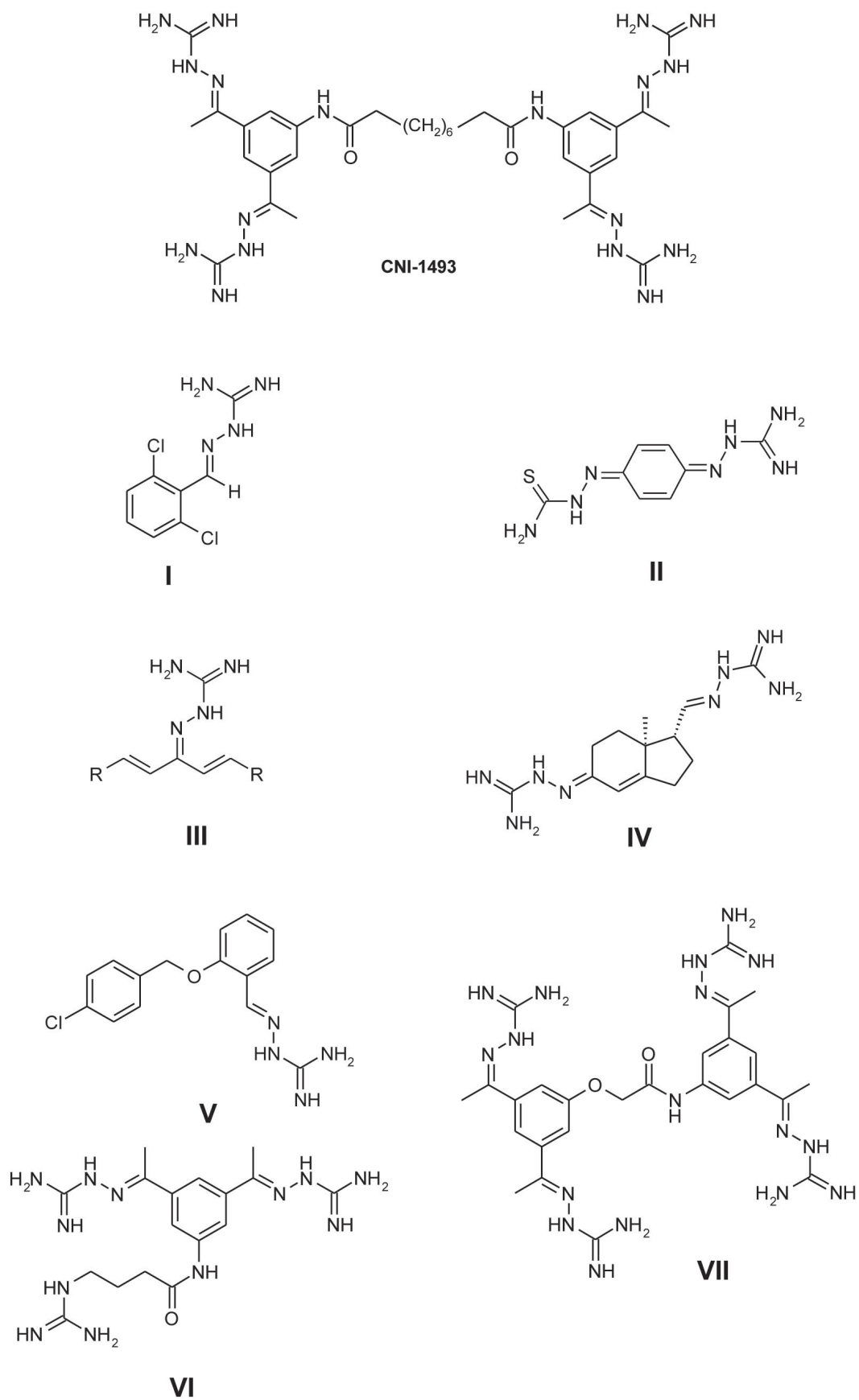
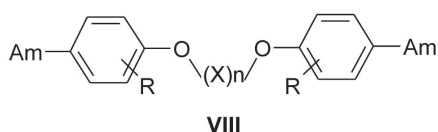


Рис. 2. Биологически активные соединения, содержащие амидиногидразоновые группы

рых содержится несколько положительно заряженных группировок, располагающихся вдоль протяженной молекулы ингибитора так, чтобы при взаимодействии с фурином они оказались пространственно сближенными с остатками Glu и Asp связывающего центра энзима.

Целью настоящей работы является синтез и исследование ингибиторных свойств соединений общей формулы (VIII), содержащих, по крайней мере, два положительно заряженных заместителя, расстояние между которыми можно менять за счет варьирования длины связывающего мостика.



Am – амидиногидразоновая или амидиновая группа; R – заместители бензольного цикла; (X)_n – группировка, «связывающая» арильные кольца.

Схема синтеза исследуемых соединений представлена на рис. 3.

