

УДК 577.217.347;577.112.6;577.182.46;004.942

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ХЛОРАМФЕНИКОЛА С РИБОСОМОЙ

© 2020 З.З. Хайруллина<sup>1#</sup>, А.Г. Терещенков<sup>2#</sup>, С.А. Завьялова<sup>3</sup>, Е.С. Комарова<sup>4,5</sup>, Д.А. Лукьянов<sup>5</sup>, В.Н. Ташлицкий<sup>1</sup>, И.А. Остерман<sup>1,5</sup>, Н.В. Сумбатьян<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: [sumbtyan@belozersky.msu.ru](mailto:sumbtyan@belozersky.msu.ru)

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия

<sup>5</sup> Сколковский институт науки и технологий, 143025 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.07.2020

После доработки 07.09.2020

Принята к публикации 09.09.2020

На основе молекулярного докинга проведен виртуальный скрининг всех возможных трипептидных аналогов хлорамфеникола по их аффинности к бактериальной рибосоме. Осуществлен синтез пептидных производных хлорамфениколамина, показавших минимальные расчетные значения энергии взаимодействия с рибосомой. Синтетическим путем получены производные хлорамфениколамина, содержащие в структуре фрагменты антимикробных пролин-богатых пептидов. По вытеснению флуоресцентно-меченного эритромицина из его комплексов с рибосомами показано, что синтезированные пептидные аналоги хлорамфеникола способны связываться с бактериальными рибосомами, все расчетные трипептидные аналоги хлорамфеникола и один из аналогов, содержащий характерный фрагмент из структуры пролин-богатых антимикробных пептидов, проявили аффинность к рибосомам *Escherichia coli*, значительно превышающую таковую исходного антибиотика. Установлено наличие корреляции между рассчитанными и экспериментально полученными значениями эффективности лигандов. В экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* показано, что аналог RAW-SAM проявляет активность близкую к хлорамфениколу, что подтверждается данными химического пробинга, указывающими на то, что по характеру связывания в рибосомном туннеле этот аналог сходен с немодифицированным хлорамфениколом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рибосома, хлорамфеникол, пептидные производные, молекулярный докинг, антимикробные пептиды, рибосомный туннель.

DOI: 10.31857/S0320972520110123

### ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия с появлением рентгеноструктурных данных и возможностью создания атомных моделей комплексов рибосом с субстратами и белковыми факторами трансляции начался новый этап в изучении механизмов трансляции и её регуляции [1–3].

Важными структурными элементами рибосомы являются пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), катализирующий синтез полипептида, и рибосомный туннель (РТ), обеспечивающий выход синтезируемой цепи из рибосомы [4–6]. Стенки РТ участвуют в мониторинге аминокислотной последовательности перемещающегося вдоль них полипептида [4, 7, 8]. В РТ и ПТЦ

Принятые сокращения: Вос – трет-бутилоксикарбонил; BODIPY – 5,7-диметил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-9-индацен-3-пентановая кислота; SAM – хлорамфениколамин; CHL – хлорамфеникол; DIC – 1,3-диизопропилкарбодимид; DIPEA – диизопропилэтиламин; DMS – диметилсульфат; ERY – эритромицин; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; LC-MS – хромато-масс-спектрометрия; MALDI TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией методом матричной десорбции; ONC – онкоцин112 (VDKPPYLPRPRPPRrYNg-NH<sub>2</sub>); P – 2-хлортритильный полимер; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; Pip – пиперидин; TFA – трифторуксусная кислота; ДМФА – N,N-диметилформамид; ПбАМП – пролин-богатые антимикробные пептиды; ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; РТ – рибосомный туннель; Реагент К – TFA/фенол/вода/тиоанизол/β-меркаптоэтанол = 82,5/5/5/2,5, v/v.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в исследование.

расположены сайты связывания многих антибиотиков, действие которых связано с подавлением процесса бактериальной трансляции, и, как следствие этого, модификация нуклеотидных остатков рРНК и аминокислотных остатков белков, формирующих стенки РТ, приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам [9–13]. РТ представляет собой динамическую систему, где осуществляются специфические взаимодействия между пептидной цепочкой, антибиотиками и определенными структурными элементами рибосомы, воздействуя на её функционирование в ряде случаев аллостерически [13–15].

Не так давно было показано, что элементы РТ способны взаимодействовать не только с вновь синтезируемой пептидной цепью, но и с некоторыми антимикробными пептидами, которые попадают в него извне [16–20]. Эти антибактериальные пептиды относятся к классу пролин-богатых пептидов (ПБАМП), последовательности которых обогащены содержанием остатков аргинина, вследствие чего эти пептиды также являются и катионными [21]. Механизм действия ПБАМП определяется тем, что пептиды связываются в РТ бактерий, при этом, как правило, их ориентация противоположна ориентации синтезируемой рибосомой полипептидной цепи – N-конец располагается вблизи ПТЦ, а С-конец направлен к выходу из РТ, полностью его блокируя. Область связывания ПБАМП в РТ перекрывается с сайтами связывания большинства рибосомных антибиотиков, в частности хлорамфеникола, нацеленных на большую субъединицу рибосомы.

Необходимым условием проявления ингибирующих биосинтез белка свойств соединениями, нацеленными на бактериальную рибосому, является их способность связываться с рибосомой в каком-либо функциональном центре. Однако не всегда высокая аффинность, например синтетических аналогов антибиотиков, приводит к их высокой ингибирующей активности [22, 23]. Так, среди пептидных и аминокислотных аналогов хлорамфеникола были найдены соединения, проявляющие сродство к рибосомам на уровне исходного антибиотика, а в некоторых случаях и значительно превышающее таковое, и в то же время не воздействующих или слабо воздействующих на процесс трансляции [23, 24].

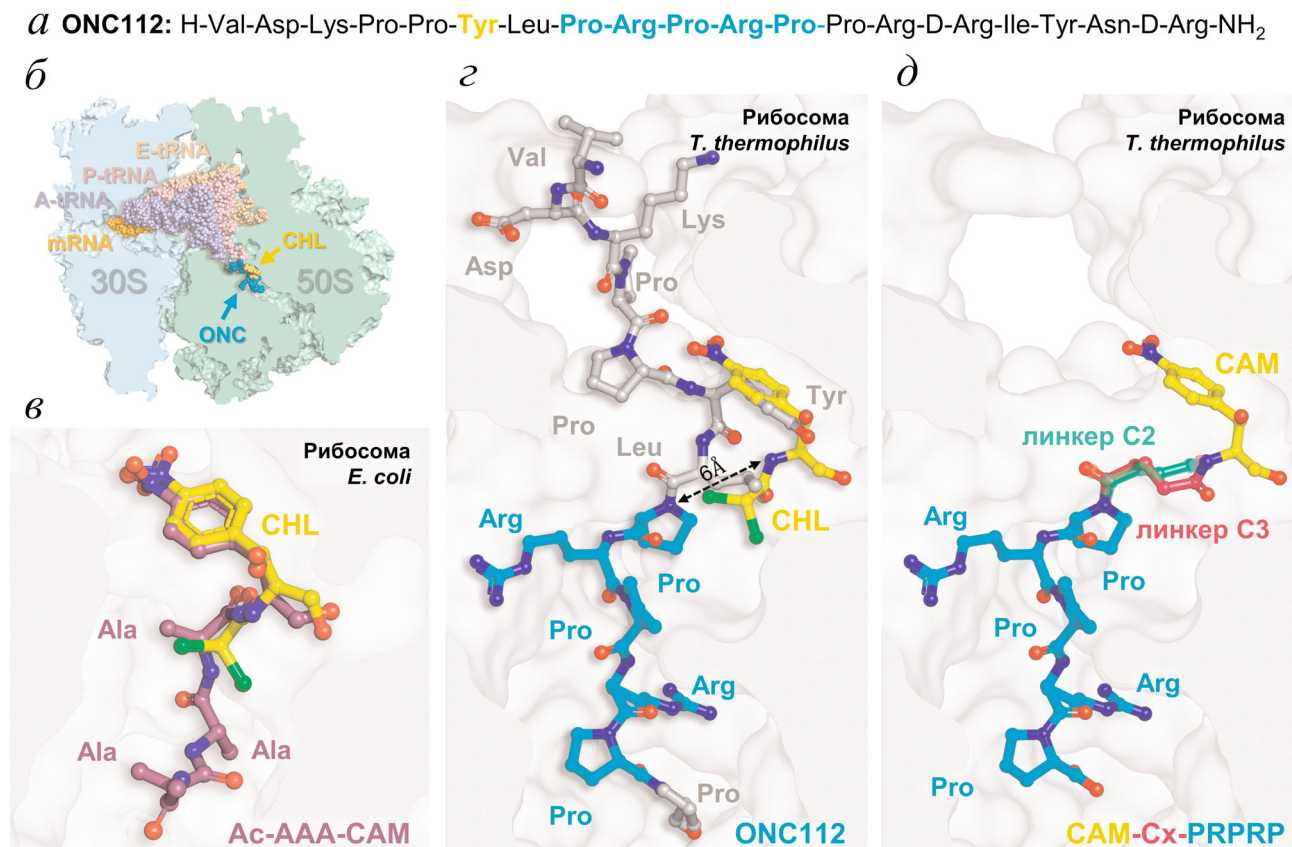
В настоящей работе с целью выявления взаимодействий и свойств, значимых для проявления аффинности к рибосоме и ингибирующей трансляцию активности, осуществлен дизайн, синтез и изучение взаимодействий с рибосомой новых пептидных аналогов хлорамфеникола.

Структуры пептидных аналогов хлорамфеникола были выбраны с использованием метода молекулярного докинга с помощью двух подходов (рис. 1, а–д). Первый представлял виртуальный скрининг всех возможных трипептидных производных хлорамфениколамина, моделирующих 3'-концевую область пептидил-тРНК. Второй заключался в моделировании аналогов, в которых дихлорацетильный фрагмент хлорамфеникола заменен на короткие последовательности, характерные для ряда природных антимикробных пептидов: онкоцинов, металниковина, бактеницина и их активных синтетических аналогов [25, 26]. В работе измерены константы диссоциации комплексов полученных соединений с рибосомами *Escherichia coli*; в экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* найдены активные аналоги; методом химического пробинга показано взаимодействие аналогов с нуклеотидами, образующими РТ; с помощью молекулярного докинга предсказаны возможные модели взаимодействия новых соединений с рибосомой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реагенты и растворители: хлорамфеникол («Sigma», Китай), производные L-аминокислот и носитель для твердофазного синтеза, содержащий 2-хлортритилхлоридную группировку (2СТС Resin, «Iris Biotech», Германия), DCC (1,3-дициклогексилкарбодиимид), DIPEA (диизопропилэтиламин), НВТУ (О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфат), НОВт (1-гидроксibenзотриазол), N-гидроксисукцинимид, тиоанизол, 9-флуоренилметанол, янтарный ангидрид («Sigma-Aldrich», США, Швейцария, Япония), глутаровый ангидрид («ТСI», Япония), DIC (1,3-диизопропилкарбодиимид, «J&K Scientific», США), β-меркаптоэтанол («Ferak Berlin», Германия), TFA и абсолютные растворители: изопропанол, диоксан, ДМФА (N,N-диметилформамид) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> («PanReac AppliChem», США), а также растворители российского производства фирм «Химмед» и «Иреа2000». Флуоресцентное производное эритромицина BODIPY-ERY было синтезировано по известной методике [27], Arg(Pbf)-SAM [24] и N-гидроксисукцинимидный эфир уксусной кислоты получали, как описано ранее [28].

