

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.151.042

## НОВЫЕ НЕПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФУРИНА

В. К. КИБИРЕВ<sup>1</sup>, Т. В. ОСАДЧУК<sup>1</sup>, О. Б. ВАДЗЮК<sup>2</sup>, М. М. ГАРАЗД<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Родственная субтилизину пропротеинконвертаза человека — фурин — является важнейшей фармацевтической мишенью для синтеза соответствующих ингибиторов, поскольку энзим играет жизненно важную роль в развитии многих заболеваний человека.

Для выявления нового класса низкомолекулярных непептидных ингибиторов фурина проведен скрининг ряда флавоноидов и некоторых природных соединений. Найдено, что гликозилированные флавоноиды: рутин, нарингин, байкалин и метилгесперидин — ингибируют фурин при pH 7,2 обратимо и конкурентно с  $K_i \sim 80\text{--}200$  мкМ. Значения  $K_i$  определяли по графикам Диксона и/или Эди-Хофсти, используя флуорогенный субстрат *Woc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC*. Хотя исследованные флавоноиды проявляют лишь умеренную ингибиторную активность, они могут быть полезными при разработке более мощных непептидных ингибиторов фурина в будущем.

**Ключевые слова:** фурин, ингибиторы фурина, флавоноиды, рутин, нарингин, байкалин, метилгесперидин.

**Ф**урин (КФ 3.4.21.75) — наиболее изученный и охарактеризованный энзим, относящийся к семейству пропротеинконвертаз (ПК), является внутриклеточной кальцийзависимой сериновой эндопротеиназой животных. За счет ограниченного расщепления пептидных связей, он способен активировать предшественники различных протеинов: рецепторов, гормонов, факторов роста и дифференциации, протеинов плазмы, энзимов системы свертывания крови и т.д. [1–3]. Помимо этого фурин участвует в процессинге различных бактериальных экзотоксинов, в том числе токсинов сибирской язвы [4, 5] и дифтерии [6], а также в активации гликопротеинов различных вирусов, например, вирусов лихорадки Эбола [7], гр 160 ВИЧ-1 [8], птичьего гриппа [9]. Также хорошо изучена способность фурина активировать предшественники энзимов, участвующих в патогенезе раковых заболеваний [10], болезни Альцгеймера [1–3] и других заболеваний. Поэтому фурин рассматривается как важнейшая фармакологическая мишень для синтеза соответствующих ингибиторов с целью создания на их основе современных лекарственных препаратов [1–3, 11]. В обзоре [12] представлены сведения о необратимых и обратимых ингибиторах фурина пептидной, псев-

допептидной и непептидной природы. В частности, обсуждаются ингибиторы протеиновой природы, которые включают как природные, так и биоинженерные протеины [12]. По мнению автора, особый интерес, однако, представляют низкомолекулярные соединения, так как они более доступны в плане синтеза, менее иммуногенны, метаболически могут быть более устойчивыми и их можно принимать *per os*. Указанными ингибиторами являются полиаргинины, пептидил-хлорметилкетоны, аминометилкетонные или кетометиленовые псевдопептиды, производные некоторых циклических пептидов и другие небольшие пептиды [12]. Для фурина известны также ингибиторы непептидной природы, которые включают производные андрографолида, выделенного из медицинского растения *Andrographis paniculata* [13], комплексы меди или цинка с некоторыми производными пиридина [14] и небольшие молекулы, являющиеся производными 2,5-дидезоксистрептамина [15, 16].

Учитывая субстратную специфичность фурина [17], которая обусловлена присутствием в протеиновых субстратах двух рядом расположенных положительно заряженных остатков —Arg-Arg- или —Lys-Arg-, локализованных во фрагменте последовательности аминокислот —

Arg-X-Lys/Arg-Arg-, представляється несколько неожиданным то, что незаряженный лактон из *A. paniculata* [13], способен тормозить протеолитическую активность энзима. Тщательный скрининг нескольких тысяч различных соединений показал, что ингибиторами фурина являются нафтофлуоресцеин, дикумарол, а также целый ряд его производных [18].

