

ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ПРОЛЕКАРСТВА НА ОСНОВЕ АМИКУМАЦИНА А

В. И. Шмыгарев¹, Ю. А. Прокопенко¹, С. С. Терехов¹, М. Ю. Захарова¹, М. А. Дубинный¹, И. В. Смирнов¹, И. В. Ямпольский^{1,2}, А. С. Царькова^{1,2} ✉¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Современная коронавирусная болезнь COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, характеризуется высокой контагиозностью и тяжелым течением. Оказание помощи пациентам с COVID-19 требует разработки новых видов противовирусных препаратов. Цель работы — разработать пролекарство для лечения коронавирусной болезни с применением антибиотика Амикумацин А (Аmi), механизм действия которого основан на ингибировании трансляции. Ферментативный гидролиз инактивированного пролекарства основной протеазой SARS-CoV-2 может привести к высвобождению активной молекулы Аmi и как следствие к подавлению биосинтеза белка в инфицированных клетках. Для проверки предложенной гипотезы был осуществлен пятистадийный синтез инактивированного аналога Амикумацина А, *in vitro* тестирование которого с рекомбинантной протеазой M^{Pro} SARS-CoV-2 показало низкий процент гидролиза. Дальнейшая оптимизация пептидного фрагмента инактивированного аналога, распознаваемого протеазой M^{Pro} SARS-CoV-2, возможно, приведет к повышению протеолиза и высвобождению Амикумацина А.

Ключевые слова: трансляция, ингибитор трансляции, противовирусные препараты, пролекарства, инактивированные производные Амикумацина**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1049.**Вклад авторов:** Ю. А. Прокопенко — наработка и выделение Амикумацина; В. И. Шмыгарев — полный синтез инактивированного аналога Амикумацина А; С. С. Терехов, М. Ю. Захарова — проведение *in vitro* экспериментов с протеазой M^{Pro}; М. А. Дубинный — ЯМР-спектроскопия и анализ данных; А. С. Царькова — анализ литературы, обработка данных, написание статьи; И. В. Ямпольский, И. В. Смирнов — общее руководство проектом.**Соблюдение этических стандартов:** работа проведена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.✉ **Для корреспонденции:** Александра Сергеевна Царькова
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; altsarkova@gmail.com**Статья получена:** 15.11.2022 **Статья принята к печати:** 20.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.073

AMICOUMACIN-BASED PRODRUG DEVELOPMENT APPROACH

Shmygarev VI¹, Prokopenko YuA¹, Terekhov SS¹, Zakharova MYu¹, Dubinnyi MA¹, Smirnov IV¹, Yampolsky IV^{1,2}, Tsarkova AS^{1,2} ✉¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Coronavirus disease COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, is highly contagious and has a severe morbidity. Providing care to patients with COVID-19 requires the development of new types of antiviral drugs. The aim of this work is to develop a prodrug for the treatment of coronavirus disease using the antibiotic Amicoumacin A (Ami), the mechanism of action of which is based on translation inhibition. Enzymatic hydrolysis of an inactivated prodrug by the SARS-CoV-2 main protease can lead to the release of the active Ami molecule and, as a consequence, the suppression of protein biosynthesis in infected cells. To test the proposed hypothesis, a five-stage synthesis of an inactivated analogue of Amicoumacin A was carried out. Its *in vitro* testing with the SARS-CoV-2 recombinant protease M^{Pro} showed a low percentage of hydrolysis. Further optimization of the peptide fragment of the inactivated analog recognized by the SARS-CoV-2 M^{Pro} protease may lead to an increase in proteolysis and the release of Amicoumacin A.

Keywords: translation, translation inhibitor, antiviral agents, prodrugs, inactivated amicoumacin derivatives**Funding:** the work was supported by the grant № 075-15-2021-1049 from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.**Author contribution:** Prokopenko YuA — production and isolation of Amikomacin; Shmygarev VI — complete synthesis of an inactivated analog of Amicoumacin A; Terekhov SS, Zakharova MYu — *in vitro* experiments with M^{Pro} protease; Dubinnyi MA — NMR spectroscopy and data analysis; Tsarkova AS — literature analysis, data processing, article writing; Yampolsky IV, Smirnov IV — general project management.**Compliance with ethical standards:** the work was carried out in compliance with the principles of the Helsinki Declaration of the World Medical Association.✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandra S. Tsarkova
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; altsarkova@gmail.com**Received:** 15.11.2022 **Accepted:** 20.12.2022 **Published online:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.073

Коронавирусная болезнь 2019 г. (COVID-19) вызвала катастрофические проблемы в системе здравоохранения и экономике во многих странах мира [1]. Хотя несколько вакцин эффективно замедлили распространение вируса SARS-CoV-2, их долгосрочная защита и эффективность против вариантов вируса все еще неясны [2–5]. Вспышки эпидемий вызванных коронавирусами в 2002 и 2012 г. послужили мощным толчком для фармацевтических и биотехнологических исследований, однако лишь в 2021 г. появились первые лекарственные кандидаты, успешно прошедшие клинические испытания [6, 7]. Несмотря на то что массовая вакцинация сильно снижает эффективность распространения и летальность вирусной инфекции, остающиеся высокими уровни заболеваемости

и смертности [8, 9] требуют разработки новых противовирусных препаратов для лечения COVID-19.