**Хроматография.** ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 («Merck», Германия); для *колоночной хроматографии* использовали Silica gel 60 (0,063–0,200 мм и 0,04–0,063 мм,



**Рис. 1.** Связывание хлорамфеникола, онкоцина112 и их производных с бактериальной рибосомой. *a* – Аминокислотная последовательность антимикробного пептида онкоцина112. Желтым выделена аминокислота, попадающая в сайт связывания хлорамфеникола, голубым – пептидная последовательность, предложенная для модификации хлорамфеникола. *б* – Схематичное отображение сайтов связывания хлорамфеникола (CHL, желтый) и онкоцина (ONC112, голубой) с рибосомой *Thermus thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [16]. *в* – Наложение структуры комплекса хлорамфеникола (желтый) с рибосомой *E. coli* (PDB ID: 4V7T) [15] и структуры пептидного аналога хлорамфеникола Ac-AAA-CAM (4а) (фиолетовый), полученной методом молекулярного докинга. *г* – Наложение структуры комплекса хлорамфеникола (желтый, PDB ID: 6ND5 [38]) и онкоцина (серый и голубой, PDB ID: 4Z8C [16]) с рибосомой *T. thermophilus*. Голубым цветом отмечена пептидная последовательность Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>, предложенная для модификации хлорамфеникола. *д* – Модель конъюгата хлорамфениколамина (CAM, желтый) с фрагментом онкоцина<sup>8–12</sup> (голубой), соединенные линкерами разной длины – бутандиовой (зеленый) и пентандиовой (розовый) кислотами в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [16]

«Marcherey Nagel», Германия). Соединения, содержащие группы, поглощающие в УФ-области, обнаруживали с помощью УФ-кабинета («Camag», Англия); соединения, содержащие свободные либо трет-бутилоксикарбонил-защищенные (Вос-защищенные) аминогруппы, обнаруживали с помощью нингидринового реактива; для детекции соединений, содержащих остатки аргинина со свободной гуанидиновой группой и триптофана, применяли реагенты Сакагучи и Эрлиха соответственно.

**Аминокислотный анализ** осуществляли на анализаторе «Hitachi 835», Япония. Кислотный гидролиз проводили в запаянных ампулах смесью 6 М HCl и трифторуксусной кислот (2/1) при 155 °C в течение 1 часа.

**Подготовку ВЭЖХ** проводили на хроматографе «Knauer», Германия, используя колонку Nucleodur 100-5 C18 (5 мкм, 10 × 250 мм) («Macherey Nagel», Германия) в градиенте 0–60% ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония, скорость элюции – 5 мл/мин. Лиофилизацию проводили на приборе «FreeZone 2.5 Liter Freeze Dry System» («Labconco», Швейцария) при давлении ~10<sup>-5</sup> атм.

**Спектры ЯМР** соединений регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия), рабочие частоты составляли 400 МГц – для <sup>1</sup>H и 101 МГц – для <sup>13</sup>C.

**Хромато-масс-спектрометрию (LC-MS)** осуществляли с помощью системы UPLC/MS/MS, состоящей из хроматографа Acquity UPLC



System («Waters», США) и квадрупольного масс-спектрометра TQD (регистрация сигналов с помощью метода ESI MS; «Waters», США).

**Спектры MALDI-TOF MS** получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре «UltrafleXtreme», («Bruker Daltonik GmbH», Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

**Поляризацию флуоресценции** измеряли при комнатной температуре с помощью планшетного мультиридера «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader» («Perkin Elmer», США) на 384-луночном планшете. Длина волны поглощения составляла 485 нм, испускания – 535 нм.

**Виртуальный скрининг и молекулярный докинг.** *Виртуальный скрининг* проводили методом молекулярного докинга лигандов в жесткую структуру рецептора. Для этого структуры пептидных аналогов хлорамфеникола были сгенерированы, исходя из SMILES формата записи молекул с помощью программы OpenBabel 2.3.2 [29]. Всего было рассмотрено 10 648 вариантов N-ацетилированных трипептидных аналогов хлорамфеникола, включающих таутомерные формы гистидина и аргинина. Структуры лигандов, содержащие фрагменты онкоцина, дополнительно были оптимизированы полуэмпирическим методом в программе MORAC2016 с использованием гамилтониана PM7 [30]. В качестве рецептора использовали кристаллические структуры 70S рибосомы *E. coli* в комплексе с хлорамфениколом (PDB ID: 4V7T) [15] и комплекс 70S рибосомы *Thermus thermophilus* с онкоцином112 (PDB ID: 4Z8C) [16], из которых удаляли все неорганические ионы, низкомолекулярные лиганды и молекулы воды.

**Молекулярный докинг** выполняли с помощью программного обеспечения Autodock Vina [31] и QuickVina 2 [32]. Область молекулярного докинга охватывала сайт связывания хлорамфеникола и верхнюю часть РТ и описывалась кубом с длиной ребра 30 Å (в случае трипептидных аналогов хлорамфеникола) и параллелепипедом величиной 40 × 30 × 30 Å (в случае аналогов хлорамфеникола, содержащих фрагменты онкоцина). Параметр «exhaustiveness», характеризующий точность и полноту расчетов, был равен 100 при скрининге трипептидных аналогов и 600 – для соединений, содержащих фрагменты онкоцина. Для каждого соединения были получены по 20 возможных конформаций, характеризующихся соответствующими энергиями взаимодействия. Дополнительно было рассчитано среднеквадратичное отклонение амфеникольной части молекулы от рентгеноструктурных данных комплек-

са хлорамфеникола с рибосомой. Визуализацию полученных данных проводили с помощью программы PyMol 2.4.

**Синтез пептидных производных хлорамфениколамина.** *Синтез* пептидов и их производных **1c–4c**, **1d–4d**, **1e–2e**, **2f**, флуоренилметилового эфира бутандиовой (**5d**) и флуоренилметилового эфира пентандиовой кислот (**5e**), пептидил-полимеров *ProArg(Pbf)Pro-P* (**5c**), *ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-P* (**6c**), пентапептида *Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OH* (**7c**) и модифицированного им β-аланилхлорамфениколамина *Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-βAla-CAM* (**7a**) описан в Приложении (<http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya>).

*Гидрохлорид (1R,2R)-2-амино-1-(4-нитрофенил)пропан-1,3-диола (гидрохлорид хлорамфениколамина, CAM·HCl)*, *3-амино-N-[(1R,2R)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]пропанамид (β-Ala-CAM, 7b)*, а также аргинин содержащее производное хлорамфениколамина *Arg(Pbf)-CAM* были синтезированы, согласно описанным ранее в литературе методикам [33, 24].

*N-ацетил-L-фенилаланил-L-триптофил-L-гистидил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-FWH-CAM, 1a)*. К холодному раствору 25,0 мг (48 мкмоль) *Ac-PheTrpHis-OH* (**1d**) и 7,1 мг (62 мкмоль) *HOsu* (N-гидроксисукцинимид) в 2 мл ДМФА (безв.) добавляли 12,8 мг (62 мкмоль) DCC при 0 °С. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 0 °С, затем в течение ночи при 4 °С. Далее добавляли к раствору 11,9 мг (48 мкмоль) *CAM·HCl* и 8,3 мкл (48 мкмоль) DIPEA в 1 мл ДМФА. Полученную смесь перемешивали в течение 7 ч при комнатной температуре, затем в течение ночи при 4 °С. Реакционную смесь разбавляли водой (15 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 × 5 мл). Органический слой сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (безв.), а затем концентрировали на роторном испарителе. Продукт очищали методом колонной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ . Выход: 4,7 мг (14%); ТСХ:  $R_f$  0,24 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ ),  $R_f$  0,51 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 4/1$ ); LC-MS, m/z вычислено для  $[\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_8\text{O}_8 + \text{H}]^+ - 725,3$ ; найдено 725,3;  $t_R = 1,50$  мин.

*L-фенилаланил-L-триптофил-L-гистидил-[(1R,2R)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (FWH-CAM, 1b)*. Раствор, состоящий из 825 мкл TFA, 50 мкл фенола, 50 мкл воды, 50 мкл тиоанизола и 25 мкл β-меркаптоэтанола (Реагент К), дегазировали с помощью барботирования азота в течение нескольких минут. Полученную смесь добавляли к 10 мг (12,8 мкмоль) *Woc-PheTrpHis-CAM* (**1c**) и перемешивали в течение 4 ч при комнатной тем-

пературе в атмосфере азота. Смесь упаривали на роторном испарителе, остаток растворяли в минимальном количестве воды и осаждали эфиром. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ . Выход: 6,4 мг (74%); ТСХ:  $R_f$  0,26 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_7 + \text{H}]^+$  – 683,3; найдено 683,3;  $t_R = 1,04$  мин.

*N*-ацетил-*L*-аргинил-*L*-аланил-*L*-триптофил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-RAW-CAM, **2a**) получали подобно **1b**, исходя из 12,1 мг (13,2 мкмоль) Ac-Arg(Pbf)AlaTrp-CAM (**2c**) и 500 мкл Реагента К. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ . Выход: 4,9 мг (56%); ТСХ:  $R_f$  0,09 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_8 + \text{H}]^+$  – 668,3; найдено 668,4;  $t_R = 1,00$  мин.

*L*-аргинил-*L*-аланил-*L*-триптофил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (RAW-CAM, **2b**) получали подобно **1b**, исходя из 15 мг (17,1 мкмоль) Arg(Pbf)AlaTrp-CAM (**2d**) и 500 мкл Реагента К. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ . Выход: 4,6 мг (43%); ТСХ:  $R_f$  0,10 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_9\text{O}_7 + \text{H}]^+$  – 626,3; найдено 626,3;  $t_R = 0,80$  мин.

*N*-ацетил-*L*-валил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-VFR-CAM, **3a**). К раствору 9,5 мг (26,9 мкмоль) VFR-CAM (**3b**) в 1 мл ДМФА добавляли 4,2 мг (26,9 мкмоль) *N*-гидроксисукцинимидного эфира уксусной кислоты и 4,7 мкл (26,9 мкмоль) DIPEA. Смесь перемешивали 1 час при комнатной температуре, а затем ночь при 4 °С. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ . Выход: 6,1 мг (35%); ТСХ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ):  $R_f$  0,40 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{O}_8 + \text{H}]^+$  – 657,3; найдено 657,2;  $t_R = 1,44$  мин.