Материалы и методы

Реагенты и препараты. В работе использовали флуорогенный субстрат Вос-Arg-Val-Arg-Arg-AMC фирмы Bachem и фурин (2000 ед./мл) фирмы New England BioLabs (Великобритания). Одна единица активности фурина определяется как такое количество энзима, которое в стандартных условиях отщепляет 1 пМАС от флуорогенного субстрата за 1 мин. Перед работой коммерческий препарат фурина мы разбавляли рабочим буфером (рН 7,2) в 20 раз и полученный раствор использовали для проведения энзиматической реакции.

Коммерческими препаратами являются также ЭДТА, β-меркаптоэтанол, Нерес, Brij 35, Тритон X-100, хлоргидрат бензамидина (Sigma, США). Остальные реагенты и растворители (квалификации хч или чда) получены из фирмы Химлаборреактив (Украина).

Синтез исследуемых препаратов. Спектры ЯМР ¹H записаны на приборе Varian Mercury-400 в ДМСО-*d*₆ (соединения 5–7, 9) и CDCl₃ (соединения 2–4, 8) с ТМС в качестве внутреннего стандарта. Температуры плавления были измерены на приборе Фишера–Джонса (Fisher Scientific Co, США).

3-Этокси-4-[2-(2-этокси-4-формилфенокси)этоксид]бензальдегид (2). К раствору 10 г (0,06 моль) этилванилина (1) в 100 мл этанола прибавляли 3,4 г (0,06 моль) КОН, а затем 5,7 г (0,03 моль) дибромэтана. Реакционную смесь

кипятили 30 ч, затем охлаждали и выливали в 500 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали и очищали кристаллизацией из этанола. Выход 52%. Т_{пл.} = 175–177 °С (Т_{пл.} = 177–181 °С [27]). ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,46 м (6H, 2CH₃); 4,14 м (4H, 2CH₂); 4,56 с (4H, 2CH₂); 7,09–7,46 м (6H, H аром.); 9,84 с (2H, 2CH). Найдено, %: С 67,10; Н – 6,28. C₂₀H₂₂O₆. Вычислено, %: С – 67,03; Н – 6,19.

3-Этокси-4-[4-(2-этокси-4-формилфенокси)бутоксид]бензальдегид (3) получали аналогично соединению (2) из этилванилина (1) и дибромбутана. Выход 62%. Т_{пл.} = 113–115 °С. ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,46 м (6H, 2CH₃); 2,12 с (4H, 2CH₂); 4,14 м (4H, 2CH₂); 4,23 с (4H, 2CH₂); 6,97–7,44 м (6H, H аром.); 9,86 с (2H, 2CH). Найдено, %: С – 68,29; Н – 6,85. C₂₂H₂₆O₆. Вычислено, %: С – 68,38; Н – 6,78.

3-Этокси-4-[4-(2-этокси-4-формилфеноксиметил)-фенил]метокси-бензальдегид (4). К раствору 8,3 г (0,05 моль) этилванилина (1) в 60 мл абсолютного ДМФА прибавляли 13,8 г (0,1 моль) свежeproкаленного поташа, а затем 4,38 г (0,025 моль) 1,4-ди(хлорметил)бензола. Смесь перемешивали 6 ч при температуре 90 °С, охлаждали и прибавляли 300 мл воды. Выпавший осадок диальдегида (4) отфильтровывали и очищали кристаллизацией из этанола. Выход 91%. Т_{пл.} = 146–148 °С. ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,34 м (6H, 2CH₃); 4,14 м (4H, 2CH₂); 5,23 с (4H, 2CH₂); 7,16–7,54 м (10H, H аром.); 9,84 с (2H, 2CH). Найдено, %: С – 71,79; Н – 5,96. C₂₆H₂₆O₆. Вычислено, %: С – 71,87; Н – 6,03.

1-([4-(2-{4-[(Карбамимидамино)метил]-2-этоксифенокси}-этоксид)-3-этоксифенил]метилден)аминогуанидин (5). К раствору 3,6 г (0,01 моль) диальдегида (2) в 50 мл смеси этанол–вода (4 : 1) прибавляли 2,72 г (0,02 моль) бикарбоната аминокуанидина, затем 2,52 г (0,03 моль) двууглекислого натрия и кипятили реакционную смесь 5 ч. Растворитель удаляли в вакууме, к остатку прибавляли 50 мл воды, осадок отфильтровывали и кристаллизовали из этанола. Выход 56%. Т_{пл.} = 227–229 °С. ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1,38 м (6H, 2CH₃); 4,08 м (4H, 2CH₂); 4,32 с (4H, 2CH₂); 5,43 ш.с (4H, 4NH); 5,91 ш.с (4H, 4NH); 6,99–7,42 м (6H, H аром.); 7,93 с (2H, 2CH). Найдено, %: С – 56,24; Н – 6,51; N – 23,90. C₂₂H₃₀N₈O₄. Вычислено, %: С – 56,16; Н – 6,43; N – 23,81.