Привлекательной молекулярной мишенью для новых противовирусных препаратов является трансляционная машинария инфицированной клетки. В этом исследовании высокоэффективный трансляционный ингибитор Амикумацин А (Аmi), впервые выделенный из грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* [10], использовался для разработки пролекарства против SARS-CoV-2. Одним из подходов к направленной терапии коронавирусной инфекции может являться протеолитическая активация пролекарства на основе Аmi. Последовательность узнавания основной протеазы M^{Pro} позволяет использовать подходы таргетного

высвобождения активной молекулы Ami и последующего ингибирования трансляции. Целью исследования стала разработка инактивированного аналога Амикумацина А, представляющего собой многообещающий инструмент для создания лекарств, нацеленных на специфическое подавление трансляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спектры ЯМР (δ , м.д.; J, Гц) регистрировали на приборе Bruker Fourier 300 (300 МГц; США) и Bruker Avance I (700 МГц, США) при 303 К в CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$, внутренний стандарт — ТМС. Масс-спектры регистрировали на приборе Waters ACQUITY UPLC H-Class LC/MS System (Waters; США) методом электрораспылительной ионизации (ESI). Температуры плавления определяли на приборе SMP30 и не исправляли. Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh). Реактивы Acros Organics (Thermo Fisher Scientific; Бельгия) и SigmaAldrich (Merck; Германия) применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегранные растворители фирмы Химмед (Россия).

Синтез инактивированного производного Амикумацина А

Диметилловый эфир N-третбут оксикарбонил-L-глутаминовой кислоты (1)

В 75 мл метанола суспендировали 14,7 г (0,10 моль) L-глутаминовой кислоты и добавили прикапыванием 25 мл (0,20 моль) триметилсилилхлорида при комнатной температуре. Осадок постепенно растворился. Реакционную смесь оставили на ночь при комнатной температуре. На следующий день упарили растворитель. К остатку прибавили 75 мл метанола, 40 мл (0,3 моль) триэтиламина и 22 г (0,1 моль) ди-трет-бутилкарбоната. Оставили реакционную массу при комнатной температуре на сутки. Контроль методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) этилацетат : гексан — 1 : 1 ($R_f = 0,36$). Далее упарили растворитель, разбавили смесь 200 мл воды и экстрагировали 3×50 мл этилацетата. Органический слой промыли водой, 5%-ным раствором соляной кислоты, 5%-ным раствором поташа и снова водой. После высушивания над сульфатом натрия упарили растворитель. Получили 23 г продукта 1 в виде бесцветного вязкого масла, выход 85%.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 5.09(s, br, 1H), 4.32(s, br, 1H), 3.73(s, 3H), 3.67(s, 3H), 2.47-2.31(m, 2H), 2.24-2.10(m, 1H), 2.03-1.85(m, 1H), 1.43(9H, s).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ 173.2, 172.6, 155.3, 80.0, 52.9, 52.4, 51.8, 30.0, 28.3, 27.8

MS (EI): m/z, 276.2 [M+H⁺].

Диметил(2S, 4R)-2-[(трет-бутоксикарбонил)-амино]-(цианометил)пентандиоат (2)

К раствору 7,5 г (27,3 ммоль) диметилового эфира N-третбутоксикарбонил-L-глутаминовой кислоты (1) в 50 мл сухого тетрагидрофурана (ТГФ) при -80 °C добавили 60 мл (60 ммоль) 1M раствора LiHMDS в ТГФ. Выдержали реакционную массу при этой температуре

1 ч и далее медленно прибавили раствор 1,9 мл (27,3 моль) бромацетонитрила в 10 мл сухого ТГФ, так чтобы температура не поднималась выше -70 °C. Контроль ТСХ этилацетат : гексан — 1 : 1 ($R_f = 0,48$). Через 40 мин к смеси добавили 1M раствор HCl при -70 °C до нейтрального значения pH, затем упарили органический слой. Остаток растворили в 100 мл смеси вода-бензол (1 : 1). Органический слой упарили и хроматографировали остаток на силикагеле, элюент — петролейный эфир : этилацетат (3 : 1). Получили 5 г продукта 2 с выходом 58%.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 5.10(s, br, 1H), 4.38(s, br, 1H), 3.75(s, 3H), 3.74(s, 3H), 2.9-2.7(m, 3H), 2.25-2.05(m, 2H), 1.43(9H, s).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ 172.4, 172.0, 155.5, 117.1, 80.6, 52.7, 52.6, 51.0, 38.3, 33.9, 28.3, 19.0

MS (EI): m/z, 287.2 [M+H⁺].