*L*-валил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (VFR-CAM, **3b**) получали подобно **1b**, исходя из 26 мг (26,9 мкмоль) Boc-ValPheArg(Pbf)-CAM (**3c**) и 500 мкл Реагента К. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ . Выход:

16 мг (97%); ТСХ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ):  $R_f$  0,41 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 6/1/0,1$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_7 + \text{H}]^+$  – 615,3; найдено 615,2;  $t_R = 0,80$  мин.

*N*-ацетил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-аланил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-AAA-CAM, **4a**) получали подобно **3a**, исходя из 7,5 мг (17,6 мкмоль) AAA-CAM (**4b**), 3,0 мг (19,4 мкмоль) *N*-гидроксисукцинимидного эфира уксусной кислоты и 2,5 мкл (17,6 мкмоль) триэтиламина. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ . Выход: 7,7 мг (94%); ТСХ:  $R_f$  0,81 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ ); LC-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_8 + \text{Na}]^+$  – 490,2; найдено 490,2;  $t_R = 0,87$  мин.

*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-аланил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (AAA-CAM, **4b**). К 19,5 мг (37,1 мкмоль) Boc-AlaAlaAla-CAM (**4c**) добавляли 1 мл смеси TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1/1) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Далее смесь упаривали на роторном испарителе, остаток осаждали эфиром. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ . Выход: 13,1 мг (83%); ТСХ:  $R_f$  0,69 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 65/25/4$ ); ESI-MS,  $m/z$  вычислено для  $[\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7 + \text{H}]^+$  – 426,2; найдено 426,3.

*N*<sup>1</sup>-[(1*R*,2*R*)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-*N*<sup>4</sup>-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролил-бутандиаמיד (CAM-C2-PRP, **5a**). Флуоренилметильный эфир бутандиовой (**5d**) кислоты (3 экв.) и НВТУ (3 экв.) перемешивали в ДМФА в течение 5 мин. Далее полученный активированный эфир и DIPEA (3 экв.) добавляли к 1 экв. пептидил-полимера ProArg(Pbf)Pro-P (**5c**) в сосуде Меррифилда. Перемешивали смесь 10 мин и добавляли DIPEA (0,6 экв.), затем продолжали перемешивание в течение 5 ч. Далее растворитель удаляли и промывали полимер, чередуя ДМФА (2 × 1 мин) и пропанол-2 (2 × 1 мин), после чего добавляли свежеприготовленный раствор для кэпирования (10 мл/г полимера): уксусный ангидрид/DIPEA/ДМФА = 5/6/89, *v/v*, выдерживали смесь в течение 5 мин, затем отфильтровывали полимер, заливали аналогичной порцией раствора для кэпирования и выдерживали ещё 30 мин. Затем полимер отфильтровывали и промывали ДМФА (3 × 1 мин). Удаляли 9-флуоренилметильную группу обработкой 20%-ным раствором пиперидина в ДМФА (2 × 15 мин), промывали полимер ДМФА (3 × 1 мин). Далее добавляли раствор HOSu (3 экв.) и DIC (3 экв.) в ДМФА и переме-

шивали 3 ч. Растворитель удаляли, добавляли к полимеру раствор САМ·НСl (3 экв.) и DIPEA (3 экв.) в ДМФА и перемешивали 3 ч. Далее синтезированное производное хлорамфениколамина отщепляли от полимерного носителя, согласно следующему протоколу: промывали последовательно полимер ДМФА (3 × 1 мин) и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 1 мин); добавляли Реагент К (10 мл/г полимера) и перемешивали в течение 4 ч; после чего полимер фильтровали и высаживали продукт из фильтрата диэтиловым эфиром. Обработку полимера Реагентом К и высаживание продукта повторяли до полного отщепления продукта (контроль осуществляли по ТСХ). Выпавшие осадки объединяли и подвергали очистке с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход: 4,5 мг (9%); ВЭЖХ: t<sub>R</sub> = 12,98 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для [C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub> - NO<sub>2</sub> + NH-OH + H]<sup>+</sup> - 649,3; найдено 649,5; m/z вычислено для [C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub> - NO<sub>2</sub> + NH<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> - 633,3; найдено 633,5; аминокислотный анализ: Arg 1,00 (1), Pro 1,51 (2).

*N*<sup>1</sup>-[(1*R*,2*R*)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-*N*<sup>4</sup>-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролин-пептандиаמיד (САМ-С3-PRP, **5b**) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArg(Pbf)Pro-**P** (**5c**) и флуоренилметилового эфира пептандиовой кислоты (**5e**). Выход: 4,1 мг (8%); ВЭЖХ: t<sub>R</sub> = 3,76 мин; LC-MS, m/z вычислено для [C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub> + H]<sup>+</sup> - 677,3; найдено 677,5; t<sub>R</sub> = 0,95 мин; аминокислотный анализ: Arg 1,00 (1), Pro 2,11 (2).

*N*<sup>1</sup>-[(1*R*,2*R*)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-*N*<sup>4</sup>-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролин-бутандиаמיד (САМ-С2-PRPRP, **6a**) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-**P** (**6c**) и флуоренилметилового эфира бутандиовой кислоты (**5d**). Выход: 3,8 мг (6%); ВЭЖХ: t<sub>R</sub> = 16,24 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для [C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> + H]<sup>+</sup> - 916,5; найдено 916,6; m/z вычислено для [C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> - NO<sub>2</sub> + NH-OH + H]<sup>+</sup> - 902,5; найдено 902,6; m/z вычислено для [C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> - NO<sub>2</sub> + NH<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> - 886,5; найдено 886,6; аминокислотный анализ: Arg 2,00 (2), Pro 3,12 (3).

*N*<sup>1</sup>-[(1*R*,2*R*)-1,3-дигидрокси-1-(4-нитрофенил)пропан-2-ил]-*N*<sup>4</sup>-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролин-пептандиаמיד (САМ-С3-PRPRP, **6b**) получали аналогично **5a**, исходя из пептидил-полимера ProArgProArgPro-**P** (**6c**) и флуоренилметилового эфира пептандиовой кислоты (**5e**). Выход: 3,2 мг (5%); ВЭЖХ: t<sub>R</sub> = 19,67 мин; MALDI TOF MS, m/z вычислено для [C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> - NO<sub>2</sub> + NH-OH + H]<sup>+</sup> - 916,5; найдено 916,6; m/z вычислено для [C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> - NO<sub>2</sub> + NH<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> - 900,5; найде-

но 900,6; аминокислотный анализ: Arg 2,00 (2), Pro 3,22 (3).

*N*-ацетил-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролил-*L*-аргинил-*L*-пролил-[(1*R*,2*R*)-2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)-1-гидроксиметил-этил]-амид (Ac-PRPRPβA-SAM, **7**) получали аналогично **1b**, исходя из 40 мг (0,028 ммоль). Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-β-Ala-SAM (**7a**) и 1 мл Реагента К. Выход: 21 мг (80%); ТСХ: R<sub>f</sub> 0,12 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/19% NH<sub>4</sub>OH = 65/25/5); LC-MS, m/z вычислено для [C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>N<sub>14</sub>O<sub>11</sub> + 2H]<sup>2+</sup> - 465,3; найдено 465,7; t<sub>R</sub> = 0,69 мин.

**Изучение связывания аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*.** Аффинность соединений к 70S рибосомам *E. coli* (штамм MRE-600) определяли методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина - BODIPY-ERY, как было описано ранее [34, 24]. Концентрация BODIPY-ERY составляла 4 нМ, рибосом - 30 нМ. Концентрации исследуемых веществ варьировали (0,05-1000 мкМ). Смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем измеряли уровень поляризации флуоресценции. Значения поляризации флуоресценции были приведены к относительной шкале, для чего за 100% был принят сигнал в отсутствие исследуемых соединений, а за 0% - при полном вытеснении BODIPY-ERY избытком эритромицина. Для каждого вещества проводили минимум по 2 повтора. Расчет эффективных констант диссоциации проводили на основе стандартной модели, описывающей равновесное конкурентное связывание двух лигандов в одном сайте [35].

**In vitro трансляция.** Ингибирование синтеза белка в бесклеточной системе проводили при помощи набора PurExpress («NEB», США), согласно предложенному протоколу. В качестве матрицы для трансляции использовали 100 нг мРНК гена *dhfR*, предварительно полученной T7 транскрипцией (T7 Mega script, «Invitrogen», США) с контрольной плазмиды набора PurExpress; реакцию проводили в 5 мкл в течение часа. Для визуализации белка в геле добавляли в реакционную смесь BODIPY-Met-tRNA до 1 мкМ. Тестируемые антибиотики добавляли в концентрации 30 мкМ. Реакции проводили в трех повторах и разделяли смеси в 12%-ном SDS-геле, затем проводили детекцию сигнала BODIPY при помощи Typhoon phosphorimager («GE», США). Обсчёт сигнала проводили при помощи ImageLab («Bio-rad», США).

**Химический пробинг.** Определение нуклеотидов рРНК, взаимодействующих с антибиотиками, осуществляли при помощи анализа эффективности защиты от химической модификации. Образцы 70S рибосом *E. coli* в присутствии



30 мкМ тестируемых антибиотиков подвергали действию диметилсульфата (DMS), согласно классическому протоколу Moazed и Noller [36, 37], для обратной транскрипции был использован олигонуклеотид, комплементарный участку 2,102–2,119 23S рРНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Виртуальный скрининг и молекулярный докинг.** Для отбора наиболее аффинных по отношению к рибосоме аналогов хлорамфеникола, в структуре которых дихлорацетильная группа заменена на трипептид, был проведен виртуальный скрининг всех возможных комбинаций N-ацетилтрипептидных производных хлорамфениколамина, исходя из 20 протеиногенных аминокислот. Ацетильная группа была введена для исключения возможного влияния концевой аминокислоты и выявления взаимодействий, специфичных для боковых радикалов аминокислот. Виртуальный скрининг проводили методом молекулярного докинга сгенерированных лигандов в структуру рибосомы *E. coli* в комплексе с хлорамфениколом (PDB ID: 4V7T) [15]. В результате было получено по 20 возможных конформаций для каждого из 8000 производных и оценена их энергия взаимодействия с рибосомой. Отдельно была произведена оценка отклонения хлорамфеникольной части молекул от рентгеноструктурных данных комплекса хлорамфеникола с рибосомой. Во многих из полученных конформаций нитрофенильный остаток мало смещается относительно соответствующей кристаллической структуры хлорамфеникола, в то время как пептидная цепь направлена в сторону РТ (рис. 1, в). Анализ результатов виртуального скрининга (рис. S1 в Приложении) показал, что наиболее выгодными аминокислотами в любом из положений по отношению к хлорамфениколамину являются содержащие ароматические группы Trp, Tyr, Phe, а также His.