1-([4-(4-{4-[(Карбамимидамино)метил]-2-этоксифенокси}-бутоксид)-3-этоксифенил]метилден)аминогуанидин (6) получали так, как описано при синтезе соединения (5) из эфира бутилендиэтилванилина (3) и бикарбоната аминокуанидина. Выход 59%.

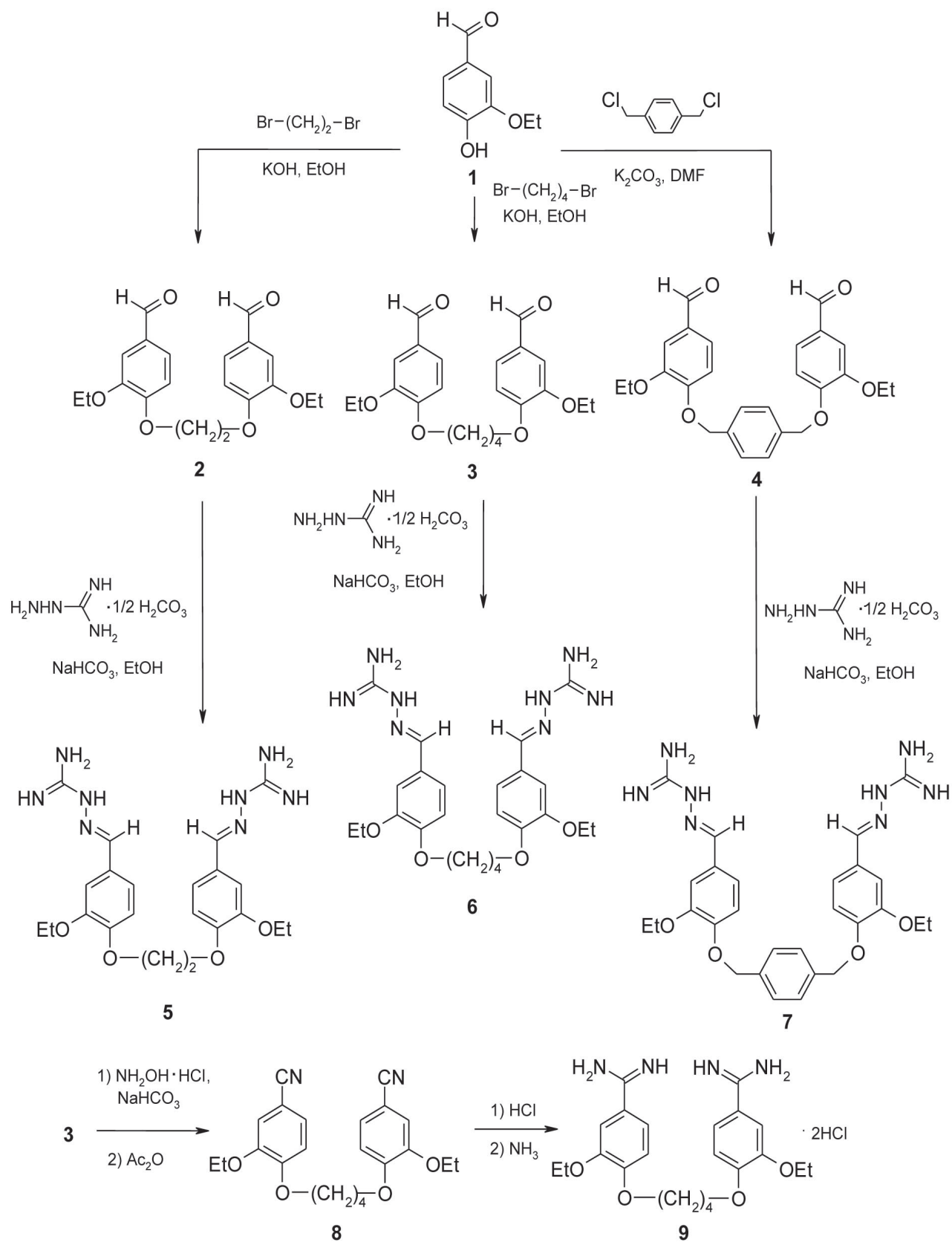


Рис. 3. Схема синтеза исследуемых соединений

$T_{пл.} = 119-121$ °С. ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,31 м (6H, $2CH_3$); 1,92 с (4H, $2CH_2$); 4,06 м (8H, $4CH_2$); 5,36 ш.с (4H, 4NH); 5,88 ш.с (4H, 4NH); 6,89–7,38 м (6H, H аром.); 7,92 с (2H, 2CH). Найдено, %: C – 57,73; H – 6,94; N – 22,53. $C_{24}H_{34}N_8O_4$. Вычислено, %: C – 57,82; H – 6,87; N – 22,47.