Таким образом, к настоящему времени установлено, что некоторые низкомолекулярные незаряженные соединения способны снижать активность фурина [13, 18, 19]. Поскольку расширение спектра таких производных и изучение их свойств и механизма действия позволит целенаправленно синтезировать специфические ингибиторы фурина, целью настоящей работы является поиск и исследование свойств новых ингибиторов фурина (которые не содержат положительного заряда) среди флавоноидов и ряда других природных соединений. Для сравнения исследовано также действие на фурина такого протеина, как протаминсульфат.

### Материалы и методы

Кверцетин и рутин были любезно предоставлены профессором химического факультета Киевского национального университета им. Тараса Шевченко В. П. Хилей, а другие флавоноиды и изофлавоны – фирмой Eximedlab (Киев). Протаминсульфат получили от профессора С. А. Кудинова (Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины).

В работе использовали фурин (2000 ед/мл) фирмы New England BioLabs и флуорогенный субстрат Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC фирмы Bachem (Швейцария), одна единица активности фурина определяется как такое количество энзима, которое отщепляет 1 пкМ АМК от флуорогенного субстрата за 1 мин в указанных условиях. Коммерческими препаратами являются также ЭДТА (Serva, Германия), β-меркаптоэтанол, НЕРЕС и Brij 35 (Sigma, США), Тритон X-100 (Fluka, Швейцария). Остальные реагенты – отечественные препараты квалификации хч или чда.

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

Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл ЭДТА (исходной концентрации 5 мМ).

Количество выделившегося при этом АМК измеряли на спектрофлуориметре Signe-4M (производство Латвии) при длине волны возбуждения 380 нм и испускания 460 нм.

Способность исследуемых соединений ингибировать фурина изучали в том же буфере, рН 7,2. Аликвоту энзима выдерживали с 5–20 мкл исследуемого соединения (исходная концентрация 100–600 мкМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли субстрат до конечной концентрации 100 или 200 мкМ и проводили реакцию в течение 1–5 часов. Расщепление флуорогенного субстрата останавливали добавлением раствора ЭДТА, и количество выделившегося АМК определяли, как указано выше. Значения I<sub>50</sub> вычисляли с использованием линейных графиков зависимости величины ингибирования от концентрации исследуемого вещества. При этом за 100% принимали активность фурина, определяемую в среде инкубации в отсутствие указанных соединений. Величины K<sub>i</sub> вычисляли из графиков Диксона и/или Эди-Хофсти. Обработку результатов измерений и построение графиков осуществляли с помощью программ Origin 7.0 и 8.0 (OriginLab). Ошибка эксперимента не превышала 10% измеряемой величины.

### Результаты и обсуждение

Исследование свойств фурина может дать ценную информацию не только для выяснения важных теоретических вопросов, связанных с биологией клетки [2], но и для решения ряда практических проблем, направленных на создание новых лекарственных средств на основе синтетических ингибиторов энзима [1–3, 12, 13].

Выполняя программу поиска новых ингибиторов фурина, мы обратили внимание на низкомолекулярные соединения нейтрального характера, поскольку изучение их свойств позволит, как мы надеемся, обнаружить производные с механизмом действия, отличным от механизма действия соединений протеиново-пептидной природы.

Учитывая данные литературы [13, 18, 19], наше внимание было обращено на флавоноиды и некоторые природные соединения, содержащиеся в растениях. В частности мы изучили ряд флавоноидов (кверцетин, рутин, нарингин и др.), изофлавонов (генистеин, дайдзеин), эллаговую кислоту, дибензофурановое производное, найденное в лишайниках, и микотоксин зеараленон. Их формулы представлены на рис. 1.