**Таблица 1.** Полученные методом молекулярного докинга энергии взаимодействия трипептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*

Соединение	Энергия связывания, ккал/моль
Ac-FWH-CAM (1a)	-14,1
Ac-RAW-CAM (2a)	-12,3
Ac-VFR-CAM (3a)	-12,3
Ac-AAA-CAM (4a)	-9,2
Хлорамфеникол	-8,2

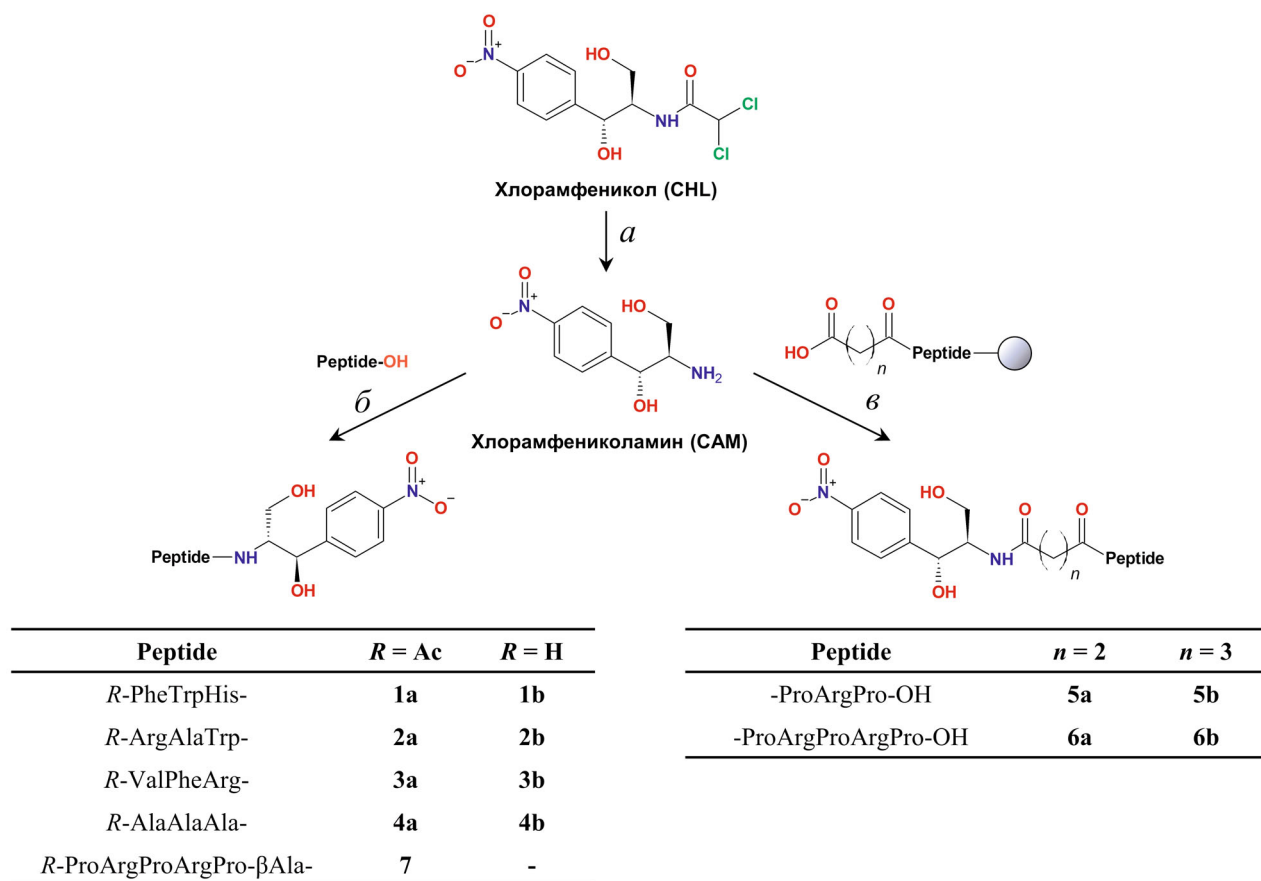
Для дальнейшего синтеза были выбраны трипептидные аналоги Ac-FWH-CAM (1a), Ac-RAW-CAM (2a), Ac-VFR-CAM (3a) (рис. 2), находящиеся среди 50 лучших производных, ранжированных по рассчитанной энергии взаимодействия с рибосомой (табл. 1), а также их производные со свободной N-концевой аминокислотой: FWH-CAM (1b), RAW-CAM (2b), VFR-CAM (3b). Выбор данных соединений также был обусловлен тем, что они содержат в своём составе либо положительно заряженную аминокислоту Arg либо His, способный легко переходить в протонируемую форму при физиологических условиях. Триаланиновые аналоги Ac-AAA-CAM (4a) и AAA-CAM (4b) были предложены в качестве контрольных соединений.

Дизайн аналогов хлорамфеникола, содержащих фрагменты онкоцина, проводили на основании наложения кристаллических структур хлорамфеникола (PDB ID: 6ND5) [38] и онкоцина 112 (PDB ID: 4Z8C) [16] в комплексах с рибосомами *T. thermophilus*, ввиду отсутствия структурных данных для комплекса рибосомы *E. coli* с онкоцином. Принимая во внимание высокую консервативность фрагмента 23S рРНК, локализованного в области связывания антибиотиков, а также сходство конформаций хлорамфеникола, связанного с различными рибосомами [15, 38], можно сделать предположение об аналогичном взаимодействии моделируемых аналогов как с рибосомами *E. coli*, так и с *T. thermophilus*. Анализ наложения структур (рис. 1, г) показал, что аминокислотная группа хлорамфениколамина находится на расстоянии 6 Å от α-аминогруппы Pro<sup>8</sup> онкоцина. В качестве линкеров, соединяющих данные группы, были предложены линейные двухосновные кислоты, длина которых была выбрана на основе результатов виртуального скрининга конъюгатов хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина (рис. S2, а-е в Приложении), в которых варьировалась как длина цепи двухосновной кислоты (от пропан- до гександиовой кислоты), выступающей в качестве линкера (рис. S2с в Приложении), так и длина фрагментов онкоцина (рис. S2, d в Приложении). В литературе имеются данные о том, что основной вклад в связывание онкоцина с РТ вносят первые 12 а.о. (Val<sup>1</sup>Asp<sup>2</sup>Lys<sup>3</sup>Pro<sup>4</sup>Pro<sup>5</sup>Tyr<sup>6</sup>Leu<sup>7</sup>Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>) [16, 17], поэтому рассматривались фрагменты онкоцина от одной (Pro<sup>8</sup>) до пяти (Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>) аминокислот. Наибольшей по результатам молекулярного докинга аффинностью к рибосоме (рис. S2b в Приложении) обладали конъюгаты хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина, в структуре которых линкер содержал две (CAM-C2-ONC<sup>8-12</sup>)

или три метиленовые группы (CAM-C3-ONC<sup>8-12</sup>) (рис. 1, д). Для дальнейшего синтеза были выбраны пептидные аналоги хлорамфеникола, в которых трипептид (Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>) и пентапептид (Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>) соединены с хлорамфениколамином через бутандиовую либо пентандиовую кислоты: CAM-Cn-PRP ( $n = 2$ , **5a**,  $n = 3$ , **5b**), CAM-Cn-PRPRP ( $n = 2$ , **6a**,  $n = 3$ , **6b**) (рис. 2). Поскольку выбранные пептидные последовательности являются палиндромными, был также предложен аналог хлорамфеникола, содержащий в структуре пентапептидный фрагмент с направлением цепи, обратным по отношению к последовательности онкоцина; в структуре этого аналога аминогруппа хлорамфениколамина соединена с карбоксильной группой C-концевого пролина через остаток β-аланина: Ac-PRPRPβA-CAM (7) (рис. 2).

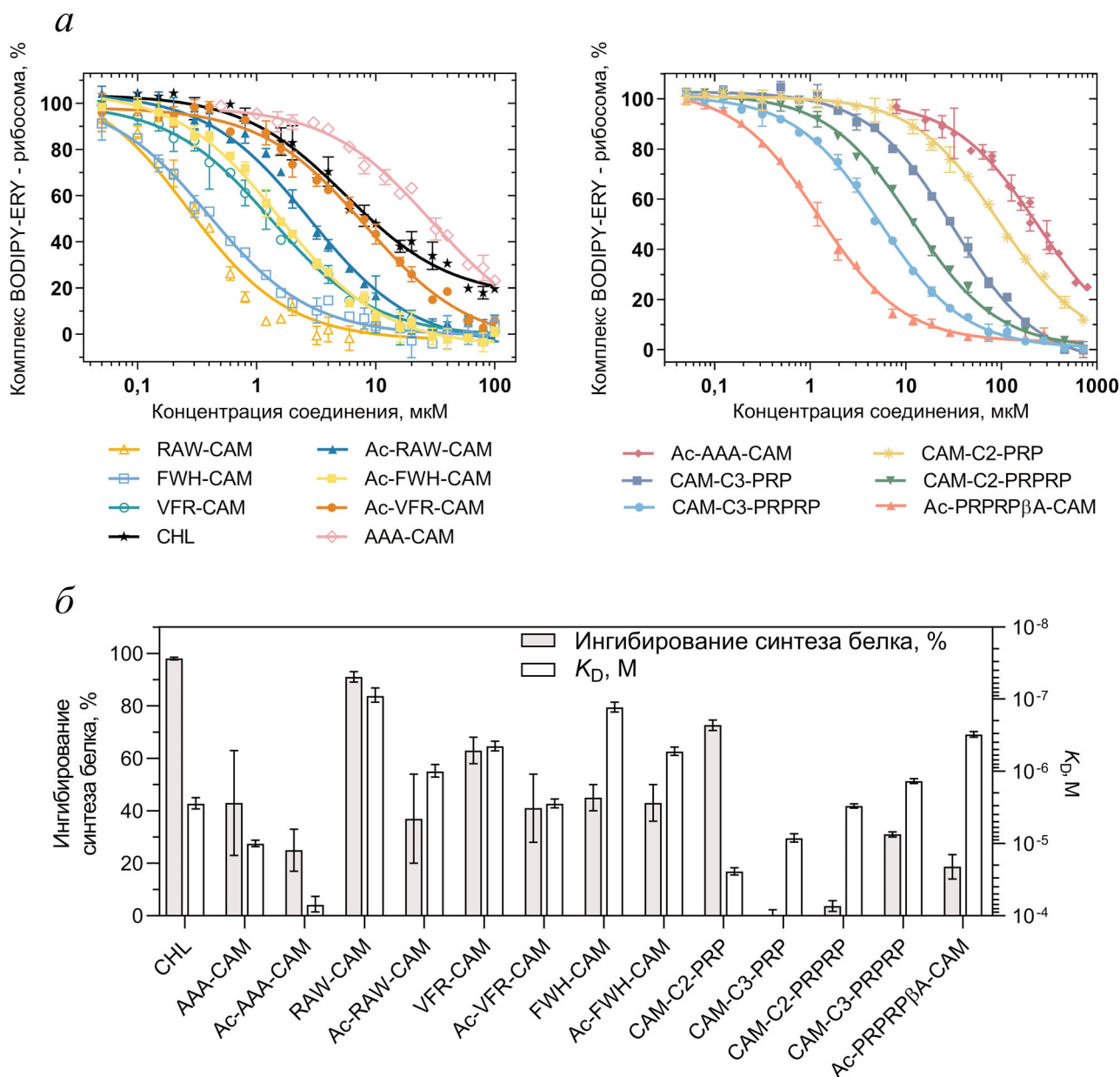
**Синтез.** Были синтезированы новые пептидные аналоги хлорамфениколамина, структуры

