

КОНЪЮГАТЫ ДЕСМИКОЗИНА С ФРАГМЕНТАМИ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ОНКОЦИНА: СИНТЕЗ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РИБОСОМОЙ

© 2022 З.З. Хайруллина¹, Г.И. Макаров², А.Г. Терещенков³, В.С. Буев⁴,
Д.А. Лукьянов^{1,5}, В.И. Польшаков⁶, В.Н. Ташлицкий¹, И.А. Остерман^{1,5}, Н.В. Сумбатьян^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sumbtyan@belozersky.msu.ru

² Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет),
454080 Челябинск, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

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

⁵ Сколковский институт науки и технологий, 143025 Сколково, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.05.2022

После доработки 17.06.2022

Принята к публикации 18.06.2022

С целью развития подходов к созданию новых антимикробных соединений осуществлены дизайн и синтез конъюгатов, сочетающих в структуре макролидный антибиотик десмикозин и фрагменты антимикробного пептида онкоцина. Показано, что новые соединения способны связываться с 70S-рибосомами *Escherichia coli* подобно десмикозину и онкоцину, ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro*, а также подавлять рост бактериальных штаммов. Конъюгаты гекса- и тетрапептидных *N*-концевых фрагментов онкоцина с 3,2',4"-триацетилдесмикозином оказались активными в отношении штаммов, резистентных к макролидам. Методом молекулярной динамики найдены структурные особенности взаимодействий этих производных с бактериальными рибосомами, в том числе содержащими мутацию A2059G в 23S РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: макролиды, пептидные производные, антимикробные пептиды, рибосома, молекулярная динамика, рибосомный туннель.

DOI: 10.31857/S0320972522070065, EDN: AVTKLC

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам представляет серьёзную проблему при их применении на практике, и способом решения этой проблемы является

разработка новых эффективных и безопасных антибиотиков. Одним из подходов к созданию новых антимикробных соединений является рациональный дизайн, основанный на знаниях о механизмах действия известных антибиотиков и их молекулярной мишени [1–4].

Принятые сокращения: МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ПТЦ – пептидил-трансферазный центр; РТ – рибосомный туннель; Вос – *трет*-бутилоксикарбонил; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид; DES – десмикозин; DIPEA – диизопропилэтиламин; DMAР – диметиламинопиридин; DMF – *N,N*-диметилформамид; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил; ERY – эритромицин; HBTU – *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурионий гексафторфосфат; HFIP – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол; GABA – 4-аминобутановая кислота; MALDI-TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия с ионизацией методом матричной десорбции; MBS – сайт связывания макролидов (Macrolide Binding Site); ONC – онкоцин 112 (VDKPPYLPRPRPPRrYNG-NH₂); Pip – пиперидин; RMSF – среднеквадратичная флуктуация атомов (Root-Mean-Square Fluctuation); TFA – трифторуксусная кислота; TYL – тилозин.

* Адресат для корреспонденции.

Макролиды представляют собой класс антибиотиков, структура которых включает лактонное кольцо с присоединёнными к нему углеводными остатками; действуя на бактериальные рибосомы, макролиды проявляют активность в отношении многих патогенов, вследствие чего находят широкое применение в медицинской и ветеринарной практике [5–7]. Механизм действия макролидов заключается в том, что антибиотики связываются в начальном участке рибосомного туннеля (РТ) бактерий в непосредственной близости к пептидил-трансферазному центру (ПТЦ) в так называемом сайте связывания макролидов (MBS), при этом макролиды избирательно ингибируют трансляцию бактериальных белков, причём их действие зависит не только от структуры антибиотика, но и от последовательности растущей пептидной цепи, т.е. является контекстно-специфичным [8–10]. Известны различные механизмы формирования резистентности у бактерий к макролидным антибиотикам, среди которых основную роль играет модификация мишени их действия, т.е. нуклеотидов 23S рНК и белков 50S-субъединицы бактериальной рибосомы в области MBS [7, 11, 12]. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате моно- и диметилирования N6-аминогруппы нуклеотида A2058* под действием метилтрансфераз семейства Erm (Erythromycin resistance methyltransferases), метилирования G748, а также некоторых других пуриновых нуклеотидов доменов II и V 23S рНК [13, 14]. Регуляция экспрессии генов устойчивости, в частности тех или иных метилтрансфераз, связана с образованием тройного комплекса рибосома–макролид–растущий пептид [8]. У ряда микроорганизмов устойчивость к макролидам возникает в результате мутаций в домене V 23S рНК, чаще всего встречаются замена нуклеотида A2062 на C (реже – на другие нуклеотиды), мутации A2058G, A2059G и некоторых других нуклеотидных остатков, а также мутации и делеции в белках L4 и L22.

Макролиды на основе 16-членного лактона, основными представителями которых являются антибиотики тилозинового ряда: тилозин (TYL) и десмикозин (DES) [15–17], обладают некоторыми преимуществами по отношению к другим представителям этого класса как за счёт благоприятных фармакологических свойств, так и благодаря их активности в отношении определённых устойчивых штаммов бактерий [18]. Кроме того, антибиотики тило-

зинового ряда оказались способны действовать на некоторые «необычные» рибосомы, в частности рибосомы апикопластов малярийных плазмодиев [19–21] или бактерии вольбахии, внутриклеточного симбионта круглых червей филярий [22], и проявлять активность в отношении возбудителей некоторых трудно поддающихся лечению тропических болезней.