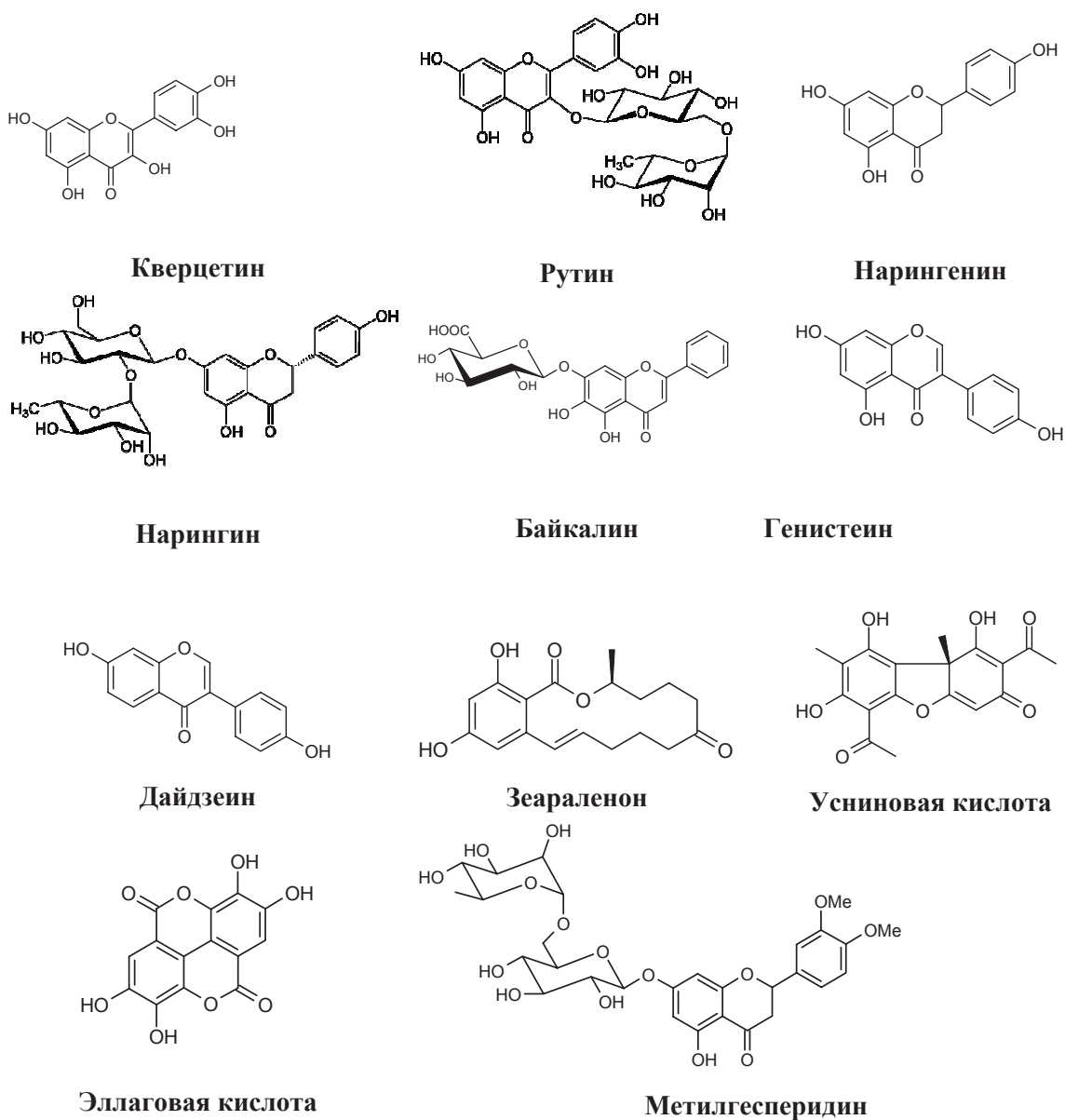


Рис. 1. Названия и химическое строение исследованных соединений

Прежде всего, был осуществлен скрининг этих соединений при их конечной концентрации 0,3 мг/мл. В табл. 1 представлены соответствующие данные.

Изучение влияния данных веществ на активность фурина показало, что при увеличении их концентрации происходит зависимое от дозы торможение активности энзима. Ингибирование исследуемой реакции наглядно демонстрирует рис. 2, на котором представлено постепенное нарастание интенсивности флуоресценции во время гидролиза флуорогенного субстрата Вос-Arg-Val-Arg-Arg-АМС фурином (кривые 1–5) и отсутствие характерной кривой

флуоресценции даже после 3 часов инкубации пробы с рутином (кривая 6).