Метил(2S)-2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3-[(3S)-2-оксипирролидин-3-ил]пропаноат (3)

В 40 мл метанола растворили 2 г (6,4 ммоль) цианметильного производного 2 и 0,83 г (6,4 ммоль) хлорида кобальта. При охлаждении до -10 °C порциями присыпали 2,2 г (57 ммоль) сухого боргидрида натрия. После каждой порции смесь приобретала черную окраску и затем снова светлела. Через сутки при комнатной температуре по данным масс-спектрометрии LC/MS реакция доходит до конца. Органический растворитель упарили, остаток суспендировали в этилацетате и пропустили через тонкий слой силикагеля, упарили растворитель и остаток хроматографировали на силикагеле, элюент — этилацетат ($R_f = 0,16$). Получили 1,0 г кристаллического вещества 3 с выходом 55% и т.пл. 114 °C

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 6.42(s, br, 1H), 5.54(d, 8.4 Hz, 1H), 4.30(m, 1H), 3.72(s, 3H), 3.37-3.27(m, 2H), 2.50-2.35(m, 2H), 2.15-2.05(m, 1H), 1.90-1.75(m, 2H), 1.42(9H, s).

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ 179.7, 172.9, 155.7, 79.9, 52.4, 52.3, 40.3, 38.1, 34.1, 28.3, 28.1

MS (EI): m/z, 315.3 [M+H⁺].

Метил(2S)-2-[[2-(бензилоксикарбониламино)-4-метилпентаноил]амино]-3-[(3S)-2-оксипирролидин-3-ил]пропаноат (4)

В 0,3 мл хлористого метилена растворили 30 мг (0,104 ммоль) эфира 3 и прибавили 0,2 мл трифторуксусной кислоты. Через 30 мин при комнатной температуре по ТСХ происходит исчезновение исходного вещества. Трифторуксусную кислоту упарили на роторном испарителе. Полученную трифторацетатную соль растворили в 1 мл хлористого метилена, прибавили 33 мг (0,13 ммоль) Cbz-L-лейцина, 40 мг (0,13 ммоль) TBUTU, 15 мг (0,13 ммоль) N-гидроксibenзотриазола и охладили до 0 °C. В реакционную смесь добавили 0,11 мл (0,62 ммоль) диизопропилэтиламина. Смесь выдержали в холодильнике в течение ночи. Обработали реакционную массу смесью раствора поташа и этилацетатом, органический слой промыли водой и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент хлороформ: метанол 95/5 ($R_f = 0,14$). Получили 30 мг продукта 4 в виде желтоватого вязкого масла, выход 66%.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7.96 (d, 7.0 Hz, 1H), 7.40-7.21(m, 5H), 6.64 (s, 1H), 5.56(d, 9.0, 1H), 5.07(s, 2H), 4.54-4.30 (m, 2H), 3.70(s, 3H), 3.36-3.18(m, 2H), 2.47-2.27(m, 2H), 2.26-2.11(m, 1H), 1.82-1.59(m, 4H), 1.57-1.43(m, 1H), 0.95(d, 6.1 Hz, 6H)

Таблица 1. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C целевого соединения 5. DMSO- d_6 , 700 МГц. Нумерация атомов показана на рис. 2.

Ост.	Атом	^1H , м.д.	^{13}C , м.д.	Ост.	Атом	^1H , м. д.	^{13}C , м. д.
Ami	3	4.694	81.52	Leu	NH	7.428	–
	4	2.856	29.53		2	4.037	53.73
		3.083			3	1.449	40.96
	5	6.819	118.92		4	1.608	24.69
	6	7.478	136.71		5	0.838	21.88
	7	7.411	115.69		6	0.858	23.45
	1'	0.872	22.09	CG	NH	8.032	–
	2'	0.918	23.76		2	4.312	51.37
	3'	1.683	24.48		3	1.535	34.25
	4'	1.365	39.57			1.959	
		1.688			4	2.248	37.39
	5'	4.213	48.60		5	1.645	27.71
	6'-NH	7.782	–			2.097	
	8'	3.845	72.32		6	3.035	39.91
9'	3.609	74.25	3.106				
10'	4.264	48.31	7-NH		7.558	–	
10'-NH	7.805	–	Cbz	1	5.023	65.80	
	11'	2.326		35.25	3,7	7.342	128.00
2.448		4,6			7.358	128.40	
				5	7.308	128.16	

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl_3) δ 179.9, 173.0, 172.2, 156.1, 136.3, 128.5, 128.1, 127.9, 66.8, 53.3, 52.4, 51.4, 42.4, 40.5, 38.3, 32.9, 28.1, 24.6, 22.9, 22.1.