В первые десятилетия после того, как были найдены TYL, DES и другие антибиотики этого ряда, было синтезировано множество их производных по разным функциональным группам лактонного кольца и углеводных остатков, многие из этих аналогов оказались активны в отношении клинически значимых бактериальных штаммов [23–25]. В том числе было показано, что введение заместителей по 4'- и 4"-гидроксилам микаминозы и микарозы приводит к аналогам, способным действовать против устойчивых штаммов бактерий [26, 27]. С тех пор как были расшифрованы структуры бактериальных рибосом и их комплексов с антибиотиками [28–31], появилась возможность не только детального объяснения механизма действия макролидов, механизмов возникновения устойчивости бактерий к ним и причин активности многих синтетических аналогов антибиотиков, но и рационального дизайна аналогов макролидных антибиотиков [32–35]. С целью изучения взаимодействий пептидной цепи с элементами РТ был синтезирован ряд пептидных аналогов TYL, DES и O-микаминозилтилонолида, в которых антибиотик служил якорем для закрепления пептида в РТ [12, 36–38], эти аналоги связывались с бактериальными рибосомами, ингибировали бактериальную трансляцию *in vitro* и проявляли антибиотическую активность, однако не действовали в отношении устойчивых штаммов бактерий.

Около 20 лет назад были описаны антимикробные пептиды онкоцины, а сравнительно недавно было обнаружено, что их действие направлено на рибосомы бактерий [39, 40]. Онкоцины связываются в РТ, практически полностью его блокируя, и препятствуют встраиванию аминоацил-тРНК, что позволяет образоваться инициаторному комплексу, но препятствует следующему шагу трансляции [41, 42]. Ориентация онкоцинов при связывании противоположна ориентации синтезируемой пептидной цепи – N-конец направлен в сторону ПТЦ, а C-конец – в сторону выхода из РТ. Область связывания этих пептидов перекрывается с сайтами связывания большинства антибиотиков, целью которых является рибосома, в частности, макролидов [41, 43, 44].

* Здесь и далее номера н.о. приводятся по последовательности 23S рНК рибосомы *Escherichia coli*.

В настоящей работе с целью развития подходов к созданию новых антимикробных соединений осуществлены дизайн и синтез, протестированы антибактериальные свойства и изучены взаимодействия с рибосомой новых конъюгатов, сочетающих в структуре макролидный антибиотик десмикозин и фрагменты антимикробного пептида онкоцина. Дизайн соединений осуществлён методом статического моделирования; аффинность соединений к рибосомам оценена по вытеснению ими флуоресцентно меченного аналога эритромицина (ERY) из комплексов с 70S-рибосомами *E. coli*; способность новых соединений ингибировать биосинтез белка и подавлять рост бактерий протестирована *in vitro* и на ряде бактериальных штаммов; с помощью метода молекулярной динамики проведён поиск возможных взаимодействий этих соединений в комплексах с бактериальными рибосомами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реагенты и растворители следующего производства: 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (HFIP, «Acros Organics», Бельгия); носитель для твердофазного синтеза, содержащий 2-хлортритилхлоридную группировку (2CTC Resin) и производные L-аминокислот («Iris Biotech», Германия); 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC), *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуроний гексафторфосфат (HBTU), диизопропилэтиламин (DIPEA) («Sigma-Aldrich», США, Швейцария); диметиламинопиридин (DMAP, «Serva», США); 4-аминобутановая кислота (GABA, «Reanal», Венгрия); трифторуксусная кислота (TFA, «PanReac AppliChem», Германия) и абсолютные растворители: метанол («LiChrosolv», Германия); изопропанол, диоксан, пиридин, *N,N*-диметилформамид (DMF), CH₂Cl₂, ацетонитрил («PanReac AppliChem», США), а также растворители российского производства фирм «Химмед» и «Иреа2000». TYL (4) был выделен из препарата «Тилозин 200» (ЗАО «Нита-Фарм», Россия) с помощью метода колоночной хроматографии на силикагеле в системе CHCl₃/MeOH = 15/1. Флуоресцентное производное эритромицина BODIPY-ERY было синтезировано по известной методике [45].

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; «Marcherey Nagel», Германия). Соединения, содержащие группы, поглощающие в УФ-об-

ласти, обнаруживали с помощью УФ-кабинета («Camag», Англия); соединения, содержащие свободные либо защищенные *трет*-бутилоксикарбониллом (Boc) аминокруппы – нингидриновым реактивом.

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

Хромато-масс-спектрометрию осуществляли с помощью системы UPLC/MS/MS, состоящей из хроматографа Acquity UPLC («Waters», США) и квадрупольного масс-спектрометра TQD («Waters») с регистрацией позитивных ионов с помощью метода ESI MS, с использованием колонки Acquity BEH C18, 1,7 мкм, 50 × 2,1 мм («Waters»), 0.5 мл/мин, при 35 °С с градиентом 5–100% CH₃CN в 20 mM HCOOH за 4 мин.

Спектры MALDI-TOF MS получали на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре «Ultrafle Xtreme Bruker Daltonics» («Bruker», Германия), оснащённом УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

Спектры ЯМР соединений регистрировали на спектрометре «Bruker Avance» («Bruker»), рабочие частоты составляли 600 МГц для ¹H и 151 МГц – для ¹³C при 298 К в DMSO-*d*₆ с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Отнесение сигналов ¹H и ¹³C было осуществлено с использованием одномерных спектров ¹H и ¹³C и двумерных ¹H-¹H ROESY (время смешивания 320 мс), ¹H-¹H DQF-COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹³C-¹H HSQC и ¹³C-¹H HMBSC. Спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения NMRPipe [46] с использованием стандартного протокола, включающего взвешивающую функцию Лоренца–Гаусса, метод прямого-обратного линейного предсказания и метод полиномиальной коррекции базовой линии. Спектры одномерного ЯМР обрабатывали и анализировали с помощью программы Mnova («Mestrelab Research», Испания). Двумерные спектры анализировали с помощью программного обеспечения NMRFAM-Sparky [47].

Анизотропию 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.

Дизайн молекул выполняли с помощью метода статического моделирования с использованием программного обеспечения Avogadro [48]

и PyMOL 2.6 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6 Schrödinger, LLC).

Синтез пептидных производных десмикозина. Синтез пептидов *Fmoc-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**1a**), *Fmoc-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**2a**), *Boc-Val-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Tyr(tBu)-OH* (**3a**) описан в «Приложении», схема синтеза пептидов представлена на рис. S1 в Приложении.