1-[(4-[(4-[(Карбамимидамино)метил]-2-этоксифеноксид-метил]фенил)метокси]-3-этоксифенил]метилиден)амино]гуанидин (7) получали аналогично соединению (5) из диальдегида (4) и аминогуанидина. Выход 82%. $T_{пл.} = 211-213$ °С. ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,33 м (6H, $2CH_3$); 4,07 м (4H, $2CH_2$); 5,10 с (4H, $2CH_2$); 5,40 ш.с (4H, 4NH); 5,91 ш.с (4H, 4NH); 6,96–7,46 м (10H, H аром.); 7,92 с (2H, 2CH). Найдено, %: C – 61,42; H – 6,36; N – 20,59. $C_{28}H_{34}N_8O_4$. Вычислено, %: C – 61,52; H – 6,27; N – 20,50.

4-[4-(4-Циано-2-этоксифеноксид)бутоксид]-3-этоксифенилнитрил (8). К раствору 3,86 г (0,01 моль) диальдегида (3) в 50 мл этанола прибавляли 0,9 г (0,013 моль) гидроксилamina солянокислого и 1,1 г (0,013 моль) соды. Реакционную смесь кипятили 6 ч, избыток растворителя удаляли в вакууме, к остатку прибавляли 50 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровывали, сушили на воздухе в течение 2 сут, растворяли в 15 мл уксусного ангидрида, кипятили 2 ч, затем охлаждали, растворитель удаляли в вакууме. К остатку прибавляли 50 мл воды, органический слой экстрагировали хлористым метилом (3×20 мл), сушили над Na_2SO_4 , растворитель удаляли в вакууме и динитрил (8) очищали кристаллизацией из этанола. Выход 58%. $T_{пл.} = 154-156$ °С. ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,44 м (6H, $2CH_3$); 2,08 м (4H, $2CH_2$); 4,06 м (4H, $2CH_2$); 4,14 с (4H, $2CH_2$); 6,88–7,26 м (6H, H аром.). Найдено, %: C – 69,53; H – 6,29; N – 7,44. $C_{22}H_{24}N_2O_4$. Вычислено, %: C – 69,46; H – 6,36; N – 7,36.

4-[4-(4-Карбамидоил-2-этоксифеноксид)бутоксид]-3-этоксифенил-1-карбоксимидамид дигидрохлорид (9). Раствор 2 г (0,005 моль) динитрила (8) в 20 мл абсолютного этанола насыщали сухим хлороводородом до привеса 0,6 г (0,016 моль). Реакционную смесь оставляли на 24 ч при температуре 20–25 °С, растворитель удаляли в вакууме, а к остатку прибавляли 50 мл абсолютного диэтилового эфира. Образовавшийся осадок отфильтровывали, сушили в вакууме водоструйного насоса при 40 °С, а затем растворяли в 50 мл этанола, насыщенного 0,35 г (0,02 моль) аммиака, и смесь оставляли на 24 ч при 20–25 °С. Затем спирт удаляли в вакууме, остаток промывали диэтиловым эфиром и сушили на воздухе. Выход диамида (9) составляет 51%. $T_{пл.} > 250$ °С (разл.).

ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,34 м (6H, $2CH_3$); 1,34 с (4H, $2CH_2$); 4,13 м (4H, $2CH_2$); 4,19 с (4H, $2CH_2$); 7,13–7,59 м (6H, H аром.); 9,09 ш.с (4H, $2NH_2$); 9,34 ш.с (4H, $2NH_2$). Найдено, %: C – 54,13; H – 6,53; N – 11,40; Cl – 14,64. $C_{22}H_{32}Cl_2N_4O_4$. Вычислено, %: C – 54,21; H – 6,62; N – 11,49; Cl – 14,55.

Определение активности фурина. Аликвоту раствора фурина, содержащую 1 ед. активности энзима, инкубировали с Вос-Arg-Val-Arg-Arg-АМС, (конечная концентрация 75–250 мкМ) в буфере рН 7,2 (100 мМ Hepes, 1 мМ $CaCl_2$, 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 2 мл ЭДТА (исходной концентрации 5 мМ) и измеряли относительную флуоресценцию на спектрофлуориметре РТИ Quanta Master 40 (Canada) при длине волны возбуждения 380 нм, испускания 460 нм и ширине обеих щелей 2 нм. Запись показаний вели в течение 60 секунд.

Значения констант Михаэлиса вычисляли из графиков Лайнуивера-Берка по трем независимым экспериментам.

Определение ингибиторного эффекта исследуемых соединений. Навеску соответствующего соединения растворяли в ДМСО и получали исходный раствор (концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ М), который затем разбавляли до концентрации, необходимой для ингибирования фурина. Раствор энзима (1 ед. активности) выдерживали в рабочем буфере (рН 7,2) с исследуемым ингибитором в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор флуорогенного субстрата до конечной концентрации 100 мкМ и энзиматическую реакцию вели в течение 1 ч при температуре 37 °С. Общий объем реакционной смеси составлял 150 мкл.