которых были выбраны на основе виртуального скрининга: Ac-FWH-CAM (**1a**), Ac-RAW-CAM (**2a**), Ac-VFR-CAM (**3a**) и Ac-AAA-CAM (**4a**), а также их аналоги со свободной N-концевой аминогруппой (FWH-CAM (**1b**), RAW-CAM (**2b**), VFR-CAM (**3b**), AAA-CAM (**4b**)). Схема синтеза соединений (**1–4**) включала гидролиз хлорамфеникола до хлорамфениколамина [33] и ацилирование последнего с помощью защищенных по боковым функциональным группам N-Вос-, N-Fmoc- либо N-ацетил-пептидов с последующим удалением защитных групп (рис. 2). В случае соединений **2a**, **3a** и **4a** ацелирование трипептидных аналогов хлорамфеникола, содержащих свободную N-концевую аминогруппу, проводили обработкой их N-оксисукцинимидным эфиром уксусной кислоты. Соединения **3a** и **3b** получали присоединением к хлорамфениколамину сукцинимидного эфира защищенного по аминогруппе и боковой функции



**Рис. 2.** Схема синтеза пептидных аналогов хлорамфеникола. *a* – 1M HCl, 100 °C; *б* – **1a**: Ac-PheTrpHis-OSu; **1b**: 1) Boc-PheTrpHis-OSu, 2) Реагент К; **2a**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)AlaTrp-OSu, 2) Pip, 3) AcOSu, 4) Реагент К; **2b**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)AlaTrp-OSu, 2) Pip, 3) Реагент К; **3a**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)-OSu, 2) Pip, 3) Boc-ValPhe-OSu, 4) Реагент К, 5) AcOSu; **3b**: 1) Fmoc-Arg(Pbf)-OSu, 2) Pip, 3) Boc-ValPhe-OSu, 4) Реагент К; **4a**: 1) Boc-AlaAlaAla-OSu, 2) TFA, 3) AcOSu; **4b**: 1) Boc-AlaAlaAla-OSu, 2) TFA; *в* – **5a**: 1) SuO-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-ProArg(Pbf)Pro-P, 2) Реагент К; **5b**: 1) SuO-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)-ProArg(Pbf)Pro-P, 2) Реагент К; **6a**: 1) SuO-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-P, 2) Реагент К; **6b**: 1) SuO-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-P, 2) Реагент К; **7**: 1) Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OSu, 2) Реагент К





**Рис. 3.** Аффинность к рибосоме и ингибирующая активность пептидных аналогов хлорамфеникола. *a* – Конкурентное связывание VODIPY-ERY и пептидных аналогов хлорамфеникола с 70S рибосомами *E. coli*. Для каждой точки приведено среднее значение со стандартным отклонением. *б* – Способность пептидных аналогов хлорамфеникола ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro* и эффективные константы диссоциации ( $K_D$ ) их комплексов с рибосомами. Приведены средние значения с доверительным интервалом ( $\alpha = 0,05$ )

аргинина, с последующим удалением Fmoc-группы с его аминогруппы и присоединением к ней дипептида Boc-ValPhe.

Для получения производных хлорамфениколамина, содержащих в структуре характерные последовательности из ПБАМП: CAM-C2-PRP (**5a**), CAM-C3-PRP (**5b**), CAM-C2-PRPRP (**6a**) и CAM-C3-PRPRP (**6b**), была разработана схема твердофазного синтеза, позволяющая получить

не только пептидные фрагменты, но и полностью синтезировать конъюгаты хлорамфениколамина с фрагментами онкоцина на твердофазном носителе (рис. 2 и рис. S3 в Приложении). Синтез пептидов проводили согласно стандартной Fmoc-стратегии с использованием Rbf-группы для защиты боковой цепи аргинина. После достижения необходимой длины пептидного фрагмента к нему присоединяли моно-9-

**Таблица 2.** Эффективные константы диссоциации комплексов пептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*. Приведены средние значения с доверительным интервалом ( $\alpha = 0,05$ )

Соединение	$K_D$ , мкМ	Соединение	$K_D$ , мкМ
Ac-FWH-CAM (1a)	$0,54 \pm 0,06$	FWH-CAM (1b)	$0,13 \pm 0,02$
Ac-RAW-CAM (2a)	$1,0 \pm 0,2$	RAW-CAM (2b)	$0,09 \pm 0,02$
Ac-VFR-CAM (3a)	$2,8 \pm 0,4$	VFR-CAM (3b)	$0,45 \pm 0,07$
Ac-AAA-CAM (4a)	$80 \pm 20$	AAA-CAM (4b)	$10 \pm 1$
CAM-C2-PRP (5a)	$24 \pm 3$	CAM-C3-PRP (5b)	$8 \pm 1$
CAM-C2-PRPRP (6a)	$3,0 \pm 0,2$	CAM-C3-PRPRP (6b)	$1,4 \pm 0,1$
Ac-PRPRP $\beta$ A-CAM (7)	$0,31 \pm 0,03$		
Хлорамфеникол	$2,8 \pm 0,5$		

флуоренилметилловый эфир бутандиовой (5d) либо пентандиовой кислоты (5e), которые получали заранее [39]. После удаления флуоренилметилового группировки с карбоксильной группы последнюю активировали с помощью N-гидроксисукцинимидом и DIC, а затем присоединяли хлорамфениколамин [23], после чего деблокировали конъюгат с одновременным отщеплением его от полимерного носителя.

Для получения соединения Ac-PRPRP $\beta$ A-CAM (7) хлорамфениколамин предварительно модифицировали с помощью Вос- $\beta$ -Ala, удаляли Вос-группу [24, 40], а затем модифицировали по образовавшейся аминогруппе пептидом Ac-ProArg(Pbf)ProArg(Pbf)Pro-OH (7c) и удаляли Pbf-защиты с остатков аргинина (рис. 2). Синтез пептида 7c был предварительно осуществлен на твердой фазе, для сохранения остатков боковых групп его отщепляли от 2-хлортритильного полимера с применением гексафторизопропанола (рис. S3 в Приложении) [41].

**Изучение связывания аналогов хлорамфеникола с рибосомами *E. coli*.** Аффинность полученных соединений к рибосоме была измерена с помощью метода конкурентного связывания в присутствии флуоресцентно-меченного производного эритромицина – BODIPY-ERY, поскольку известно, что сайты связывания хлорамфеникола и эритромицина перекрываются [38]. Для всех изучаемых пептидных аналогов хлорамфеникола наблюдалось падение поляризации флуоресценции при увеличении их концентрации (рис. 3, a), что говорит о способности конъюгатов вытеснять BODIPY-ERY из его сайта связывания, находящегося в рибосомном туннеле. Нелинейный регрессионный анализ полученных данных [35] позволил рассчитать эффективные константы диссоциации ( $K_D$ ) комплексов аналогов хлорамфеникола с рибосомами (табл. 2).

Согласно представленным результатам (табл. 2), все выбранные на основании виртуального скрининга трипептидные аналоги хлорамфеникола проявляют большую или сравнимую с хлорамфениколом аффинность к рибосоме. Соединения со свободной N-концевой аминогруппой обладают в несколько раз большим сродством к рибосоме по сравнению с их N-ацетилированными производными; подобное явление ранее наблюдалось для аминокислотных аналогов хлорамфеникола [24]. Аффинность RAW-CAM (2b) к рибосоме оказалась более чем в 20 раз выше, чем у хлорамфеникола. В то же время трипептидные аналоги, выбранные в качестве контроля – Ac-AAA-CAM (4a) и AAA-CAM (4b), не показали значимого связывания в области рибосомного туннеля.

Введение в структуру хлорамфениколамина фрагментов онкоцина в некоторых случаях также привело к компенсации потери прочных взаимодействий, обусловленных дихлорацетильной группой [33, 38]. Производные хлорамфениколамина, содержащие фрагменты онкоцина, связанные через более длинный пентандиовый линкер (5b, 6b), связываются с рибосомой прочнее, чем соответствующие производные с бутандиовым линкером (5a, 6a), а пентапептидные аналоги (6a, 6b) прочнее, чем трипептидные (5a, 5b). Возможно, это объясняется тем, что более длинный линкер обеспечивает большую подвижность хлорамфеникольного и пептидного фрагментов в рибосомном туннеле, в то время как второй остаток аргинина в пентапептиде – дополнительные взаимодействия с нуклеотидами РТ. Соединение 7, содержащее «перевернутый» пептидный фрагмент, показало наибольшую аффинность к бактериальным рибосомам среди содержащих остатки онкоцина аналогов хлорамфеникола, в несколько раз превышающую таковую у хлорамфеникола.

Подтвержденное экспериментально предсказанное молекулярным моделированием высокое сродство полученных пептидных аналогов хлорамфеникола к бактериальным рибосомам рационализирует необходимость проверки их ингибирующей активности в отношении пептидилтрансферазной реакции.

**In vitro трансляция.** Измерение ингибирующей активности проводили в бесклеточной системе трансляции мРНК ферментов дигидрофлатредуктазы (*DHFR*) и люциферазы светлячка (*Fluc*). Оказалось, что, несмотря на прочное связывание с бактериальной рибосомой, большинство производных ингибирует синтез белка слабее, чем хлорамфеникол (рис. 3, б). В то же время RAW-CAM (**2b**) ингибирует сходным с хлорамфениколом образом, а его ацетильное производное (**2a**) уже такую активность не проявляет. Однако какая-либо зависимость уровня ингибирования трансляции от наличия *N*-концевой ацетильной группы либо от других особенностей структуры полученных соединений не наблюдается. Как не обнаруживается и корреляции между значениями констант диссоциации комплексов аналогов хлорамфеникола с рибосомой и их ингибирующей активностью (рис. 3, б). Небольшая, но значимая корреляция наблюдается лишь между уровнем ингибирования синтеза белка исследуемыми соединениями и их энергией взаимодействия с рибосомой, приходящейся на один тяжелый (неводородный) атом (рис. S4a в Приложении) [42].

**Химический пробинг.** Трипептидные аналоги хлорамфеникола со свободной *N*-концевой аминогруппой, проявившие значительную аффинность к рибосоме, были исследованы на способность непосредственного взаимодействия с нуклеотидами центральной петли домена V 23S рРНК рибосомы *E. coli*. Для этого комплексы рибосомы с аналогами хлорамфеникола, а также с эритромицином, тилозином и хлорамфениколом, взаимодействие которых с рибосомой хорошо изучено [43, 40], подвергали обработке DMS и анализировали уровень модификации соответствующих гетероциклических оснований, нормировав его на степень модификации не вовлеченных во взаимодействия с антибиотиками нуклеотидов (рис. 4, а, б). Все исследованные трипептидные аналоги в той или иной мере вызывают защиту нуклеотидов, выстилающих стенки рибосомного туннеля (A2058, A2059 и A2062), что согласуется со способностью данных производных вытеснять из него флуоресцентный аналог эритромицина BODIPY-ERY.