MS (EI): m/z, 434.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Бензил(1-(((S)-1-(((3S,4S,5S)-1-амино-4,5-дигидрокси-6-(((S)-1-((S)-8-гидрокси-1-оксихроман-3-ил)-3-метилбутил)амино)-1,6-диоксогексан-3-ил)амино)-1-оксо-3-((S)-2-оксопирролин-3-ил)пропан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)карбамат (5)

Растворили 4 мг (9 мкмоль) эфира дипептида 4 в 0,1 мл метанола и прибавили 0,02 мл (20 мкмоль) 1М раствора LiOH в воде. Через 1 ч при комнатной температуре по данным LCMS реакция прошла. Нейтрализовали смесь 0,02 мл 1М раствора соляной кислоты, упарили растворители на роторном испарителе. Полученную кислоту растворили в 0,1 мл ДМФА, прибавили 3 мг (6 мкмоль) трифторацетата Амикумацина А, 3,8 мг (11,7 мкмоль) TBVTU, 6,2 мг (6 мкмоль) N-гидроксибензотриазола и охладили до 0 °С. К реакционной массе прибавили 0,01 мл (54 мкмоль) диизопропилэтиламина. Через сутки реакционную смесь разбавили водой и экстрагировали этилцетатом, после упаривания органического растворителя продукт выделили препаративной ТСХ на силикагеле, элюент этилацетат: метанол 85/15 ($R_f = 0,3$). Получили 0,5 мг продукта 5 в виде смеси диастереомеров (3:1). Выход составил 10%.

^1H и ^{13}C ЯМР DMSO- d_6 : см. табл. 1.

MS (EI): m/z, 825,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Наработка и выделение Амикумацина А

В исследовании использовали штамм *Bacillus pumilus* ВКМ В-3464D (Патент RU2737856С1) [11], альтернативное название *Bacillus pumilus* strain 124, GenBank: QENN00000000.1, изолированный в 2017 г. [12]. *B. pumilus* (GenBank: QENN00000000.1), продуцирующий Ami,

культивировали при 28 °С в среде SYC, содержащей 40 г/л сахарозы, 5 г/л дрожжевого экстракта, 4 г/л CaCO_3 , 1,5 г/л K_2HPO_4 , 2 г/л глюкозы, 2 г/л NaCl, 1,5 г/л MgSO_4 , 2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 г/л FeSO_4 , 0,01 г/л MnCl_2 . *B. pumilus* инокулировали из ночной культуры (используя разведение 1 : 100) и культивировали в колбах на 750 мл в 100 мл среды на термостатируемой качалке с интенсивностью качания 250 об./мин. Клетки центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин, а супернатант фильтровали с использованием фильтра Millistak + HC Pod Depth Filter (Millipore, Billerica; США).

Выделение Ami включало три хроматографических стадии. На первом этапе супернатант очищали методом твердофазной экстракции с сорбентом LPS-500 («Техносорбент»; Россия) на колонке XK 26 (GE Healthcare Life Sciences; США) с использованием буфера А (10 mM NH_4OAc , pH 5.0, 5% ACN), буфер В (10 mM NH_4OAc , pH 5.0, 80% ACN), скорость потока 6 мл/мин, ступенчатый градиент 0–10 мин (0% В), 10–20 мин (20% В), 20–36 мин (40% В) и 36–45 мин (100% В). Фракции, содержащие Ami (40% В), лиофилизировали, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и дважды фракционировали на колонке RP-HPLC Zorbax ODS 62 × 250 мм (Agilent; США) с использованием буфера А и В, скорость потока 5 мл/мин, градиент 0–10 мин (0% В), 10–24 мин (0–70% В), 24–25 мин (70–100% В). Наконец, Ami очищали на колонке Symmetry C18 5 мкм 4,6 × 150 мм (Waters; США) RP-HPLC с использованием буфера А и В, скорость потока — 1 мл/мин, градиент — 0–5 мин (0% В), 5–20 мин (0–100% В). Мониторинг Амикумацина А контролировали по поглощению при 315 нм. Концентрацию Ami измеряли с использованием $\epsilon_{\text{MeOH}, 315\text{нм}} = 4380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Экспрессия и очистка протеазы

Кодон-оптимизированная последовательность гена, кодирующего полноразмерный M^{Pro} SARS-CoV-2,

слитого с последовательностью 6×His на С-конце и с белком GST на N-конце в плазмиде pGEX6p [13], был любезно предоставлен профессором Рольфом Хильгенфельдом. Кодированный M^{Pro} ген был фланкирован последовательностями двух протеазных сайтов для последующего процессирования полноразмерной M^{Pro}: сайт узнавания M^{Pro} для автопроцессинга (на N-конце последовательности) и сайт протеазы PreScission™ непосредственно перед 6×His для его удаления, как описано ранее [13]. Полноразмерный белок M^{Pro} был получен в клетках *E. coli* BL21(DE3) и очищен в соответствии с методикой [13]. Белок GST-M^{Pro} самопроцессировался во время экспрессии. M^{Pro}-His очищали с помощью металл-хелатной хроматографии с использованием сорбента TALON (Clontech; США) и обрабатывали PreScission™ Pro (соотношение M^{Pro} и PreScission как 100:1) на 48 ч при 4 °C для удаления 6×His и получения M^{Pro} с интактным С-концом. Смесь M^{Pro} с PreScission™ Pro была очищена с использованием сорбентов GST-Sepharose (Amersham Biosciences, Германия) и TALON (Clontech; США) IMAC. Вестерн-блот анализ с использованием антител к 6×His показал, что последовательность 6×His была полностью удалена. M^{Pro} концентрировали до 10 мг/мл в 50 мМ Трис-HCl pH 7.5.