3,2',4'',4'''-О-тетраацетил-тилозин (5). TYL (**4**) (512 мг; 0,56 ммоль; 1 экв.) растворяли в пиридине (5 мл) и добавляли уксусный ангидрид (290 мкл; 3,1 ммоль; 5,5 экв.). Раствор перемешивали сутки при комнатной температуре. Пиридин удаляли на роторном вакуумном испарителе в смеси с бензолом. Продукт очищали на силикагеле в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 479 мг (79%; 0,44 ммоль); ТСХ: R_f 0,43 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{NO}_{21} + \text{H}]^+ - 1084,6$; найдено – 1084,6.

3,2',4''-О-триацетил-десмикозин (6). Ацетилированное производное тилозина (**5**) (359 мг; 0,33 ммоль; 1 экв.) растворяли в небольшом количестве ацетонитрила и добавляли 5,92 мл 0,2 N HCl (3,6 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре несколько часов до достижения полного гидролиза, который контролировали по ТСХ в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. По окончании реакции смесь нейтрализовали с помощью 5%-ного раствора NaHCO_3 , экстрагировали хлороформом, промывали насыщенным раствором NaCl и сушили над б/в Na_2SO_4 . Очистку продукта проводили с использованием колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 236 мг (80%; 0,26 ммоль); ТСХ: R_f 0,29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); R_f 0,31 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/19\% \text{NH}_4\text{OH} = 16/1/0,1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{NO}_{17} + \text{H}]^+ - 898,5$; найдено – 898,6.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]бутаноил)-десмикозин (7). Производное **6** (208 мг; 0,23 ммоль; 1 экв.) и Boc-GABA (94 мг; 0,46 ммоль; 2 экв.) растворяли в хлористом метиле (абс.) при 0 °C. Далее последовательно добавляли DCC (143 мг; 0,69 ммоль; 3 экв.) и DMAP (42 мг; 0,34 ммоль; 1,5 экв.). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на ночь. Растворитель удаляли на роторном вакуумном испарителе, образовавшийся осадок растворяли в ацетонитриле и отделяли от осадка дициклогексилмочевины фильтрованием. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$. Выход: 137 мг (57%; 0,13 ммоль); ТСХ: R_f 0,51 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_{20} + \text{H}]^+ -$

1083,6; найдено – 1083,6. ^1H ЯМР, COSY, TOCSY, ROESY, HMBC, HSQC (CDCl_3 ; 600 MHz) δ (ppm): 0,84 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, H17); 0,85–0,88 (m, 3H, H18); 1,04–1,07 (m, 3H, H6'); 1,10 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, H6''); 1,15 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H, H21); 1,36 (s, 9H, H4'h); 1,45–1,48 (m, 1H, H7^a); 1,50–1,57 (m, 3H, H4, H7^b, H16^a); 1,73–1,75 (m, 5H, H22, H4'c); 1,77–1,81 (m, 1H, H16^b); 1,85 (br d, $J = 3,8$ Hz, 1H, H2^a); 1,98 (s, 3H, H2'b); 2,04 (s, 3H, H4''b); 2,08 (s, 3H, H3b); 2,25–2,28 (m, 8H, H4'b, H3'a); 2,31–2,40 (m, 1H, H6); 2,40–2,56 (m, 3H, H8, H19^a, H2^b); 2,64–2,73 (m, 2H, H19^b, H3'); 2,94–2,99 (m, 2H, H14, H2''); 3,07–3,11 (m, 2H, H4d); 3,30–3,36 (m, 1H, H5'); 3,38 (s, 3H, H2''a); 3,45 (s, 3H, H3''a); 3,46–3,52 (m, 1H, H23^a); 3,55 (brd, $J = 10,1$ Hz, 1H, H5); 3,74 (br d, $J = 10,1$ Hz, 1H, H3); 3,80–3,86 (m, 2H, H3'', H5''); 3,90 (dd, $J = 9,7, 4,5$ Hz, 1H, H23^b); 4,24 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H1'); 4,37 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H4''); 4,55 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H1''); 4,64 (td, $J = 9,9, 3,7$ Hz, 1H, H4'); 4,70–4,76 (m, 1H, H15); 4,81–4,86 (m, 2H, H2', H4'e); 5,84 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H, H13); 6,23 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, H10); 7,32 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H, H11); 9,61 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H20). ^{13}C ЯМР, HMBC, HSQC (CDCl_3 , 151 MHz) δ (ppm): 7,55 (C18); 8,41 (C17); 12,12 (C22); 16,35 (C6''); 16,36 (C6'); 16,42 (C21); 19,65 (C3b); 19,87 (C4''b); 20,29 (C2'b); 24,13 (C4'c); 24,61 (C16); 27,29 (3C, C4'h); 30,81 (C4'b); 30,96 (C7); 31,53 (C6); 38,25 (C2); 38,70 (C4'd); 39,72 (C4); 40,30 (2C, C3'a); 42,71 (C19); 43,27 (C14); 44,01 (C8); 58,39 (C2''a); 60,48 (C3'a); 65,69 (C3); 66,07 (C3''); 66,30 (C5''); 68,72 (C23); 69,42 (C2'); 69,99 (C5'); 70,29 (C4'); 73,67 (C4''); 74,02 (C15); 76,64 (C3'''); 78,07 (C4'g); 79,52 (C2''); 79,69 (C5); 100,05 (C1''); 100,73 (C1'); 117,55 (C10); 133,85 (C12); 140,45 (C13); 146,95 (C11); 154,84 (C4'f); 168,06 (C2'a); 169,02 (C4'a); 169,84 (C3a); 171,02 (C4'a); 172,62 (C1); 201,54 (C20); 202,31 (C9).