Уровень защит нуклеотидов РТ от модификации DMS указывает на то, что по характеру связывания RAW-CAM (**2b**) больше всего похож

на немодифицированный хлорамфеникол, что вместе с высокой аффинностью к рибосоме объясняет наибольшую активность этого аналога. В отличие от соединения **2b**, другие трипептидные аналоги хлорамфеникола (**1b**, **3b**, **4b**) вызывают частичную защиту нуклеотида A2058. Связывание данных молекул, скорее всего, будет невозможным по ходу трансляции, когда в туннеле будет располагаться растущий пептид, в отличие от хлорамфеникола, который может связываться в присутствии пептидил-ТРНК, вызывая тем самым арест трансляции [44].

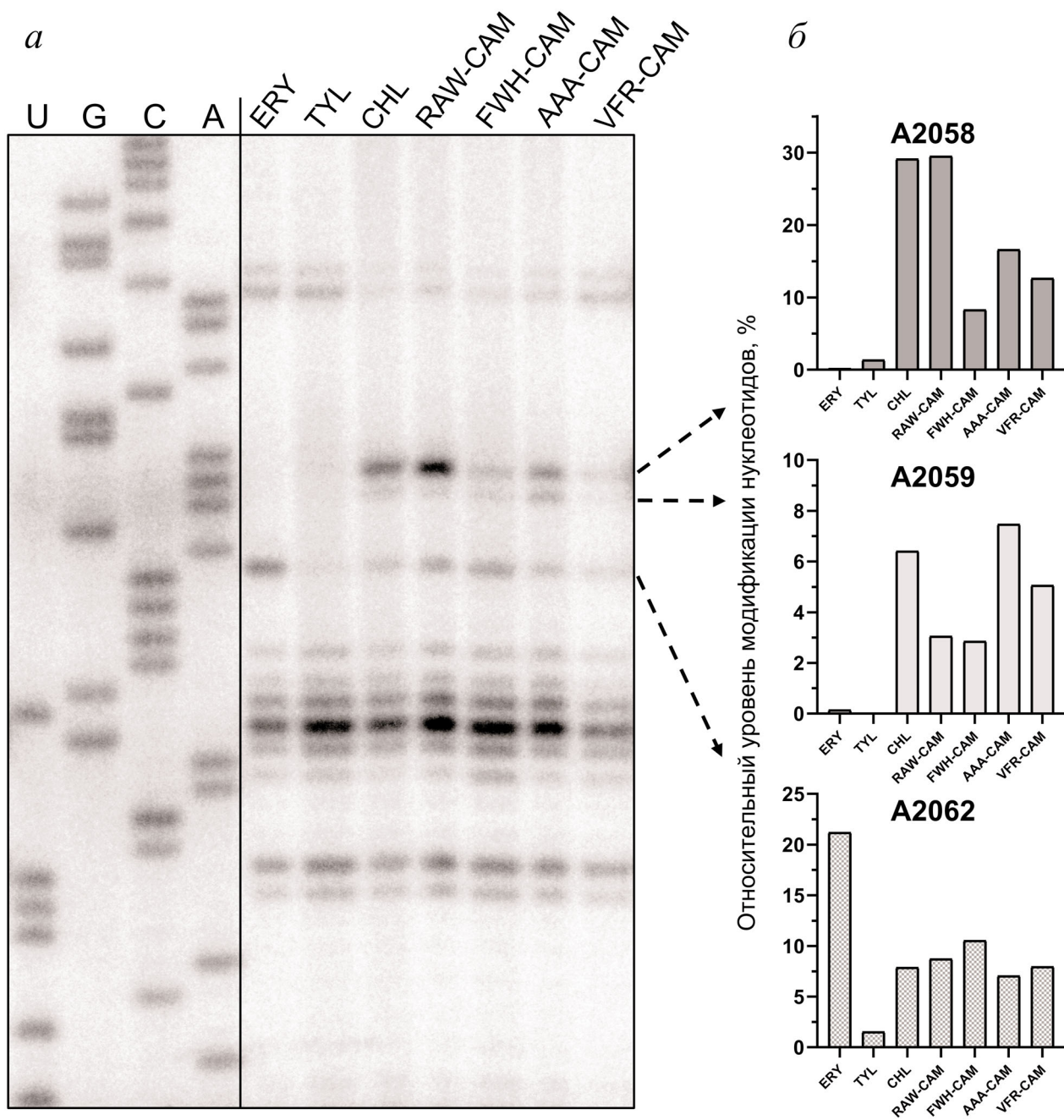
В то же время их аффинность к соответствующему сайту связывания, по-видимому, недостаточна, чтобы конкурировать с удлиняющейся пептидной цепью в процессе элонгации, что объясняет низкую эффективность этих производных при подавлении трансляции в бесклеточной системе.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что трипептидные аналоги хлорамфеникола, содержащие в структуре последовательности известных «стоп»-пептидов, способны связываться с рибосомой *E. coli* на уровне близком к исходному антибиотику [23]. Было также показано, что аминокислотные аналоги хлорамфеникола, в которых дихлорацетильный фрагмент заменен на остаток аминокислоты, способной протонироваться, также проявляют высокую аффинность к бактериальным рибосомам, связываются с рибосомой в том же сайте, что и хлорамфеникол, при этом заместитель при аминогруппе хлорамфениколмина направлен в сторону выхода из РТ. Для аминокислотных аналогов хлорамфеникола было выявлено также отсутствие корреляций между способностью к связыванию с рибосомами и их ингибирующей активностью *in vitro* [24]. Трипептидные аналоги хлорамфеникола, найденные в результате виртуального скрининга по их аффинности к бактериальной рибосоме и синтезированные в данном исследовании, все содержат в структуре а.о., способные заряжаться положительно, а также гидрофобные а.о. (рис. 2 и 3, табл. 2).

Подробный анализ результатов скрининга показал преобладание ароматических аминокислот в структурах трипептидных аналогов хлорамфеникола, обладающих наименьшей рассчитанной энергией взаимодействия с рибосомой, независимо от модели их связывания (рис. S1 в Приложении). Несмотря на то, что ранее была показана высокая аффинность гистидинового аналога хлорамфеникола к бактери-





**Рис. 4.** Модификация нуклеотидов центральной петли домена V 23S рРНК рибосомы *E. coli* с помощью DMS в присутствии антибиотиков эритромицина (ERY), тилозина (TYL), хлорамфеникола (CHL) и трипептидных аналогов хлорамфеникола: FWH-CAM (**1b**), RAW-CAM (**2b**), VFR-CAM (**3b**), AAA-CAM (**4b**). *а* – Электрофореграмма полученных в результате обратной транскрипции 23S рРНК олигонуклеотидов. *б* – Относительный уровень модификации нуклеотидов A2058, A2059 и A2062, нормированный на степень модификации не вовлеченных во взаимодействия с антибиотиками нуклеотидов

альной рибосоме [24], производные, содержащие другие ароматические аминокислоты, не проявляли подобных свойств. Нельзя исключать, что характер связывания пептидных аналогов отличен от аминокислотных производных, однако возможным объяснением наблюдаемых результатов виртуального скрининга мо-

жет также являться либо недоучет потери в конформационной энтропии лигандов при связывании, либо переоценка вклада  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий в оценочной функции программного обеспечения, используемого для молекулярного докинга. Поэтому для дальнейшего синтетического получения были выбраны трипептид-

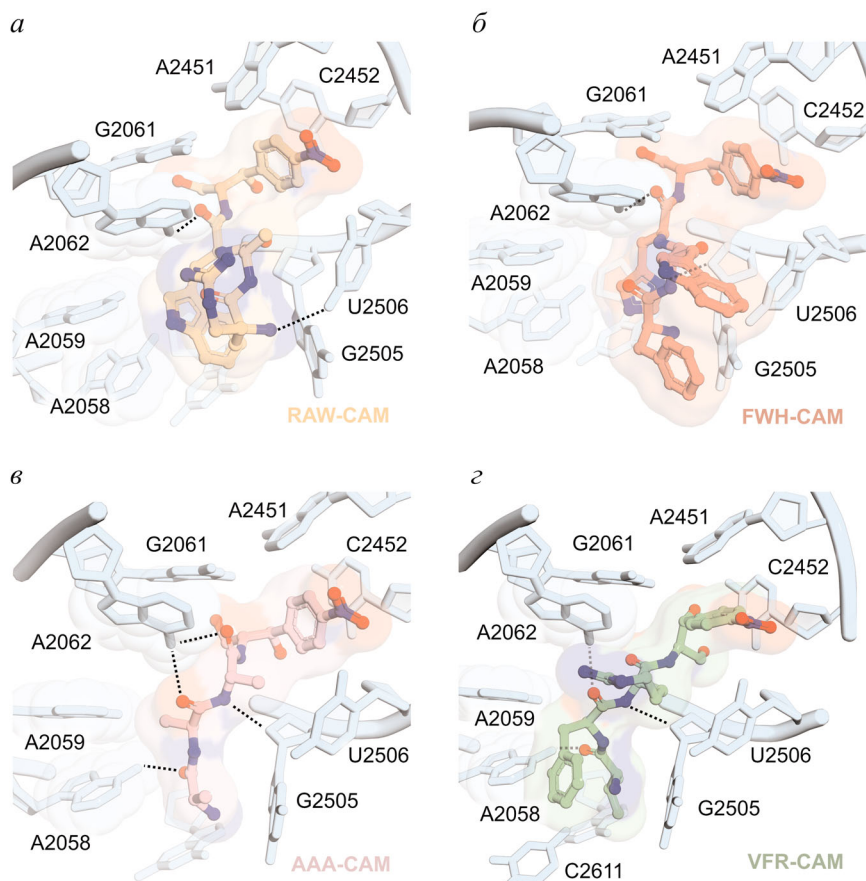
ные аналоги, содержащие также положительно заряженные аминокислоты, конъюгаты которых с хлорамфениколамином показали ранее высокое сродство к рибосоме [24]. В целом результаты виртуального скрининга для *N*-ацетилтрипептидных производных хлорамфениколамина согласуются с экспериментально измеренной их аффинностью к рибосоме (табл. 1 и 2). Явный выпад энергии взаимодействия для небольшой, по сравнению с трипептидными аналогами, молекулы хлорамфеникола также может объясняться недостаточным негативным вкладом конформационной энтропии в оценочную функцию программы, что приводит к сильному завышению результатов молекулярного докинга с ростом размера молекулы. В то же время при анализе энергий взаимодействия с рибосомой, приходящихся на один тяжелый атом соединения (эффективностей лигандов) [42], рассчитанных для конформаций, среднеквадратичное отклонение хлорамфеникольной части молекулы в которых от соответствующих рентгеноструктурных данных составляет менее 3 Å, наблюдается значимая корреляция с экспериментальными данными по эффективности лигандов (рассчитанные из соответствующих  $K_D$ ) для всех полученных соединений (рис. S4b в Приложении).