Анализ активации пролекарства Cbz-Leu-CG-Ami протеазой M^{Pro}

Удельная активность M^{Pro} была оценена с использованием FRET-субстрата (FRET-S), DabcyI-KTSAVLQ↓SGFRKM-E(Edans)-NH₂ (BPS Bioscience, США) и соответствовала чистому препарату M^{Pro} [14]. Протеолиз пролекарства проводили в присутствии 0.1–1 мкМ M^{Pro} в реакционном буфере (20 мМ Tris-HCl pH 7.3, 100 мМ NaCl, 1.0 мМ ЭДТА и 1.0 мМ DTT) с использованием 10 мкМ Cbz-Leu-CG-Ami при температуре 30 °C. Продукты реакции анализировали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ, согласно описанной ранее методике [15]. Амикумацин А и его производные детектировали по поглощению при длине волны 315 нм. Концентрацию оценивали с использованием стандарта Ami, $\epsilon_{\text{MeOH}}^{315\text{nm}} = 4380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Оценка клеточной цитотоксичности

Цитотоксичность оценивали с помощью МТТ-теста с использованием и клеточной линии HEK-293 (ATCC; США). Клетки A549 высевали в количестве 2×10^5 кл./лунка в 96-луночный микропланшет в среду DMEM (Gibco, Invitrogen; США) с 2 мМ L-глутамин (Invitrogen; США), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США) и инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 ч. После инкубации среду удаляли. Затем клетки обрабатывали свежей средой, содержащей варьируемые концентрации Амикумацина А и аналога Cbz-Leu-CG-Ami в диапазоне 0,01–50 мкг/мл в течение 48 ч. После этой процедуры среду удаляли и клетки обрабатывали в течение 2 ч реагентом МТТ (концентрация 2,5 мг/мл). Живые клетки превращали МТТ в формазан, приобретающий синевато-фиолетовый цвет при растворении в ДМСО. Раствор удаляли и добавляли 200 мкл ДМСО для растворения формазана. Оптическое поглощение обработанных клеток и контрольных (необработанных) клеток измеряли при 570 нм с использованием планшетного ридера Varioskan Flash (Thermo Fischer Scientific; США). Выживаемость

оценивали как отношение оптической плотности обработанных клеток к контрольным, измеренной в каждом эксперименте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения пептида, имитирующего сайт узнавания протеазы M^{Pro} [16], был синтезирован аналог глутамин (циклоглутамин) 3 в четыре стадии с общим выходом 27% из глутаминовой кислоты [17, 18]. Алкилирование диэфира глутаминовой кислоты 1 протекает стереоселективно, однако наблюдается неполная конверсия исходного диэфира (рис. 1). Продукт реакции 2 очищали колоночной хроматографией на прямой фазе. Восстановление нитрила проводили боргидридом натрия в метаноле при –10 °C. В процессе восстановления в результате конкурирующей реакции происходит димеризация 2 с образованием вторичного амина (~15–20%), который легко отделяется при хроматографической очистке.

После снятия Вос-группы с 3, последующего ацилирования в присутствии конденсирующего агента TBTU [16] Cbz-лейцином и гидролиза сложного эфира был получен дипептид 4, содержащий метильную защитную группу на карбоксильном фрагменте (рис.1).

Амикумацин А является особенно мощным ингибитором трансляции как у про-, так и у эукариот [19, 20]. В природе Ami продуцируется пробиотическими штаммами *Bacillus pumilus* [10, 12], опосредующими их противомикробную активность. Для данного исследования Амикумацин А был получен наработкой в бактериях *B. pumilus* по методу, описанному ранее [21].

На заключительной стадии синтеза после количественного удаления метильной защиты раствором щелочи в воде дипептид 4 без дополнительной очистки был введен в конденсацию с Амикумацином А в присутствии TBTU (рис. 1). Целевой продукт Cbz-Leu-CG-Ami 5 очищенный методом препаративного ТСХ был получен в виде смеси диастереомеров (3 : 1). Для целевого продукта 5 были зарегистрированы спектры ЯМР 1D ¹H, 2D ¹³C-HSQC (с редактированием спектра в соответствии с мультиплетностью сигналов) и 2D TOCSY (Bruker Avance I 700 МГц). Анализ спектров ЯМР позволил выделить спиновые системы и после сравнения со спектрами двух исходных фрагментов (Амикумацина А и дипептида 4) однозначно отнести химические сдвиги протонов и связанных с ними через одну химическую связь атомов ¹³C (табл. 1 и рис. 2). Модификация Амикумацина А по 10'-NH₂ привела к изменению химических сдвигов атома углерода 10' (-2.56 м.д.) и соседних атомов 9' и 11' (+1.52 и +1.57 м.д. соответственно).