Реакцию прекращали добавлением раствора ЭДТА и количество выделившегося АМС определяли против буферного раствора, как указано выше. Значения I_{50} вычисляли, исходя из линейных графиков зависимости величины ингибиторного эффекта от концентрации исследуемого вещества. Активность энзима, определяемая в отсутствие исследуемых соединений, принималась за 100%. Эффективность ингибирования вычисляли по формуле:

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

где F_0 – относительная флуоресценция реакционной смеси в отсутствие исследуемого вещества; F – флуоресценция в присутствии исследуемого вещества.

Обработку результатов измерений и построение графиков осуществляли с помо-

щю программ Origin 5.0 Professional или 8.0 (OriginLab). Для каждой точки использовали как минимум два измерения. 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 [1–4].

Исследованные нами производные типа (VIII) содержат в своей молекуле две положительно заряженные группы, расстояние между которыми можно менять за счет варьирования длины связывающего «мостика». На рис. 4–6 представлены типичные примеры определения кинетических параметров и выяснения механизма действия исследованных производных. Например, из данных, приведенных на рис. 4, можно легко заметить, что под влиянием этих соединений происходит зависящее от концентрации падение активности фурина, причем 4-диметиламинобензамидин является наименее эффективным соединением. Этот факт подтверждается также величинами K_i и I_{50} , представленными в таблице.

Для определения значений I_{50} , т.е. такой концентрации ингибитора, при которой происходит снижение активности энзима по сравнению с контролем на 50%, мы строили графики зависимости эффективности ингибирования от концентрации соединений. В ка-

честве примера на рис. 5 показана типичная зависимость для диамидина (9).

Механизм инактивации фурина определяли, используя графики Лайнуивера–Берка, а величины кажущихся констант ингибирования K_i вычисляли, исходя из графиков в координатах Диксона [28]. На рис. 6 представлены соответствующие примеры некоторых типичных графиков. Оказалось, что 4-диметиламинобензамидин является неконкурентным ингибитором фурина и для него $K_i = I_{50}$ (таблица).

По предварительным данным диаминогидразоны снижают активность фурина по конкурентному или смешанному типу. В этом случае степень различия между параметрами K_i и I_{50} , зависит от использованной концентрации субстрата и величины субстратной константы.

В таблице приведены формулы исследованных соединений и их ингибиторный эффект. Анализ полученных данных показал, что бензамидин, содержащий в своей молекуле одну амидиновую группу, практически не ингибирует фурина ($I_{50} = 287$ мкМ). Введение в бензольное кольцо второй положительно заряженной группировки (диметиламино-группы) заметно увеличивает эффективность ингибирования энзима. Производное (5), содержащее по одной амидиногидразоновой группе в каждом из двух арильных колец, соединенных между собой мостиком, характеризуется ростом сродства к фурину почти в 15 раз. Ингибиторный эффект для соединений типа (VIII) возрастает с увеличением длины или гидрофобности связывающего звена. Действительно, диаминогидразон (6) с более длинной полиметиленовой цепочкой характеризуется значе-

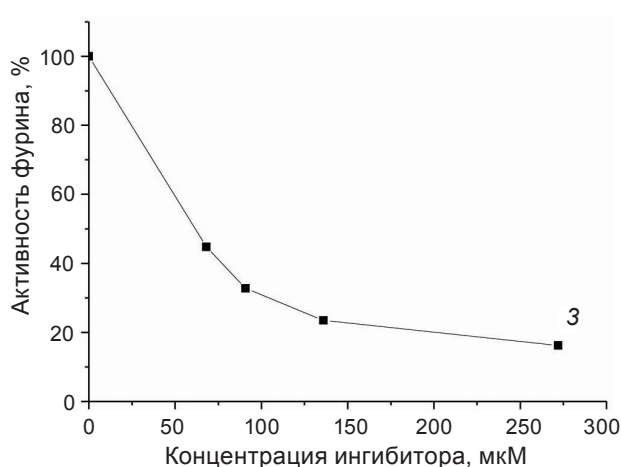
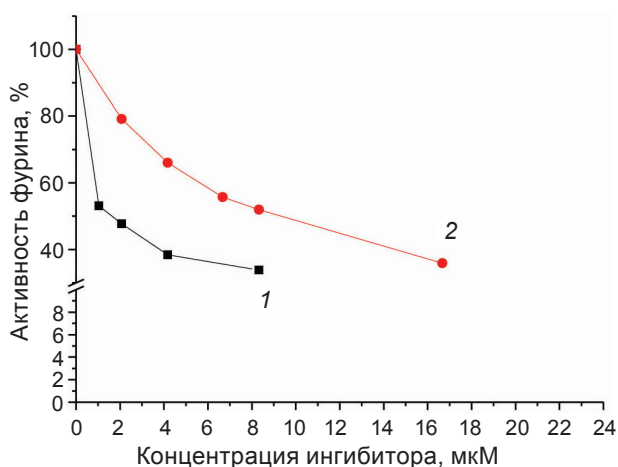