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(4-аминобутаноил)-десмикозин (8). Соединение **7** (76 мг; 0,070 ммоль) растворяли в 3 мл 50%-ной TFA в CH_2Cl_2 при 0 °C и перемешивали в течение 1 ч. Летучие компоненты смеси удаляли на роторном вакуумном испарителе, остаток растворяли в небольшом объеме CH_2Cl_2 и осаждали диэтиловым эфиром, осадок центрифугировали, переосаждали продукт таким образом ещё несколько раз, сушили на воздухе. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход: 16 мг (23%; 0,016 ммоль); ТСХ: R_f 0,17 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{18} + \text{H}]^+ - 983,5$; найдено – 983,7.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[[N(2-флуоретилметоксикарбонил)-N(6-трет-бутоксикарбонил)-L-лизил]-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9a). Защищённый тетрапептид **1a** (54 мг; 61 мкмоль; 1,5 экв.) растворяли в DMF и добав-

ляли HVTU (31 мг; 82 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (21 мкл; 123 мкмоль; 3 экв.) и перемешивали в течение 15 мин. Далее в смесь добавляли производное **8** (40 мг; 41 мкмоль; 1 экв.). Затем по истечении 20 мин добавляли 20% DIPEA от исходного количества (4,2 мкл). Смесь оставляли перемешиваться на ночь, затем разбавляли водой в несколько раз и экстрагировали смесью гексан/этилацетат = (1/1). Органическую фазу последовательно промывали небольшими объёмами 0,1 М HCl, воды и 5%-ного раствора NaHCO₃. Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 23 мг (29%; 12 мкмоль); ТСХ: R_f 0,42 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₉₈H₁₃₉N₇O₂₇ + H]⁺ – 1847,0; найдено – 1846,8.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[(N-флуоренилметоксикарбонил)-О-трет-бутил-L-аспартил]-(N6-трет-бутоксикарбонил-L-лизил)-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9b). Получали аналогично **9a**, исходя из 41 мг (39 мкмоль; 1,3 экв.) защищённого пентапептида **2a**, HVTU (23 мг; 60 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (19 мкл; 107 мкмоль; 3,6 экв.), производного **8** (29 мг; 30 мкмоль; 1 экв.). Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 9 мг (15%; 4,5 мкмоль); ТСХ: R_f 0,35 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₁₀₆H₁₅₂N₈O₃₀ + H]⁺ – 2018,1; найдено – 2017,8.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-[(N-трет-бутил-оксикарбонил-L-валил)-(О-трет-бутил-L-аспартил)-(N6-трет-бутоксикарбонил-L-лизил)-L-пролил-L-пролил-(О-трет-бутил-L-тирозил)-4-аминобутаноил]-десмикозин (9c). Получали аналогично **9a**, исходя из 80 мг защищённого гексапептида (**3a**) (78 мкмоль; 1,5 экв.), HVTU (39 мг; 103 мкмоль; 2 экв.), DIPEA (32 мкл; 185 мкмоль; 3,6 экв.), производного **8** (51 мг; 52 мкмоль; 1 экв.). Очистку целевого соединения проводили в системе CHCl₃/MeOH = 20/1. Выход: 30 мг (29%; 15 мкмоль); ТСХ: R_f 0,3 (CHCl₃/MeOH = 20/1); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₁₀₁H₁₅₉N₉O₃₁ + H]⁺ – 1995,1; найдено – 1994,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (1). Соединение **9a** массой 16 мг (8,7 мкмоль) растворяли в 500 мкл 20%-ного раствора пиперидина (Pip) в DMF. Смесь перемешивали в течение 40 мин при комнатной температуре. Далее продукт осаждали из раствора петролейным эфиром, осадок отделяли центрифугированием, и вещество переосаждали таким образом несколько раз. Полученный твёрдый остаток добавляли к 500 мкл 50%-ной TFA в хлори-

стом метиле при 0 °С, и смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Далее TFA и растворитель удаляли в вакууме. Получившийся сухой остаток растворяли в небольшом количестве хлористого метилена и осаждали диэтиловым эфиром, осадок отделяли центрифугированием, затем полученный продукт переосаждали таким образом несколько раз. Выход: 1 мг (8%; 0,68 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₇₄H₁₁₃N₇O₂₃ + H]⁺ – 1468,8; найдено – 1468,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-аспартил-L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (2) получали аналогично **1** исходя из **9b** (9 мг; 4,5 мкмоль). Выход: 1 мг (14%; 0,63 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₇₈H₁₁₈N₈O₂₆ + H]⁺ – 1583,8; найдено – 1583,9.

3,2',4''-О-триацетил-4'-О-(L-валил-L-аспартил-L-лизил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-4-аминобутаноил)-десмикозин (3). Соединение **9c** (30 мг; 15 мкмоль) растворяли в 500 мкл 50%-ной TFA в хлористом метиле при 0 °С и перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Далее TFA и растворитель удаляли в вакууме. Получившийся сухой остаток растворяли в небольшом количестве хлористого метилена и осаждали диэтиловым эфиром, осадок отделяли центрифугированием, затем полученный продукт переосаждали несколько раз. Выход: 5 мг (20%; 3,0 мкмоль); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для [C₈₃H₁₂₇N₉O₂₇ + H]⁺ – 1682,9; найдено – 1683,0.

Изучение связывания аналогов десмикозина с рибосомами *E. coli*. Аффинность соединений к 70S-рибосомам *E. coli* (штамм MRE-600 (70S-рибосомы *E. coli* были любезно предоставлены лабораторией А.Л. Коневеги)) определяли методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина – BODIPY-ERY, как было описано ранее [49, 50]. Концентрации исследуемых веществ варьировались от 1 нМ до 10 мкМ. Концентрация 70S-рибосом *E. coli* и BODIPY-ERY составляла 50 и 16 нМ соответственно. Смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем измеряли уровень анизотропии флуоресценции. Для каждого соединения было выполнено минимум 2 повтора. Расчёт эффективных констант диссоциации был проведён на основе стандартной модели, которая описывает равновесное конкурентное связывание двух лигандов в одном сайте [51].

In vitro трансляция. Ингибирование синтеза белка в бесклеточной системе проводили на основе системы трансляции люциферазы светлячка, как было описано ранее [52] –

T7-транскрибируемая мРНК (*Fluc*) люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) транслировалась в бесклеточной S30-системе *E. coli* согласно известной методике [53]. Концентрация исследуемых соединений составляла 20 мкМ, уровень трансляции *in vitro* после инкубирования измеряли с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System («Promega», США) на планшетном мультиридере «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader».