В результате был синтезирован инактивированный аналог Ami 5 для последующего тестирования на возможную активацию полученного соединения протеазой M^{Pro} SARS-CoV-2. В отличие от исходного Амикумацина А, обладающего высокоэффективным антипролиферативным действием (IC₅₀ = 0,06 ± 0,02 мкг/мл) [19, 22], модифицированное производное Cbz-Leu-CG-Ami 5 не ингибировало рост клеток вплоть до повышения концентрации 50 мкг/мл. Несмотря на то что последовательность пептида Cbz-Leu-CG позволяет высокоэффективно осуществлять таргетирование M^{Pro} [16], молекула Cbz-Leu-CG-Ami была стабильна в присутствии протеазы M^{Pro}. Было показано, что менее 3% свободного Амикумацина А может быть высвобождено в присутствии 1 мкМ M^{Pro} ([S]/[E]=10–100) в течение 4 ч.

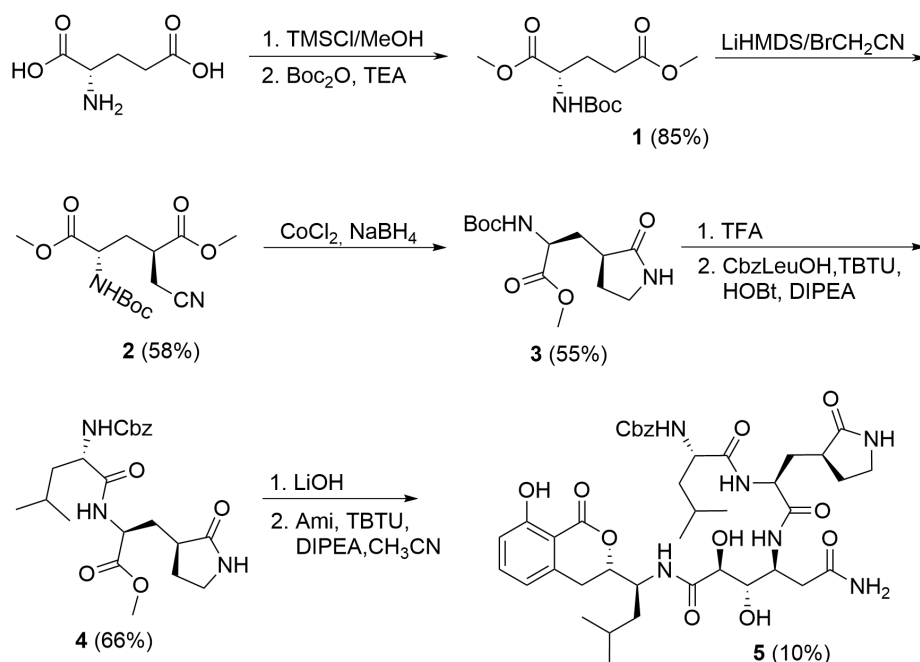


Рис. 1. Полный синтез целевого инактивированного Амикумацина 5

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление COVID-19 в 2019 г. поставило перед специалистами здравоохранения задачи, связанные с быстрой диагностикой и оказанием медицинской помощи больным. В настоящее время большинство препаратов, используемых для терапии COVID-19, неспецифичны, имеют большое число серьезных побочных эффектов и применимы только в экстренных случаях [23]. Лишь два SARS-CoV-2-специфичных лекарственных кандидата успешно прошли клинические испытания [6, 7], один из которых нашел сегодня применение в лекарственном препарате нирматрелвир [23]. В настоящее время продолжается интенсивное изучение клинических и эпидемиологических особенностей коронавирусного заболевания, разработка новых средств его профилактики и лечения.

Результаты оценки клеточной цитотоксичности полученного в настоящем исследовании конъюгата Cbz-Leu-CG-Ami 5 на клеточной линии HEK-293 показывают снижение IC₅₀ инактивированного амикумацина на несколько порядков по сравнению с исходным Ami, что говорит о том, что, несмотря на высокую эффективность природного Амикумацина А в ингибировании эукариотической трансляции, на его основе могут быть созданы инактивированные аналоги, последующая специфическая активация которых позволит осуществлять направленное терапевтическое воздействие. Однако скорость протеолиза синтетического производного Cbz-Leu-CG-Ami более чем на четыре порядка ниже скорости протеолиза, характерной для природных субстратов, что свидетельствует о необходимости дальнейшей оптимизации полученной молекулы. Введение заместителей в P1'-положение является критичным для