Рис. 4. Влияние синтезированных ингибиторов на активность фурина при pH 7,2: 1 – диаминогидразон (7); 2 – соединение (9); 3 – 4-диметиламинобензамидин

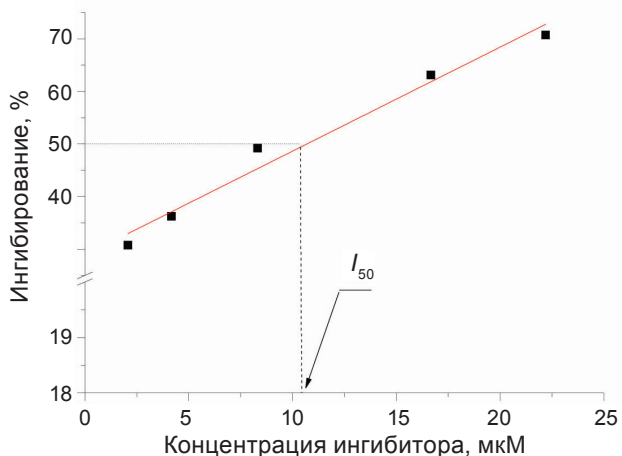


Рис. 5. Определение коэффициента ингибирования (I_{50}) фурина диамидином (9). Коэффициент ингибирования I_{50} соответствует такой концентрации ингибитора, при которой наблюдается снижение активности энзима по сравнению с контролем на 50%

нием $K_i = 1,1$ мкМ. Соединение (7), содержащее в «мостике» липофильное бензольное кольцо, является самым эффективным из синтезированных ингибиторов фурина ($K_i = 0,51$ мкМ). Оно почти в 100 раз активнее ингибирует фурин, чем 4-диметиламинобензамидин.

Данные, представленные в таблице, позволяют также сделать вывод о том, что, если в соединении (6) две слабо основные амидиногидразоновые группы заменить на более основные амидиновые группировки (соед. 9), способные более эффективно взаимодействовать с фурином за счет кулоновских сил, то это, к удивлению, не вызывает роста ингибиторного эффекта. Можно предположить, что соединение (9) хуже ингибирует фурин, чем производное (6) из-за того, что в структуре диамидина (9) содержится всего 4 донора и 4 акцептора водородной связи, тогда как молекула диамидиногидразона (6) имеет 6 доноров и 6 акцепторов водородной связи.

Таким образом, в результате проведенного исследования осуществлен дизайн и синтез диамидиногидразоновых производных (5–7) и диамидинового ингибитора (9). Положительно заряженные группировки этих производных связаны «мостиком» различной длины и гидрофобности. Продемонстрировано, что 4-диметиламинобензамидин является неконкурентным ингибитором фурина, тогда как соединения (VIII) инактивируют энзим по механизму конкурентного или смешанного типа. Найдено, что с увеличением длины (или гидрофобности) связующего «мостика» ингибиторный эффект исследуемых соединений