Из данных, представленных на рис. 3 ясно, что рутин, несмотря на отсутствие в его молекуле положительного заряда, ингибирует фурин конкурентно. Можно предположить, что и другие исследованные флавоноиды (табл. 1), подобно соединениям, изученным в работах [13, 18], также являются конкурентными ингибиторами фурина, хотя для окончательного вывода требуются дополнительные исследования.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что негликозилированные биофла-

Таблиця 1. Інгибування фурина досліджуваними соединениями\*

Исследуемый препарат	Интенсивность флуоресценции, усл. ед.	Ингибирование, %
Без ингибитора	7,52	—
Протаминсульфат	4,17	45
Кверцетин	Выпадает в осадок	
Рутин	3,68	51
Байкалин	3,39	55
Генистеин	Выпадает в осадок	
Нарингенин	Выпадает в осадок	
Нарингин	4,59	39
Дайдзеин	Выпадает в осадок	
Метилгесперидин	3,43	54
Зеараленон	7,35	2
Усниновая кислота	7,53	Не ингибирует
Эллаговая кислота	Выпадает в осадок	

\*Примечание. Условия проведения реакции: содержание фурина в пробе 5 ед.; концентрация флуорогенного субстрата 100 мкМ; объем пробы 150 мкл; время предварительной инкубации исследуемого соединения (0,3 мг/мл) с фурином 30 мин при комнатной температуре; продолжительность энзиматической реакции 5 ч при рН 7,2 и температуре 37 °С

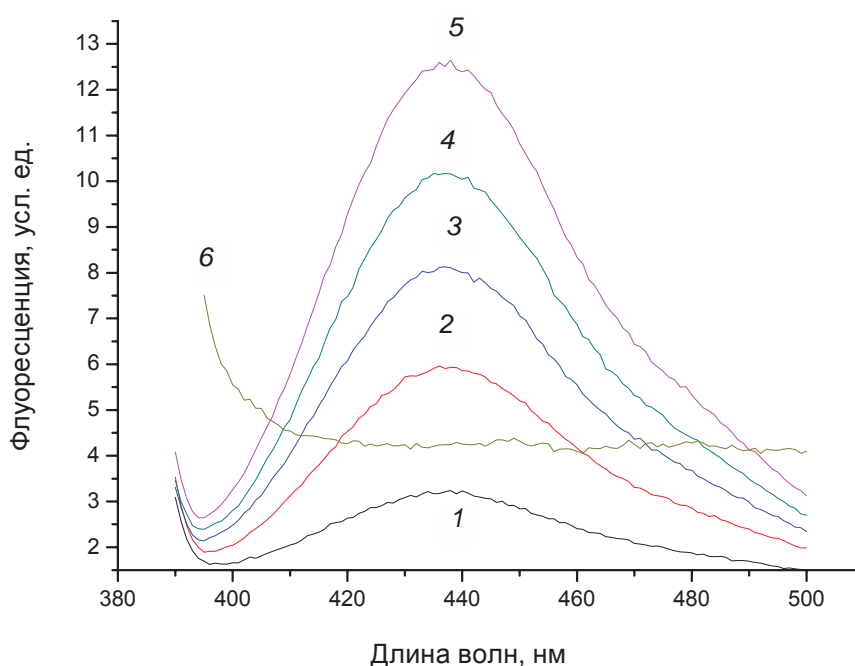


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції при гідролізі флуорогенного субстрата *Вос-Arg-Val-Arg-Arg-AMC* (100 мкМ) фурином (5 ед.) при рН 7,2 и  $t = 37^{\circ}\text{C}$ ; время реакції: 1 – 30 мин; 2 – 1 час 15 мин; 3 – 2 ч; 4 – 3 ч; 5 – 5 ч; 6 – 3 ч в присутствии рутина

воноиды (кверцетин, нарингенин, дайдзеин и генистеин) плохо растворяются в буфере для проведения реакции с фурином. В условиях

эксперимента они выпадают в осадок, что препятствует определению величины их тормозящего действия.