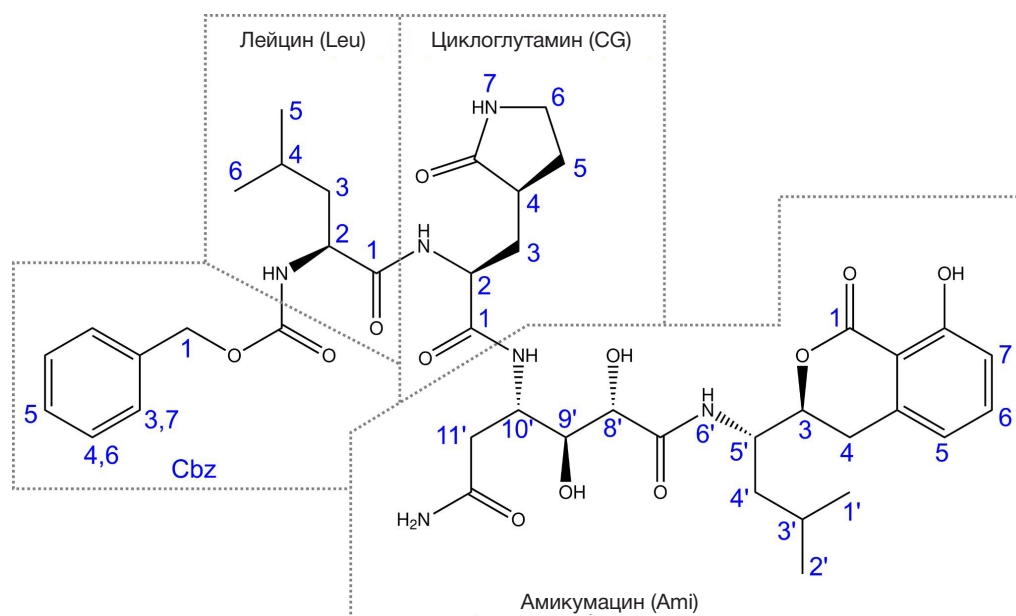


Рис. 2. Нумерация атомов соединения 5 в таблице 1

функционирования многих протеаз, что, по-видимому, характерно и для M^{Pro} и требует дополнительного введения адаптерных последовательностей.

ВЫВОДЫ

Разработка лекарственных препаратов, нацеленных на специфические клеточные мишени и механизмы, лежит в основе успешного лечения вирусных заболеваний. В представленной работе предложена разработка нового инактивированного аналога природного ингибитора биосинтеза белка Амикумацина А, модифицированного

пептидной последовательностью Cbz-Leu-CG, узнаваемой основной протеазой M^{Pro} вируса SARS-CoV-2. Исследование способности синтетического аналога Ami к активации основной протеазой SARS-CoV-2 выявило принципиальную возможность создания пролекарства с указанным принципом действия, однако наблюдавшийся низкий уровень гидролиза свидетельствует о необходимости дальнейшей модификации полученной молекулы. Оптимизация структуры и увеличение активности новых аналогов Амикумацина А представляют, на наш взгляд, перспективный подход для разработки лекарственных кандидатов для лечения COVID-19.

Литература

- Kolahchi Z, De Domenico M, Uddin LQ, Cauda V, Grossmann I, Lacasa L, et al. COVID-19 and Its Global Economic Impact. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1318: 825–37.
- Marabotti C. Efficacy and effectiveness of covid-19 vaccine — absolute vs. relative risk reduction. *Expert Rev Vaccines.* 2022; 21 (7): 873–75.
- Olliaro P, Torreele E, Vaillant M. COVID-19 vaccine efficacy and effectiveness—the elephant (not) in the room. *The Lancet Microbe.* 2021; 2 (7): e279–e280.
- Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021; 397 (10269): 72–74.
- Jones I, Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 642–3.
- Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science.* 2021; 374: 1586–93.
- de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CL^{pro} inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol.* 2021; 95 (10): e01819–20.
- Saban M, Kaim A, Myers V, Wilf-Miron R. COVID-19 Vaccination, Morbidity, and Mortality During a 12-Month Period in Israel: Can We Maintain a “Herd Immunity” State? *Popul Health Manag.* 2022; 25 (5): 684.
- Stepanova M, Lam B, Younossi E, Felix S, Ziayee M, Price J, et al. The impact of variants and vaccination on the mortality and resource utilization of hospitalized patients with COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2022; 22: 702.
- Itoh J, Omoto S, Shomura T, Nishizawa N, Miyado S, Yuda Y, et al. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1981; 34 (5): 611–3.
- Терехов С. С., Мокрушина Ю. А., Смирнов И. В., Габиров А. Г. Штамм *Bacillus pumilus*, продуцирующий антибиотик широкого спектра действия амикумацин. RU2737856C1, 2020. Доступно по ссылке: <https://patents.google.com/patent/RU2737856C1/en?q=RU2737856C1>.
- Terekhov SS, Smirnov IV, Malakhova MV, Samoilov AE, Manolo AI, Nazarov AS, et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115 (38): 9551–6.
- Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science.* 2020; 368 (6489): 409–12.
- Zakharova MY, Kuznetsova AA, Uvarova VI, Fomina AD, Kozlovskaya LI, Kaliberda EN, et al. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral Drug Discovery. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 3243.
- Baranova MN, Kudzhaev AM, Mokrushina YA, Babenko VV, Kornienko MA, Malakhova MV, et al. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (3): 1168.
- Vuong W, Khan MB, Fischer C, Arutyunova E, Lamer T, Shields J, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun.* 2020; 11: 4282.
- Schädel N, Icik E, Martini M, Altevogt L, Ramming I, Greulich A, et al. Synthesis of Imidazole and Histidine-Derived Cross-Linkers as Analogues of GOLD and Desmosine. *Synthesis (Stuttg).* 2021; 53 (13): 2260–8.
- Mou K, Xu B, Ma C, Yang X, Zou X, Lü Y, et al. Novel CADD-based peptidyl vinyl ester derivatives as potential proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; 18 (6): 2198–202.
- Prokhorova IV, Akulich KA, Makeeva DS, Osterman IA, Skvortsov DA, Sergiev PV, et al. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci Rep.* 2016; 6: 27720.
- Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, et al. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation. *Front Microbiol.* 2021; 12: 618857.
- Terekhov SS, Nazarov AS, Mokrushina YA, Baranova MN, Potapova NA, Malakhova MV, et al. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of the antibiotic amicoumacin. *Antibiotics.* 2020; 9: 157.
- Terekhov SS, Mokrushina YA, Nazarov AS, Zlobin A, Zalevsky A, Bourenkov G, et al. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. *Sci Adv.* 2020; 6 (26): eaaz9861.
- Therapeutics and COVID-19: living guideline, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Dec 19]. Available from: <https://app.magicapp.org/#/guideline/nBkO1E/section/nYlJyL>.