Результаты молекулярного докинга (рис. 5) также согласуются с данными химического пробинга трипептидных аналогов хлорамфеникола (рис. 4) – пептидная часть молекул аналогов **1b–4b** находится в непосредственной близости от нуклеотидов рибосомного туннеля A2058, A2059 и A2062, что приводит к их частичной защите от химической модификации. Как видно из рис. 5, *a*, характер связывания RAW-CAM (**2b**) несколько отличается от остальных соединений. Подобно хлорамфениколу [15, 38], **2b** не взаимодействует с A2058, а образуя компактную структуру, вступает в перпендикулярные  $\pi$ -взаимодействия с A2062 за счёт гуанидиновой группы аргинина, а также с G2505 за счёт остатка триптофана. *N*-Концевая аминогруппа данного соединения, согласно результатам молекулярного докинга, образует водородную связь с U2506. Судя по данным химического пробинга и молекулярного докинга, по механизму действия RAW-CAM наиболее близок к хлорамфениколу, что, по-видимому, и обуславливает его высокую ингибирующую активность (рис. 3, *b*).

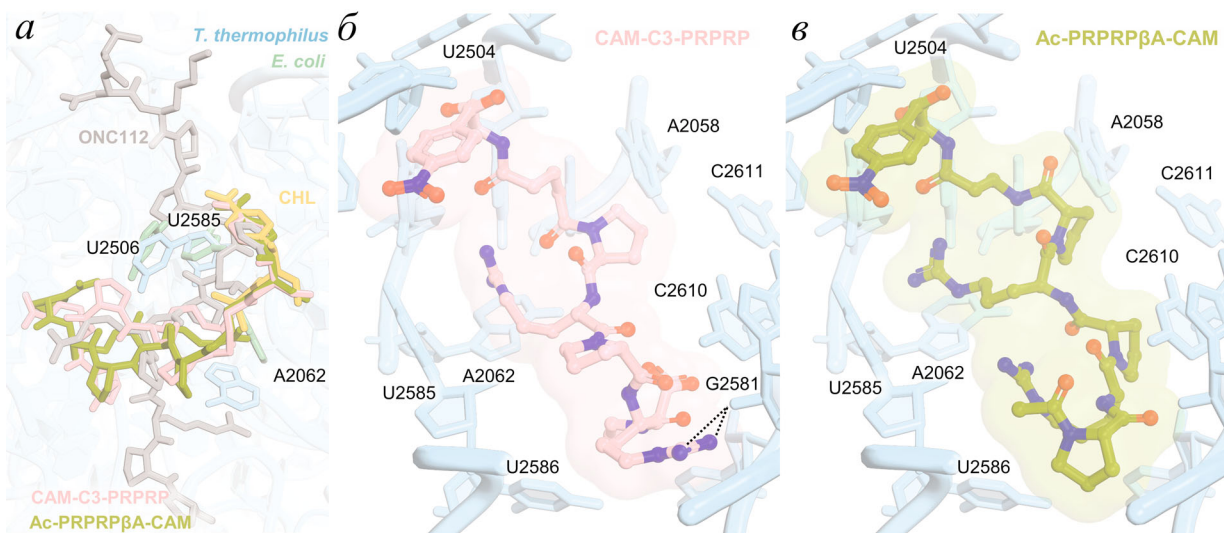
Наличие ароматических аминокислот в структуре FWH-CAM (**1b**) приводит к их множественному  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействию с гетероциклическими основаниями нуклеотидов U2585, U2506, G2505, C2610 в различных ориентациях

плоскостей ароматических систем (рис. 5, *b*). Кроме того, остатки фенилаланина и триптофана также образуют внутримолекулярные перпендикулярные  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия. Остаток гистидина, находящийся около нуклеотидных остатков A2058 и A2059, образует водородную связь с O4' G2505. В случае производного VFR-CAM (**3b**), кроме водородных связей с A2058, A2062 и G2505, наблюдается наличие смещенного стэкинга между гуанидиновой группой аргинина и гетероциклическим основанием A2062 (рис. 5, *c*), а также между бензольным кольцом фенилаланина и основанием C2611. Несмотря на отсутствие в структуре пептидного фрагмента соединения AAA-CAM (**4b**) боковых радикалов, содержащих полярные атомы, эта молекула образует водородные связи с нуклеотидами РТ за счёт своего пептидного остова (рис. 5, *e*). Однако отсутствие какого-либо взаимодействия с A2059, а также потенциально высокая подвижность молекулы, по-видимому, приводят к слабой его защите в случае химической модификации (рис. 4) и низкой аффинности соединения к рибосоме. Защита от модификации A2062, наблюдаемая в химическом пробинге для всех соединений, видимо, в первую очередь обеспечивается пептидным остовом молекулы. Во всех соединениях атомы кислорода амидной группы пептидного фрагмента могут образовывать водородные связи с аминогруппой аденина A2062. Большая аффинность пептидных аналогов со свободной концевой аминогруппой, по-видимому, обеспечивается за счёт дополнительных взаимодействий между этой группой и элементами РТ. И если в случае **2b** явно наблюдается соответствующая водородная связь с U2506 (рис. 5, *a*), то в других соединениях возможно образование катион- $\pi$ -взаимодействий с данным нуклеотидом. Не исключено также, что, как и в случае гистидинового аналога хлорамфеникола [24], реализуется каскад водородных связей, образованных через молекулу воды.

Среди аналогов хлорамфеникола, содержащих остатки антимикробного пептида онкоцина (**5a**, **6a**, **5b**, **6b**, **7**), пентапептидное производное, содержащее линкер на основе пентандиовой кислоты, CAM-C3-PRPRP (**6b**), и его палиндромный аналог Ac-PRPRP $\beta$ A-CAM (**7**) превзошли по аффинности к рибосоме хлорамфеникол. Анализ результатов молекулярного докинга (рис. 6) показал, что структуры их комплексов с рибосомой *T. thermophilus*, в которых амфеникольная часть молекулы находится в сайте связывания хлорамфеникола, отличаются от соответствующих рентгеноструктурных данных, полученных для онкоцина [16]. Причинами этому могут быть как общие ограничения используе-



**Рис. 5.** Структуры комплексов трипептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*, полученные методом молекулярного докинга. *a* – RAW-CAM (**2b**); *б* – FWH-CAM (**1b**); *в* – AAA-CAM (**4b**); *г* – VFR-CAM (**3b**). Пунктирной линией обозначены возможные водородные связи с нуклеотидами 23S рНК



**Рис. 6.** Структуры комплексов пептидных аналогов хлорамфеникола, содержащих палиндромную последовательность ProArgProArgPro, встречающуюся в антимикробном пептиде онкоцине, с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C [16]), полученные методом молекулярного докинга. Структуры хлорамфеникола (*a* – желтый цвет), онкоцина112 (*a* – серый), аналога хлорамфеникола, содержащего фрагмент онкоцина Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>, соединенный с хлорамфениколамином через пентандиовую кислоту: CAM-C3-PRPRP (**6b**) (*a* и *б* – розовый) и аналога хлорамфеникола, содержащего «перевернутый» фрагмент онкоцина Pro<sup>8</sup>Arg<sup>9</sup>Pro<sup>10</sup>Arg<sup>11</sup>Pro<sup>12</sup>, соединенный с хлорамфениколамином через β-аланин: Ac-PRPRPβA-CAM (**7**) (*a* и *в* – зеленый). Представлена нумерация нуклеотидов, характерная для рибосомы *E. coli*



мого метода молекулярного моделирования, так и тот факт, что нуклеотидные основания остатков A2062, U2506 и U2585 по-разному ориентированы при связывании хлорамфеникола и онкоцина.

В то же время, несмотря на противоположные направления пептидных цепей в аналогах **6b** и **7**, полученные для них конформации оказались очень схожими. В обоих соединениях остаток аргинина, соответствующий положению 9 в последовательности онкоцина, взаимодействует с A2062, однако в отличие от антимикробного пептида его боковая цепь располагается с другой стороны относительно нуклеотида. В случае производного **6b** наблюдается возможность образования водородной связи между остатком, моделирующим Arg<sup>11</sup>, и O2' G2581. Предполагаемые взаимодействия могут быть причиной высокого сродства рассматриваемых аналогов к рибосоме, но, как и в случае трипептидных аналогов, не объясняют их низкую ингибирующую активность в сравнении с хлорамфениколом.

Как следует из структур комплексов аналогов хлорамфеникола **1b–4b** (рис. 5) и **6b**, **7** (рис. 6) с бактериальными рибосомами по результатам молекулярного докинга, а также, исходя из данных химического пробинга, эти соединения за счёт аминокислотных радикалов и пептидного остова способны взаимодействовать с рядом нуклеотидных остатков РТ, важных для регуляции и остановки трансляции [6, 7, 11, 16, 17]. Несомненно, столь большое количество разнообразных взаимодействий аналогов с элементами РТ может обеспечивать наблюдаемую высокую аффинность полученных соединений к рибосоме. Однако тот факт, что уровень ингибирования пептидилтрансферазной реакции лишь для одного из них – RAW-CAM (**2b**), достигает активности исходного антибиотика, хлорамфеникола, а также недавние исследования, показавшие возможность связывания хлорамфеникола с бактериальной рибосомой в присутствии растущей пептидной цепи [44–46], свидетельствует о необходимости уточнения механизма взаимодействия хлорамфеникола и его аналогов с функциональным комплексом рибосомы в процессе трансляции.

С другой стороны, проведение виртуального скрининга производных хлорамфениколамина, основанного на имеющихся структурных данных комплексов хлорамфеникола с рибосомой с помощью их докинга в свободную рибосому, но не ограниченного включениями в структуру пептидных фрагментов, может позволить добиться такой аффинности соответствующих

аналогов, которая будет достаточна для конкуренции с растущей пептидной цепью в ходе трансляции и не будет связана с контекстной специфичностью исходного антибиотика.