Тестирование на антибиотическую активность проводили на следующих штаммах: *E. coli* JW5503 *ΔtolC*, модифицированном репортёрной последовательностью *pDualrep2* [54, 55], в котором остановка процесса трансляции приводит к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S; *E. coli* JW5503 *ΔtolC KanR*, резистентный к канамицину; *E. coli* JW5503 *ΔtolC*, модифицированном плазмидой *pKH80* [56], обеспечивающей устойчивость к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, трансформированном плазмидой *pAM552* [57]; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, модифицированном *pAM552* с заменой A2058G в 23S рРНК; *E. coli* SQ171 *ΔtolC*, модифицированном *pAM552* с заменой A2059G в 23S рРНК (плазмиды *pAM552*, содержащие замены A2058G и A2059G, были любезно предоставлены А.С. Манькиным (Иллинойсский университет в Чикаго)). Тестируемые соединения в количестве 10 нмоль, а также эритромицин в количестве 6,8 нмоль наносили на чашки с агаром, которые уже содержали соответствующий штамм. Чашки инкубировали при 37 °С в течение ночи, уровень экспрессии флуоресцентных белков в штамме, содержащем плазмиду *pDualrep2*, и зоны ингибирования бактериального роста в остальных штаммах оценивали с помощью системы визуализации ChemiDoc («Bio-Rad», США).

Измерение минимальной ингибирующей концентрации проводили на следующих штаммах: *E. coli* JW5503 *ΔtolC KanR*, *E. coli* JW5503 *ΔtolC pKH80*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552 A2058G*, *E. coli* SQ171 *ΔtolC pAM552 A2059G*. Для проведения эксперимента 96-луночный планшет заполняли суспензией клеток, полученной путём разбавления ночной культуры в 200 раз в среде LB («Amresco», США). В ячейки первого ряда добавляли 4 мкл тестируемого соединения (в концентрации 4–68 мМ в ДМСО), после чего готовили серию двукратных разведений в последующих рядах до десятого. После этого планшеты инкубировали при 37 °С в течение ночи с аэрацией 200 об./мин. О концентрации клеток судили по значению оптической

плотности при 600 нм. Измерение проводили на планшетном мультиридере «VICTOR X5 Multilabel Plate Reader». В качестве минимальной ингибирующей концентрации (МИК) принимали наименьшую концентрацию, при которой исследуемое вещество полностью подавляло рост бактерий.

Молекулярная динамика*. Моделируемая система. Структура рибосомы *E. coli* была получена исходя из данных рентгеноструктурного анализа структуры с разрешением 3,1 Å (PDB ID: 4V7U) [58] с добавлением в 23S рРНК модифицированных оснований в соответствии со сведениями из банка данных [59]. Положения модифицированных оснований были оптимизированы минимизацией энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно с ограниченным использованием памяти [60], за которой следовал расчёт короткой молекулярной динамики. При этом все немодифицированные основания были полностью зафиксированы, тогда как модифицированные основания, ионы и вода двигались, а эритромицин, содержащийся в исходной рентгеновской структуре, был изъят. После оптимизации были выделены все остатки, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь РТ и ПТЦ, так что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликата. Подобный подход использовался в работах ранее [61, 62]. На полученное выделение накладывали структуру рибосомы *Haloarcula marismortui*, имеющую разрешение 3,0 Å (PDB ID: 1K9M) [28], устанавливая в этот фрагмент рибосомы TYL. Затем остаток микарозы удаляли, а конформацию остатка мицинозы в сайте связывания оптимизировали докинггом, применяя пакет rDock [63], сохраняя при этом положение, ориентацию и конформацию лактонного кольца и остатка микаминозы неизменными. При моделировании комплекса онкоцина с рибосомой *E. coli* на то же выделение накладывали структуру комплекса онкоцина I12 (ONC, VDKPPYLPRPRPPRrIYNr-NH₂) с рибосомой *Thermus thermophilus*, имеющую разрешение 2,9 Å (PDB ID: 4Z8C) [43], устанавливая в этот фрагмент ONC.

При моделировании конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (1–3) исходные состояния структуры их комплексов с рибосомой *E. coli* получали, накладывая на описанную выше

* Детализированное описание методов молекулярно-динамического моделирования приведено в Приложении.

структуру комплекса десмикозина *N*-концевые пептиды онкоцина Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶ или Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶ из структуры комплекса ONC с рибосомой *T. thermophilus*. При этом остаток 4-аминобутановой кислоты, соединяющий десмикозиную и онкоциновую части конъюгатов, а также ацетильные группы в 3,2',4"-положениях были смоделированы с помощью программы PyMOL.

В ходе молекулярно-динамического моделирования этилальдегидная группа каждого рассматриваемого производного десмикозина была ковалентно связана с экзоциклической аминогруппой основания A2062 с образованием карбиноламина. При изучении эффекта мутации A2059G в построенных таким образом структурах заменялось соответствующее азотистое основание.

Общие условия моделирования. Все расчёты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводили с использованием пакета GROMACS версия 5.1.4 [64, 65]. Канонические и модифицированные аминокислотные и нуклеотидные остатки моделировали с использованием силового поля Amber14sb [66], а DES и его производные – с помощью силового поля GAFF [67]. При этом оптимизированные трёхмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуемых остатков и соединений получали квантово-химическими расчётами методом Хартри–Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычисляли в модели RESP [68]. Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 25 пс. Для ограничения длин связей с атомами водорода использовали алгоритм LINCS [69]. Моделирование выполнялось при температуре 310 К с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [70] и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [71] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [72] с шагом сетки 0,125 нм и четвёртым порядком интерполяции. Моделируемые системы центрировали в тетрагональной ячейке размером 9,5 × 9,5 × 9,4 нм, заполненной молекулами воды TIP4P_{EW} [73] так, что грани системы были покрыты слоем растворителя в 0,9 нм. Остаточный отрицательный заряд системы был компенсирован ионами калия с оптимизированными параметрами [74], причём добавляемые ионы располагались вблизи отрицатель-

но заряженных групп [75] (программный код был любезно предоставлен А.О. Залевским). Кроме того, часть молекул воды была случайным образом заменена ионами калия, магния и хлорид-анионами с тем, чтобы препятствовать вымыванию противоионов магния и калия в водную фазу; при этом в водной фазе устанавливались концентрации 7 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Остатки, хотя бы один атом которых находится в пределах 0,1 нм от грани моделируемого участка рибосомы, были позиционно ограничены, при этом все остальные могли свободно двигаться.