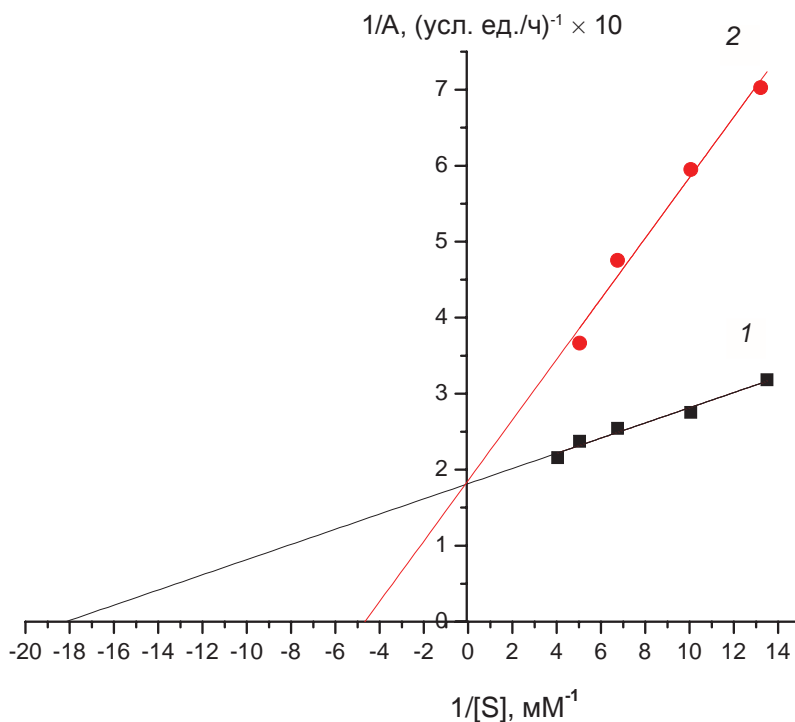


Рис. 3. График Лайнуивера-Бэрка конкурентного ингибирования рутином гидролиза флуорогенного субстрата *Вос-Arg-Val-Arg-Arg-АМС* (75–250 мкМ) фурином (5 ед) при рН 7,2 и  $t = 37^\circ\text{C}$ ; 1 – в отсутствие рутина; 2 – в присутствии рутина (700 мкМ)

Растворимость кверцетина в воде возрастает, как известно, в щелочной среде, поэтому было проведено его тестирование при рН 9,0, хотя при этом значении рН активность энзима снижается более чем в 2 раза по сравнению с его активностью при оптимальных условиях. Оказалось, что при рН 9,0 кверцетин слабо, но отчетливо ингибирует фурин (примерно на 10%). Ранее на культуре клеток было обнаружено, что активность фурина уменьшается в присутствии некоторых природных полифенолов (и кверцетина в том числе), хотя в клетке это может протекать по разным механизмам. Наши эксперименты при рН 9,0 свидетельствуют о том, что кверцетин способен непосредственно взаимодействовать с фурином и влиять тем самым на его активность. Ингибиторную активность нарингенина, дайдзеина, генистеина, а также эллаговой кислоты в этих условиях определить, однако, не удалось, так как в буфере и при рН 9,0 эти вещества не растворяются.

Значения параметров ингибирования ( $K_i$ ) соединений, указанных в табл. 1, определяли лишь для тех производных, которые в условиях предварительного эксперимента подавляли активность фурина не менее, чем на 40%. Это характерно для рутина, нарингина, байкалина

и метилгесперидина. Полученные значения  $K_i$  представлены в табл. 2. Процесс ингибирования фурина флавоноидами изучали, осуществляя инкубацию пробы энзима с исследуемыми соединениями при различной их концентрации. Последующее построение графиков Лайнуивера-Бэрка и/или Эди-Хофсти позволило установить, что, например, рутин ингибирует фурин конкурентно (рис. 3), а торможение нарингином носит смешанный характер (данные не приведены). Следует подчеркнуть, что при фиксированной концентрации ингибитора эффективность торможения ослабевает с увеличением концентрации субстрата. Например, нарингин (670 мкМ) ингибирует фурин на 65%

Таблица 2. Величины констант ингибирования фурина некоторыми из исследуемых соединений

Название соединения	Величина $K_i$ , мкМ
Рутин	160
Нарингин	226
Байкалин	80
Метилгесперидин	150



при концентрації субстрата 75 мкМ, на 54% при концентрації субстрата 150 мкМ і всього лише на 25% при концентрації флуорогенного субстрата 200 мкМ.