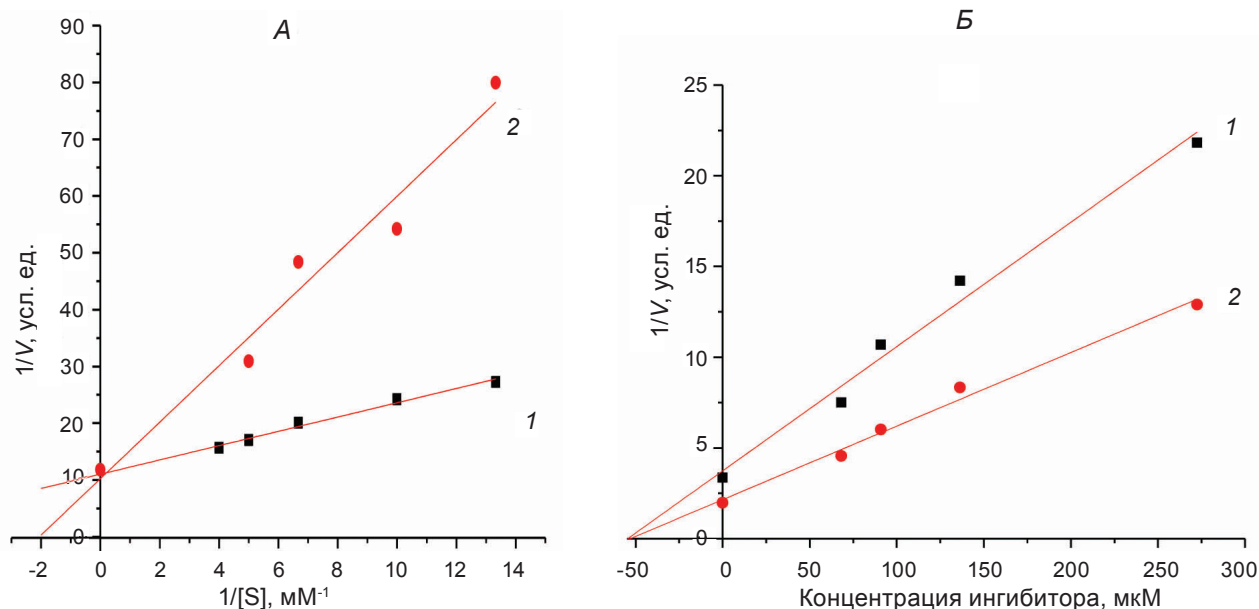
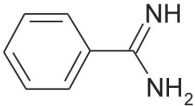
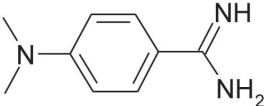
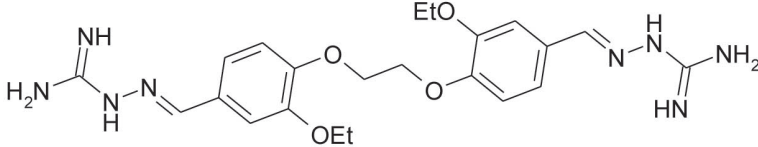
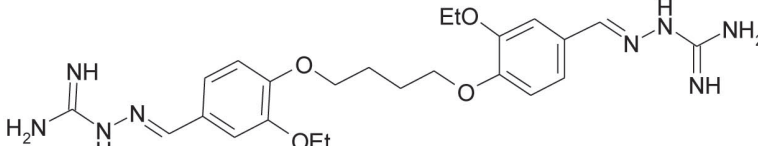
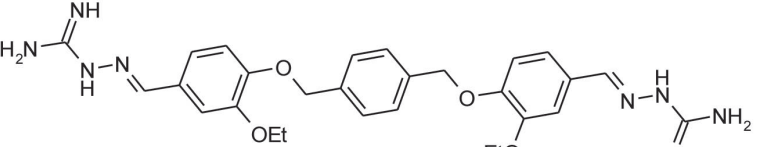
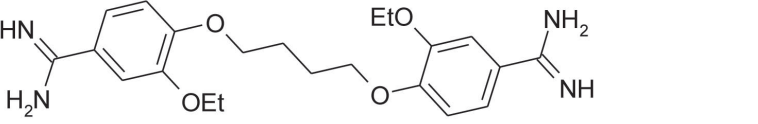


Рис. 6. Определение механизма действия и эффективности ингибирования фурина некоторыми синтезированными соединениями. А — График Лайнуивера–Берка конкурентного ингибирования энзима при рН 7,2 диамидиногидразоном (5): 1 — в отсутствие ингибитора; 2 — в присутствии 4,3 мкМ соединения (5); Б — Определение кажущейся константы неконкурентного ингибирования фурина 4-диметиламинобензамидином (1 — 100 мкМ; 2 — 200 мкМ) по Диксону

Ингибирование фурина соединениями, содержащими положительно заряженные группы – миметики гуанидиновой группы аргинина

Код или название соединения	Структурная формула соединения	Эффективность ингибирования	
		K_i , мкМ	I_{50} , мкМ
Бензамидин		–	287
4-Диметиламинобензамидин		$48,2 \pm 5,3$	$48,2 \pm 5,3$
5		$3,3 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,7$
6		$1,1 \pm 0,1$	3,18
7		$0,51 \pm 0,02$	1,50
9		3,9	$10,9 \pm 0,2$

возрастает. Значение K_i наиболее активного ингибитора, содержащего в «мостике» липофильное бензольное кольцо, равно 0,51 мкМ. Показано, что переход от 4-диметиламинобензамидина, несущего в арильном кольце две по-

ложительно заряженные группы, к диарилам с двумя положительно заряженными заместителями (5–7 и 9), ведет, судя по величинам K_i и I_{50} , к усилению ингибиторного эффекта в 12–100 раз.

Авторы глубоко признательны член-корр. НАН Украины, профессору С. А. Костерину за постоянный интерес к данной работе, а также профессору И. В. Смирновой за помощь в приобретении как фурина, так и других реагентов и препаратов.

НЕПЕПТИДНІ ІНГІБИТОРИ ФУРИНУ НА ОСНОВІ АМІДИНОГІДРАЗОНІВ ДІАРИЛАЛЬДЕГІДІВ

В. К. Кибірев¹, Т. В. Осадчук²,
О. П. Козаченко², О. Б. Вадзюк¹,
В. С. Броварець²

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Інститут біоорганічної хімії та
нафтохімії НАН України, Київ

Взаємодією діальдегідів (похідних етерів етилендіетилваніліну) з бікарбонатом аміногуанідину синтезовано відповідні діамідиногідрозони, які містять два ароматичних кільця, що з'єднані між собою 1,2-етиленовим, 1,4-бутиленовим або 1,4-диметиленбензольним «містком». Показано, що ці сполуки є інгібіторами фурину. Знайдено, що їхня антифуринова активність росте зі збільшенням довжини (або гідрофобності) сполучного містка. Значення K_i найактивнішої сполуки, що має в містку ліпофільне бензольне кільце, становить 0,51 мкМ.