При моделировании структуры комплекса соединения 3 с рибосомой *E. coli* выполнялись расчёты уравновешенной метадинамики [76] с обменом реплик [77] для введённых ацетильных групп. Расчёт выполняли при помощи пакета PLUMED версия 2.3 [78], работающего в комплексе с пакетом GROMACS версия 5.1.4. Взвешивающий потенциал подстраивали, добавляя к нему одно- и двумерные гауссовы функции высотой 3 кДж/моль и шириной 10 градусов с периодичностью 2500 шагов (5 пс) до тех пор, пока высота гауссиан не достигла порядка 0,1 кДж/моль. Взвешивающий коэффициент составлял 8, использовалось 6 реплик. В ходе этих расчётов подвижность атомов сахарофосфатного остова 23S рРНК была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 1000 кДж/нм², подвижность атомов пептидной части конъюгата была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 10 кДж/нм², а подвижность десмикозиновой части конъюгата, воды, ионов, а также аминокислотных остатков белков рибосомы и азотистых оснований не ограничивалась.

Методы анализа траекторий. Анализ местонахождения и частоты встречаемости водородных связей и стэкинг-взаимодействий производили по описанной ранее методике [79]. Частота встречаемости водородной связи или стэкинг-взаимодействия рассчитывалась как отношение количества кадров траектории, в которых обнаружено соответствующее взаимодействие, к общему количеству кадров в траектории. Кластеризацию проводили методом GROMOS [80]. Также вычисляли значения среднеквадратичной флуктуации атомов (RMSF). RMSF *i*-атома с координатой \mathbf{r}_i на протяжении *T* кадров траектории рассчитывали по формуле:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{(\mathbf{r}_i - \langle \mathbf{r}_i \rangle)^2}{T}}$$

При анализе траекторий значения RMSF атомов усредняли по рассматриваемым молекулам.

Визуализацию полученных данных проводили с помощью программного обеспечения PyMOL 2.6 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.6 Schrödinger, LLC).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Статическое моделирование. С помощью статического моделирования был выполнен дизайн конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина, целью которого было определение оптимальной аминокислотной последовательности в структуре онкоцина (рис. 1, а), с которой может быть осуществлена конъюгация, а также нахождение наиболее подходящего линкера для соединения макролидной и пептидной частей молекулы. Для этого использовали кристаллические структуры TYL в комплексе с рибосомой *H. marismortui* (PDB ID: 1K9M) [28] и ONC в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C) [43], полученные методом рентгеноструктурного анализа (рис. 1, б–г). Наложение структур комплексов бактери-

альных рибосом с TYL и ONC (рис. 1, г) показало, что 4'-О-атом микаминозы TYL находится на расстоянии 5,5 Å от атома азота амидной группы Tyr⁶ ONC. Поэтому в качестве фрагментов онкоцина для присоединения к DES были выбраны тетра-(Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶), пента-(Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶) и гексапептид (Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶). Подходящим по длине линкером для соединения 4'-ОН-группы микаминозы и карбоксильной группы Tyr⁶ оказался остаток 4-аминобутановой кислоты (рис. 1, д).

Синтез. Синтез сконструированных в соответствии с данными статического моделирования конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (1–3) был осуществлён по схеме (рис. 2). На первом этапе проводили ацетилирование TYL с последующим кислотным гидролизом с получением производного десмикозина 6, в структуре которого все гидроксильные группы, кроме 4'-ОН, были ацетилированы. Производное модифицировали с помощью Вос-4-аминобутановой кислоты по 4'-ОН-группе, получая таким обра-