Таким образом, в настоящей работе показано, что виртуальный скрининг на основе молекулярного докинга позволяет предсказать относительную аффинность пептидных аналогов хлорамфеникола к бактериальной рибосоме, так же как и рациональный дизайн на основе известных ингибиторов трансляции. Среди трипептидных аналогов хлорамфеникола катионные аналоги способны связываться с рибосомой наиболее прочно, а экспериментально полученные и рассчитанные значения эффективностей лигандов коррелируют между собой. Аналог RAW-CAM в экспериментах по ингибированию биосинтеза белка *in vitro* проявляет активность, близкую к хлорамфениколу, что подтверждается данными химического пробинга, указывающими на то, что по характеру связывания в РТ этот аналог сходен с немодифицированным хлорамфениколом.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-00873-а (синтез аналогов, молекулярный докинг, связывание с рибосомами) и № 19-34-51021 (*in vitro* трансляция, пробинг)). Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

**Благодарности.** Мы благодарим А.А. Богданова за инициирование и поддержку работ по изучению пептидных производных рибосомных антибиотиков. Авторы также благодарят А.Л. Коневега за предоставленные для работы рибосомы и BODIPY-Met-tRNA; М.В. Серебрякову за масс-спектрометрические анализы; Ю.К. Гришина за ЯМР-спектры.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 11, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, **289**, 905-920, doi: 10.1126/science.289.5481.905.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, **289**, 920-930, doi: 10.1126/science.289.5481.920.
- Harms, J., Schlutzenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a *Mesophilic Eubacterium*, *Cell*, **107**, 679-688, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00546-3.
- Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., and Korshunova, G. A. (2010) Ribosomal tunnel and translation regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1501-1516, doi: 10.1134/S0006297910130018.
- Duc, K. D., Batr, S. S., Bhattacharya, N., Cate, J. H. D., and Song, Y. S. (2019) Differences in the path to exit the ribosome across the three domains of life, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4198-4210, doi: 10.1093/nar/gkz106.
- Gupta, P., Liu, B., Klepacki, D., Gupta, V., Sschulten, K., Mankin, A., and Vázquez-Laslop, N. (2016) Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules, *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 153-158, doi: 10.1038/nchembio.1998.
- Wilson, D. N., Arenz, S., and Beckmann, R. (2016) Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **37**, 123-133, doi: 10.1016/j.sbi.2016.01.008.
- Gamerding, M., Kobayashi, K., Wallisch, A., Kreft, S. G., Sailer, C., et al. (2019) Early scanning of nascent polypeptides inside the ribosomal tunnel by NAC, *Mol. Cell*, **75**, 996-1006, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.030.
- Hansen, J. L., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit, *J. Mol. Biol.*, **330**, 1061-1075, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00668-5.
- LaMarre, J., Mendes, R. E., Szal, T., Schwarz, S., Jones, R. N., and Mankin, A. S. (2013) The genetic environment of the *cfp* gene and the presence of other mechanisms account for the very high linezolid resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolate 426-3147L, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 1173-1179, doi: 10.1128/AAC.02047-12.
- Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117, doi: 10.1038/emboj.2010.180.
- Polikanov, Y. S., Aleksashin, N. A., Beckert, B., and Wilson, D. N. (2018) The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics, *Front. Mol. Biosci.*, **5**, 48, doi: 10.3389/fmolb.2018.00048.
- Arenz, S., Meydan, S., Starosta, A. L., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., and Wilson, D. N. (2014) Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation, *Mol. Cell*, **56**, 446-452, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.014.
- Arenz, S., Ramu, H., Gupta, P., Berninghausen, O., Beckmann, R., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Wilson, D. N. (2014) Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide, *Nat. Commun.*, **5**, 3501-3516, doi: 10.1038/ncomms4501.
- Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., and Cate, J. H. D. (2010) Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17152-17157, doi: 10.1073/pnas.1007988107.
- Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., and Steitz, T. A. (2015) The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 466-469, doi: 10.1038/nsmb.3031.
- Seefeldt, A. C., Nguyen, F., Antunes, S., Pérébasquine, N., Graf, M., et al. (2015) The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 470-475, doi: 10.1038/nsmb.3034.
- Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., et al. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
- Pérébasquine, N., Gambato, S., Mardirossian, M., Hofmann, S., Müller, C., et al. (2018) The dolphin proline-rich antimicrobial peptide Tur1a inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome, *Cell Chem. Biol.*, **25**, 530-539, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.004.
- Gagnon, M. G., Roy, R. N., Lomakin, I. B., Florin, T., Mankin, A. S., and Steitz, T. A. (2016) Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2439-2450, doi: 10.1093/nar/gkw018.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., and Straus, S. (2018) Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*, *Biomolecules*, **8**, 4-27, doi: 10.3390/biom8010004.
- Mamos, P., Krokidis, M. G., Papadas, A., Karahalios, P., Starosta, A. L., Wilson, D. N., Kalpaxis, D. L., and Dinos, G. P. (2013) On the use of the antibiotic chloramphenicol to target polypeptide chain mimics to the ribosomal exit tunnel, *Biochimie*, **95**, 1765-1772, doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.004.
- Tereshchenkov, A. G., Shishkina, A. V., Tashlitsky, V. N., Korshunova, G. A., Bogdanov, A. A., Sumbatyan, N. V. (2016) Interaction of chloramphenicol tripeptide analogues with the ribosome, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 392-400, doi: 10.1134/S000629791604009X.
- Tereshchenkov, A. G., Dobosz-Bartoszek, M., Osterman, I. A., Marks, J., Sergeeva, V. A., et al. (2018) Binding action of amino-acid analogues of chloramphenicol upon the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **430**, 842-852, doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.016.
- Graf, M., Mardirossian, M., Nguyen, F., Seefeldt, A. C., Guichard, G., Scocchi, M., Innis, C. A., Wilson, D. N. (2017) Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis, *Nat. Prod. Rep.*, **34**, 702-711, doi: 10.1039/C7NP00020K.
- Knappe, D., Ruden, S., Langanke, S., Tikko, T., Ritzer, J., Mikut, R., Martin, L. L., Hoffmann, R., and Hilpert, K. (2016) Optimization of oncocin for antibacterial activity using a SPOT synthesis approach: extending the pathogen spectrum to *Staphylococcus aureus*, *Amino Acids*, **48**, 269-280, doi: 10.1007/s00726-015-2082-2.
- Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., Ding, C. Z., and Ma, Z. (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of BODIPY®-erythromycin probes for bacterial ribosomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 794-797, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.028.
- Ji, J., Chakraborty, A., Geng, M., Zhang, X., Amini, A., Bina, M., and Regnier, F. (2000) Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides, *J. Chromatogr. B*, **745**, 197-210, doi: 10.1016/s0378-4347(00)00192-4.
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G. R. (2011) Open babel: an open chemical toolbox, *J. Cheminformatics*, **3**, 33, doi: 10.1186/1758-2946-3-33.
- Stewart, J. J. P. (2012) Optimization of parameters for semi-empirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, *J. Mol. Model.*, **19**, 1-32, doi: 10.1007/s00894-012-1667-x.

31. Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
32. Alhossary, A., Handoko, S. D., Mu, Y., and Kwok, C.-K. (2015) Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2, *Bioinformatics*, **31**, 2214-2216, doi: 10.1093/bioinformatics/btv082.
33. Rebstock, M. C., Crooks, H. M., Controulis, J., and Bartz, Q. R. (1949) Chloramphenicol (chloromycetin). IV. Chemical studies, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2458-2462, doi: 10.1021/ja01175a065.
34. Yan, K., Hunt, E., Berge, J., May, E., Copeland, R. A., and Gontarek, R. R. (2005) Fluorescence polarization method to characterize macrolide-ribosome interactions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3367-3372, doi: 10.1128/AAC.49.8.3367-3372.2005.
35. Wang, Z. X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Lett.*, **360**, 111-114, doi: 10.1016/0014-5793(95)00062-e.
36. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites, *Cell*, **57**, 585-597, doi: 10.1016/0092-8674(89)90128-1.
37. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome, *Nature*, **342**, 142-148, doi: 10.1038/342142a0.
38. Svetlov, M. S., Plessa, E., Chen, C.-W., Bougas, A., Krokidis, M. G., Dinos, G. P., and Polikanov, Y. S. (2019) High-resolution crystal structures of ribosome-bound chloramphenicol and erythromycin provide the ultimate basis for their competition, *RNA*, **25**, 600-606, doi: 10.1261/rna.069260.118.
39. Ashwood, M. S., Bishop, C. B., Cottrell, I. F., Emerson, K. M., Hands, D., Ho, G. J., Lynch, J. E., Shi, Y. J., and Wilson, R. D. (2003) Process for preparing peptide intermediates, *European Patent Office*, EP1226158A1.
40. Kostopoulou, O., Kourelis, T., Mamos, P., Magoulas, G., and Kalpaxis, D. (2011) Insights into the chloramphenicol inhibition effect on peptidyl transferase activity, using two new analogs of the drug, *Open Enzym. Inhib. J.*, **411**, 1-10, doi: 10.2174/1874940201104010001.
41. Bollhagen, R., Schmiedberger, M., Barlos, K., and Grell, E. (1994) A new reagent for the cleavage of fully protected peptides synthesised on 2-chlorotrityl chloride resin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **22**, 2559-2560, doi: 10.1039/C39940002559.
42. Kuntz, I. D., Chen, K., Sharp, K. A., and Kollman, P. A. (1999) The maximal affinity of ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9997-10002, doi: 10.1073/pnas.96.18.9997.
43. Poulsen, S. M., Kofoed, C., and Vester, B. (2000) Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin, *J. Mol. Biol.*, **304**, 471-481, doi: 10.1006/jmbi.2000.4229.
44. Choi, J., Marks, J., Zhang, J., Chen, D. H., Wang, J., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A. S., and Puglisi, J. D. (2019) Dynamics of the context-specific translation arrest by chloramphenicol and linezolid, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 310-317, doi: 10.1038/s41589-019-0423-2.
45. Marks, J., Kannan, K., Roncase, E. J., Klepacki, D., Kefi, A., Orelle, C., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2016) Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12150-12155, doi: 10.1073/pnas.1613055113.
46. Makarov, G. I., and Makarova, T. M. (2018) A noncanonical binding site of chloramphenicol revealed via molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 2940-2947, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.09.012.

## INTERACTION OF CHLORAMPHENICOL CATIONIC PEPTIDE ANALOGUES WITH THE RIBOSOME

**Z. Z. Khairullina<sup>1#</sup>, A. G. Tereshchenkov<sup>2#</sup>, S. A. Zavyalova<sup>3</sup>, E. S. Komarova<sup>4,5</sup>,  
D. A. Lukianov<sup>5</sup>, V. N. Tashlitsky<sup>1</sup>, I. A. Osterman<sup>1,5</sup>, and N. V. Sumbatyan<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia;  
E-mail: sumbtyan@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology  
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 143025 Moscow, Russia

Received July 13, 2020  
Revised September 7, 2020  
Accepted September 9, 2020

Virtual screening of all possible tripeptide analogues of chloramphenicol was performed using molecular docking to evaluate their affinity to bacterial ribosomes. Chloramphenicol analogues that demonstrated the lowest calculated energy of interaction with ribosomes were synthesized. Chloramphenicol amine (CAM) derivatives, which contained specific peptide fragments from the proline-rich antimicrobial peptides were produced. It was demonstrated using displacement of the fluorescent erythromycin analogue from its complex with ribosomes that the novel peptide analogues of chloramphenicol were able to bind bacterial ribosome; all the designed tripeptide analogues and one of the chloramphenicol amine derivatives containing fragment of the proline-rich antimicrobial peptides exhibited significantly greater affinity to *Escherichia coli* ribosome than chloramphenicol. Correlation between the calculated and experimentally evaluated levels of the ligand efficiencies was observed. *In vitro* protein biosynthesis inhibition assay revealed, that the RAW-CAM analogue shows activity at the level of chloramphenicol. These data were confirmed by the chemical probing assay, according to which binding pattern of this analogue in the nascent peptide exit tunnel was similar to chloramphenicol.

**Keywords:** ribosome, chloramphenicol, peptide derivatives, molecular docking, antimicrobial peptides, nascent peptide exit tunnel