Ключові слова: фурин, діамідиногідрозони діальдегідів, інгібітори фурину.

NON-PEPTIDE FURIN INHIBITORS BASED ON AMIDINOHYDRAZONES OF DIARYLALDEHYDES

V. K. Kibirev¹, T. V. Osadchuk²,
O. P. Kozachenko², O. B. Vadzyuk¹,
V. S. Brovarets²

¹Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

A series of novel non-peptidic furin inhibitors containing amidinohydrazone moieties has been synthesized under interaction of dialdehydes, the derivatives of ethylene diethylvanillin ethers, with aminoguanidine bicarbonate. Two aryl cycles were bridged by 1,2-ethylene-, 1,4-buthylene- or 1,4-dimethylenebenzene-group. The compounds have been found to inhibit furin. The antifurin activity was shown to grow with the increase of the length and/or hydrophobicity of the bridge. The most potent compound, containing in the bridge the lipophylic benzene cycle was found to inhibit the activity of furin with $K_i = 0.51 \mu\text{M}$.

Key words: furin, diamidinohydrazones of dialdehydes, furin inhibitors.

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. Bergeron F., Leduc R., Day R. // *J. Mol. Endocrin.* – 2000. – **24**, N 1. – P. 1–22.
4. Кибірев В. К., Осадчук Т. В., Радавський Ю. Л. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 6. – С. 5–18.
5. Hosaka M., Nagahama M., Kim W-S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266**, N 19. – P. 12127–12130.
6. Stawowy P., Meyborg H., Stibenz D. et al. // *Circulation.* – 2005. – **111**, N 21. – P. 2820–2827.
7. Lahlil R., Calvo F., Khatib A-M. // *Rec. Patents Anti-Canc. Drug Disc.* – 2009. – **4**, N 1. – P. 83–91.
8. Benjannet S., Elagoz A., Wickham L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 14. – P. 10879–10887.
9. Croissandeau G., Basak A., Seidah N. G. et al. // *J. Cell Sci.* – 2001. – **115**, N 6. – P. 1203–1211.
10. Zhong M., Munzer J. S., Basak A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N 48. – P. 33913–33920.
11. Peterlin-Mašič L., Kikelj D. // *Tetrahedron.* – 2001. – **57**, N 33. – P. 7073–7105.
12. Tomczuk B., Lu T., Soll R. M. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – **13**, N 8. – P. 1495–1498.
13. Fugère M., Day R. // *TRENDS Pharm. Sci.* – 2005. – **26**, N 6. – P. 294–301.
14. Basak A. // *J. Mol. Med.* – 2005. – **83**, N 11. – P. 844–855.
15. Кибірев В. К., Осадчук Т. В. // *Укр. біохім. журн.* – 2012. – **84**, № 2. – С. 5–29.
16. Fugère M., Day R. // *Cur. Pharm. Des.* – 2002. – **8**, N 7. – P. 549–562.
17. Becker G. L., Sielaff F., Than M.E. et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – **53**, N 3. – P. 1067–1075.
18. Becker G. L., Lu Y., Hards K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, N 26. – P. 21992–22003.
19. Soll R. M., Lu T., Tomczuk B. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – **10**, N 1. – P. 1–4.
20. *US Patent 3878201*. 1,5-Bis substituted-1,4-pentadien-3-one substituted amidino hydrazone salts and method of preparing the same. – Tomcufcik A. S. – 1975.
21. Messeder J. C., Tinoco L. W., Figueroa-Villar J. D. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1995. – **5**, N 24. – P. 3079–3084.

22. Stanek J., Caravatti G., Capraro H. G. et al. // J. Med. Chem. – 1993. – **36**, N 1. – P. 46–54.
23. Sevillano L. G., Melero C. P., Caballero E. et al. // Ibid. – 2002. – **45**, N 1. – P. 127–136.
24. Komiyama T., Coppola J. M., Larsen M. J. et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – **284**, N 23. – P. 15729–15738.
25. Sielaff F., Than M. E., Bevec D. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2011. – **21**, N 2. – P. 836–840.
26. Henrich S., Cameron A., Bourenkov G. P. et al. // Nat. Struct. Biol. – 2003. – **10**, N 7. – P. 520–526.
27. US Patent 2649436. – Phenol ether resins. – Bock L. H., Carlson L. J. – 1953.
28. Dixon M. // Biochem. J. – 1953. – **55**, N 1. – P. 170–171.

Получено 27.09.2012