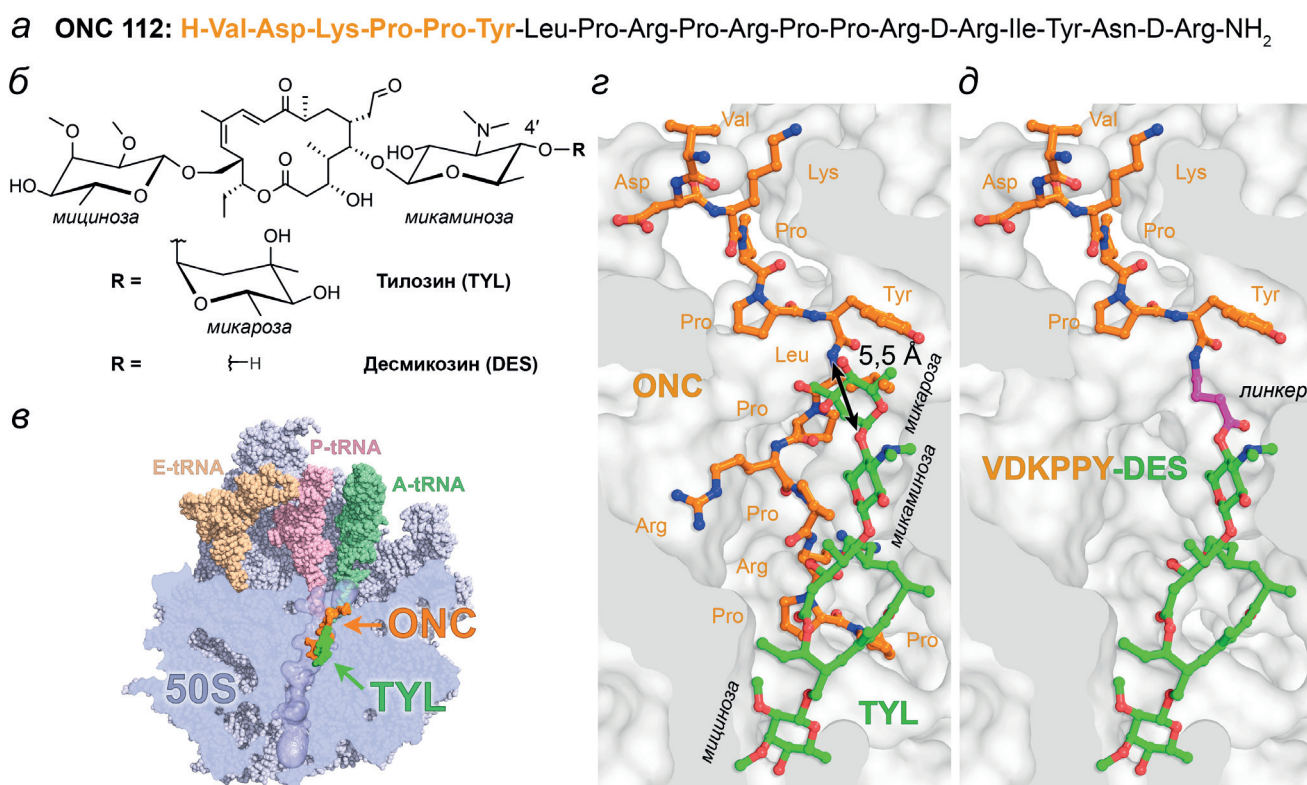


Рис. 1. Структуры и комплексы с рибосомой онкоцина 112 (ONC), тилозина (TYL), десмикозина (DES) и их производного VDKPPY-DES. а – Аминокислотная последовательность антимикробного пептида ONC. Оранжевым выделена последовательность, предложенная для модификации DES. б – Структура антибиотиков TYL и DES. в – Схематичное отображение сайтов связывания TYL (зелёный) и ONC (оранжевый) с 50S-субъединицей рибосомы *T. thermophilus*. г – Наложение структуры комплекса TYL (зелёный) с рибосомой *H. marismortui* (PDB ID: 1K9M) и структуры комплекса ONC (оранжевый) с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C). Показано расстояние между атомом азота амидной группы Tyr⁶ онкоцина и 4'-кислородом микаминозы. д – Модель конъюгата десмикозина (зелёный) с фрагментом онкоцина^{1–6} (Val¹Asp²Lys³Pro⁴Pro⁵Tyr⁶, оранжевый), соединённые через остаток 4-аминобутановой кислоты (розовый), в комплексе с рибосомой *T. thermophilus* (PDB ID: 4Z8C)

зом соединение **7**, после чего деблокировали аминогруппу. К полученному производному десмикозина (**8**) присоединяли *N*-концевые пептидные фрагменты онкоцина (**1a–3a**), защищённые флуоренилметилоксикарбонильной группой (Fmoc-группой) по α -аминофункции, Вос-группой – по ϵ -аминогруппе лизина и *t*Bu-группами – по боковым функциональным группам аспарагиновой кислоты и тирозина. Пептиды **1a–3a** были предварительно синтезированы методом твёрдофазного синтеза на 2-хлоритрильном полимере; для отщепления

пептидов от носителя с сохранением защитных групп применяли HFIP (рис. S1 в Приложении). Конденсацию пептидов **1a–3a** с аминогруппой производного десмикозина **8** осуществляли с помощью HBTU. Удаление защитных групп пептидных фрагментов соединений **9a–9c** приводило к получению конъюгатов 3,2',4''-триацетилдесмикозина с фрагментами онкоцина Lys³–Tyr⁶ (**1**), Asp²–Tyr⁶ (**2**) и Val¹–Tyr⁶ (**3**).

Очистка промежуточных и целевых соединений проводилась с помощью метода колоночной хроматографии на силикагеле. Соединения