Значення  $K_i$  вичисляли, як правило, по графікам, побудованим в координатах Діксона [20]. Предварительно определяли также величину  $K_m$  хромогенного субстрата в используемых нами условиях проведения ферментативной реакции (см. раздел Материалы и методы). Значение  $K_m$  получили равным 55 мкМ, что совпадает с величиной 51,6 – 57 мкМ, опубликованной в работе [21].

Принимая во внимание субстратную специфичность фурина, изучали также ингибиторный эффект протаминсульфата – протеина, молекула которого обогащена остатками положительно заряженного аргинина. Проведенная работа показывает, что протаминсульфат действительно способен ингибировать фурин.

Использованные нами флавоноиды проявляют умеренную ингибиторную активность и по сравнению с другими изученными нейтральными низкомолекулярными соединениями [18-19] являются более слабыми ингибиторами фурина. Исследование свойств непептидных ингибиторов может, однако, привести к созданию соединений, которые будут специфически взаимодействовать с активным или аллостерическим центром фермента, индуцируя в его молекуле определенные конформационные изменения, обуславливающие снижение активности фурина. Создание именно аллостерических ингибиторов ПК (в том числе и фурина) является, по мнению авторов работы [22], магистральным направлением поиска новых специфических ингибиторов указанных ферментов.

Итак, проведенная работа показала, что рутин, нарингин и некоторые другие гликозильированные флавоноиды, не имеющие в молекуле положительного заряда, способны взаимодействовать с фурином и ингибировать его конкурентно с величиной  $K_i$ , находящейся в пределах ~ 80–200 мкМ. Конкуренция исследованных соединений с субстратом свидетельствует о том, что флавоноиды непосредственно связываются с активным центром фермента. Хотя механизм такого взаимодействия пока не совсем ясен, можно предположить, что торможение обусловлено как гидрофобными взаимодействиями остова молекулы флавоноидов, так и образованием водородных связей между гидроксильными группами гликозильированного

фрагмента и остатками аминокислот активного центра фурина. В пользу этого предположения свидетельствует работа [13], в которой показано, что гликозилирование андрографолида обуславливает рост его ингибиторной активности. Различия в эффективности торможения фурина в исследованных соединениях зависят, по-видимому, от способа ориентации в пространстве их гликозидных группировок, обеспечивающих точную «подгонку» молекулы флавоноида к ферменту и ее наиболее продуктивное взаимодействие со связывающим центром фурина.

Авторы глубоко признательны проф. Смирновой И. В. за постоянный интерес к работе и за помощь в приобретении фурина и ряда других реагентов и препаратов.

### НОВІ НЕПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ ФУРИНУ

*В. К. Кібіреві<sup>1</sup>, Т. В. Осадчук<sup>1</sup>,  
О. Б. Вадзюк<sup>2</sup>, М. М. Гаразд<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Споріднена субтилізину пропротейнконвертаза людини – фурин – є найважливішою фармацевтичною мішенню для створення відповідних інгібіторів, оскільки фермент відіграє життєво важливу роль у розвитку багатьох захворювань людини.

Для виявлення нового класу низкомолекулярних непептидних інгібіторів фурину здійснено скринінг низки флавоноїдів та деяких природних сполук. Знайдено, що глікозильовані флавоноїди: рутин, нарингін, байкалін та метилгесперидин інгібують фурин при рН 7,2 зворотно і конкурентно з  $K_i \sim 80\text{--}200$  мкМ. Величини  $K_i$  визначали із графіків у координатах Діксона або Еді-Хофсті, використовуючи флуорогенний субстрат Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC. Хоча досліджувані флавоноїди виявляють лише помірну інгібіторну активність, вони можуть бути корисними для розробки більш потужних непептидних інгібіторів фурину в майбутньому.