References

- Kolahchi Z, De Domenico M, Uddin LQ, Cauda V, Grossmann I, Lacasa L, et al. COVID-19 and Its Global Economic Impact. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1318: 825–37.
- Marabotti C. Efficacy and effectiveness of covid-19 vaccine — absolute vs. relative risk reduction. *Expert Rev Vaccines.* 2022; 21 (7): 873–75.
- Olliaro P, Torreele E, Vaillant M. COVID-19 vaccine efficacy and effectiveness—the elephant (not) in the room. *The Lancet Microbe.* 2021; 2 (7): e279–e280.
- Knoll MD, Wonodi C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet.* 2021; 397 (10269): 72–74.
- Jones I, Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397 (10275): 642–3.
- Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M,

- Berritt S, et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 2021; 374: 1586–93.
7. de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, et al. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol*. 2021; 95 (10): e01819–20.
 8. Saban M, Kaim A, Myers V, Wilf-Miron R. COVID-19 Vaccination, Morbidity, and Mortality During a 12-Month Period in Israel: Can We Maintain a “Herd Immunity” State? *Popul Health Manag*. 2022; 25 (5): 684.
 9. Stepanova M, Lam B, Younossi E, Felix S, Ziayee M, Price J, et al. The impact of variants and vaccination on the mortality and resource utilization of hospitalized patients with COVID-19. *BMC Infect Dis*. 2022; 22: 702.
 10. Itoh J, Omoto S, Shomura T, Nishizawa N, Miyado S, Yuda Y, et al. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong antiinflammatory and antiulcer activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1981; 34 (5): 611–3.
 11. Terekhov SS, Mokrushina YuA, Smirnov IV, Gabibov AG. *Bacillus pumilus* strain producing wide-spectrum antibiotic Amikumacin. RU2737856C1, 2020. <https://patents.google.com/patent/RU2737856C1/en?q=RU2737856C1>.
 12. Terekhov SS, Smirnov IV, Malakhova MV, Samoilov AE, Manolo AI, Nazarov AS, et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115 (38): 9551–6.
 13. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020; 368 (6489): 409–12.
 14. Zakharova MY, Kuznetsova AA, Uvarova VI, Fomina AD, Kozlovskaya LI, Kaliberda EN, et al. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 3243.
 15. Baranova MN, Kudzhaev AM, Mokrushina YA, Babenko VV, Kornienko MA, Malakhova MV, et al. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (3): 1168.
 16. Vuong W, Khan MB, Fischer C, Arutyunova E, Lamer T, Shields J, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun*. 2020; 11: 4282.
 17. Schädel N, Icik E, Martini M, Altevoigt L, Ramming I, Greulich A, et al. Synthesis of Imidazole and Histidine-Derived Cross-Linkers as Analogues of GOLD and Desmosine. *Synthesis (Stuttg)*. 2021; 53 (13): 2260–8.
 18. Mou K, Xu B, Ma C, Yang X, Zou X, Lü Y, et al. Novel CADD-based peptidyl vinyl ester derivatives as potential proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18 (6): 2198–202.
 19. Prokhorova IV, Akulich KA, Makeeva DS, Osterman IA, Skvortsov DA, Sergiev PV, et al. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome. *Sci Rep*. 2016; 6: 27720.
 20. Maksimova EM, Vinogradova DS, Osterman IA, Kasatsky PS, Nikonov OS, Milón P, et al. Multifaceted Mechanism of Amicoumacin A Inhibition of Bacterial Translation. *Front Microbiol*. 2021; 12: 618857.
 21. Terekhov SS, Nazarov AS, Mokrushina YA, Baranova MN, Potapova NA, Malakhova MV, et al. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of the antibiotic amicoumacin. *Antibiotics*. 2020; 9: 157.
 22. Terekhov SS, Mokrushina YA, Nazarov AS, Zlobin A, Zalevsky A, Bourenkov G, et al. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. *Sci Adv*. 2020; 6 (26): eaaz9861.
 23. Therapeutics and COVID-19: living guideline, Geneva: World Health Organization c2022 [cited 2022 Dec 19]. Available from: <https://app.magicapp.org/#/guideline/nBkO1E/section/nYIJyL>.