Ключові слова: фурин, інгібітори фурину, флавоноїди, рутин, нарингін, байкалін, метилгесперидин.

## NEW NON-PEPTIDE INHIBITORS OF FURIN

V. K. Kibirev<sup>1</sup>, T. V. Osadchuk<sup>1</sup>,  
O. B. Vadzyuk<sup>2</sup>, M. M. Garazd<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

<sup>2</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kibirev@bpcci.kiev.ua

### Summary

Furin, a human subtilisin-related proprotein convertase, is the most important pharmaceutical target because it plays a vital role in development of numerous disease processes. To identify a new class of small non-peptide inhibitors of furin we performed a study of several flavonoids and some natural products. Glycosylated flavonoids: rutin, naringin, baicalin and methylhesperidin were shown to inhibit furin at pH 7.2 reversibly and competitively with  $K_i \sim 80\text{--}200 \mu\text{M}$ . The  $K_i$  values were derived from Dixon and/or Eadie-Hofstee plots using fluorogenic substrate Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC. Although studied flavonoids display only a temperate furin inhibition, they may serve as a great potential for the future development of more potent non-peptide inhibitors against furin.

**Key words:** furin, inhibitors of furin, flavonoids, rutin, naringin, baicalin, methylhesperidin.

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. Molloy S. S., Bresnahan P. A., Leppla S. H. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 23. — P. 16396–16402.
5. Klimpel K. R., Molloy S. S., Thomas G., Leppla S. H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — **89**, N 21. — P. 10277–10281.
6. Tsuneoka M., Nakayama K., Hatsuzawa K. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 35. — P. 26461–26465.
7. Volchkov V. E., Feldmann H., Volchkova V. A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — **95**, N 10. — P. 5762–5767.
8. Hallenberger S., Bosch V., Angliker H. et al. // *Nature.* — 1992. — **360**, N 6402. — P. 358–361.
9. Walker J. A., Molloy S. S., Thomas G. et al. // *J. Virol.* — 1994. — **68**, N 2. — P. 1213–1218.
10. Khatib A.-M., Siegfried G., Chrétien M. et al. // *Amer. J. Pathol.* — 2002. — **160**, N 6. — P. 1921–1935.
11. Bergeron F., Leduc R., Day R. // *J. Mol. Endocrin.* — 2000. — **24**, N 1. — P. 1–22.
12. Basak A. // *J. Mol. Med.* — 2005. — **83**, N 11. — P. 844–855.
13. Basak A., Cooper S., Roberge A. G. et al. // *Biochem. J.* — 1999. — **338**, N 1. — P. 107–113.
14. Podsiadlo P., Komiyama T., Fuller R. S., Blum O. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, N 35. — P. 36219–36227.
15. Jiao G.-S., Cregar L., Wang J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**, N 52. — P. 19707–19712.
16. Worachartcheewan A., Nantasenamat C., Naenna T. et al. // *Europ. J. Med. Chem.* — 2008. — **44**, N 4. — P. 1664–1673.
17. Hosaka M., Nagahama M., Kim W.-S. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 19. — P. 12127–12130.
18. Komiyama T., Coppola J. M., Larsen M. J. et al. // *Ibid.* — 2009. — **284**, N 23. — P. 15729–15738.
19. Coppola J. M., Hamilton C. A., Bhojani M. S. et al. // *Analyt. Biochem.* — 2007. — **364**, N 1. — P. 19–29.
20. Dixon M. // *Biochem. J.* — 1953. — **55**, N 1. — P. 170–171.
21. Hatsuzawa K., Nagahama M., Takahashi S. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 23. — P. 16094–16099.
22. Fugère M., Day R. // *TRENDS Pharmacol. Sci.* — 2005. — **26**, N 6. — P. 294–301.

Получено 11.12.2009