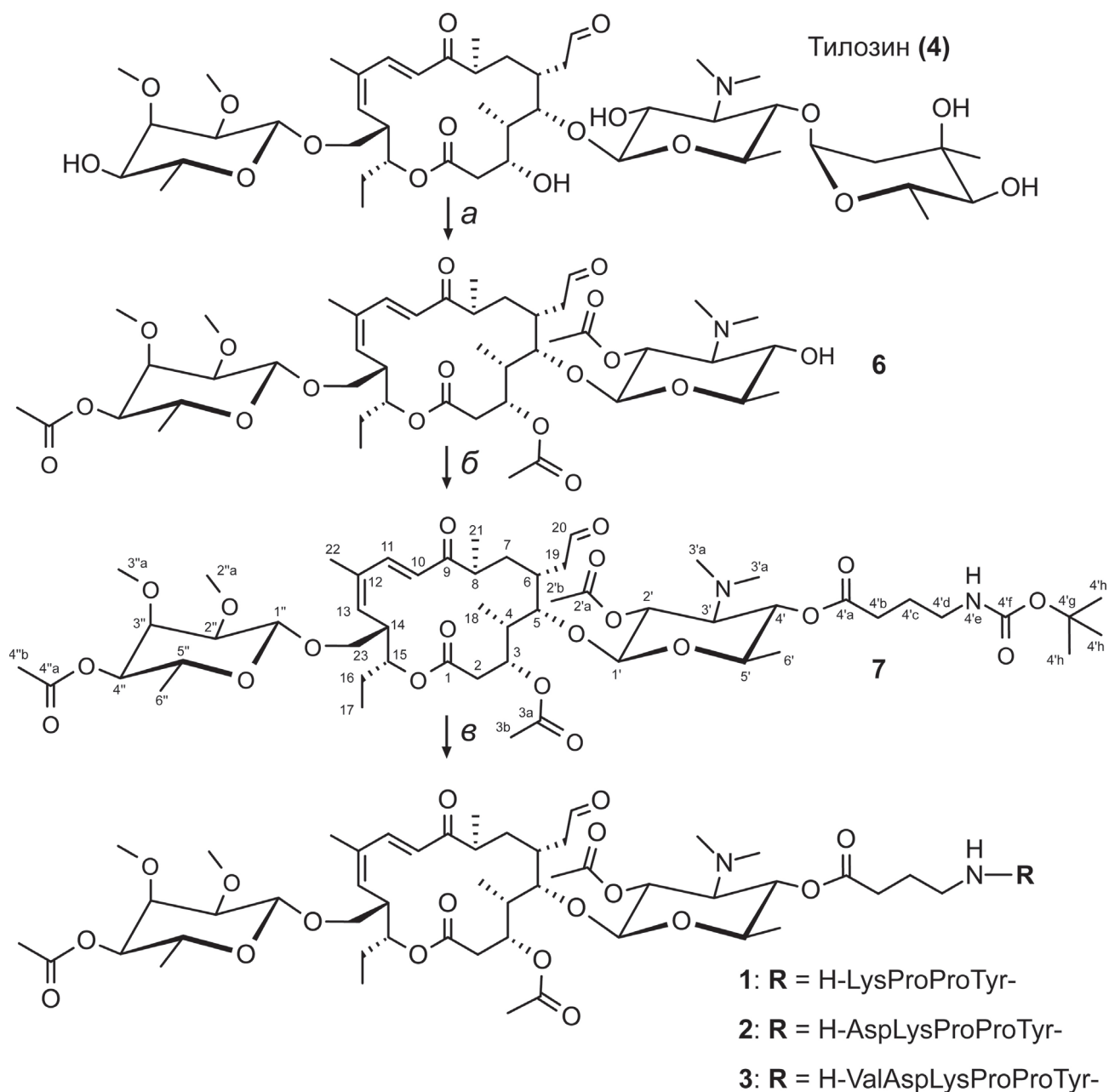


Рис. 2. Схема синтеза конъюгатов десмикозина с фрагментами пептида онкоцина. *a* – 1) Ac₂O, Py (**5**), 2) 0,2 М HCl (**6**); *б* – Вос-GABA, DMAP, DCC (**7**); *в* – 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Fmoc-Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**1a**), HBTU, DIPEA (**9a**), 3) 20% Pip/DMF, 4) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**1**); 2) 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Fmoc-Asp(*t*Bu)Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**2a**), HBTU, DIPEA (**9b**), 3) 20% Pip/DMF, 4) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**2**); 3) 1) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**8**), 2) Вос-ValAsp(*t*Bu)Lys(Boc)ProProTyr(*t*Bu)-OH (**3a**), HBTU, DIPEA (**9c**), 3) 50% TFA/CH₂Cl₂, 0 °С (**3**)

были охарактеризованы методами хроматографии и масс-спектрометрии. Положение заместителя по 4'-гидроксильной группе DES было доказано для промежуточного соединения 7 с помощью методов двумерного ЯМР: COSY, TOCSY, ROESY, ^{13}C -HMBC, ^{13}C -HSQC (рис. S2 в Приложении). Так, на спектре ^{13}C -HMBC наблюдается кросс-пик, соответствующий взаимодействию атома H4' микаминозы с углеродом C4'a карбонильной группы Вос-GABA. Эти атомы, в свою очередь, однозначно идентифицируются по наличию характеристичных корреляций в спектрах ^{13}C -HMBC и ROESY.

Изучение связывания производных десмикозина с рибосомами *E. coli*. Способность соединений связываться с бактериальными рибосомами была оценена методом конкурентного связывания в присутствии флуоресцентного аналога эритромицина – BODIPY-ERY, как было описано ранее [49, 50]. С помощью данного метода удалось определить эффективные константы диссоциации (K_D) комплексов полученных соединений с рибосомами *E. coli* (рис. 3, а). Оказалось, что ацетилирование десмикозина хотя и снижает эффективность связывания с РТ, однако этот эффект выражен слабо – значение K_D для триацетилдесмикозина, соединение 6 ($3,9 \pm 0,6$ нМ) мало отличается от такового для исходного антибиотика DES ($2,7 \pm 0,6$ нМ). В то же время аффинность к рибосоме производных десмикозина, содержащих фрагменты онкоцина, существенно снизилась. Несмотря на то что значения K_D для соединений 1 (80 ± 20 нМ), 2 (170 ± 30 нМ) и 3 (310 ± 60 нМ) лежат в наномолярном диа-

пазоне, что характерно как для класса макролидов [49], так и для взаимодействующих с рибосомой пролин-богатых антимикробных пептидов (ПБАМП), в том числе ONC ($6\text{--}93$ нМ) [81–84], они всё же на несколько порядков превышают значение K_D для DES. При этом наблюдается уменьшение степени сродства полученных конъюгатов к РТ с ростом длины пептидного фрагмента. Тем не менее аффинность производных десмикозина, содержащих фрагменты онкоцина, к бактериальной рибосоме превышает таковую для многих антибиотиков, связывающихся в ПТЦ и РТ [85], в том числе некоторых ПБАМП [81–84], эффективно подавляющих рост бактерий, и значительно превосходит аффинность фрагмента ONC^{1–9} ($K_D = 2,8 \pm 4,3$ мкМ) [84].

In vitro трансляция. Поскольку известно, что для многих макролидов ингибирование пептидил-трансферазной реакции происходит в процессе трансляции с участием синтезирующейся полипептидной цепи [86–88] и может не коррелировать с их аффинностью к «пустой» рибосоме [9, 10], следующим этапом была оценка эффективности ингибирования полученными соединениями 1–3 трансляции *in vitro*. Измерение ингибирующей активности проводили в бесклеточной системе трансляции мРНК люциферазы светлячка (*Fluc*). Все конъюгаты десмикозина с фрагментами онкоцина ингибируют синтез белка (рис. 3, б). Значительный уровень подавления трансляции, близкий к исходному антибиотику DES, продемонстрировало соединение 1. Несмотря на то что среди полученных конъюгатов это сое-

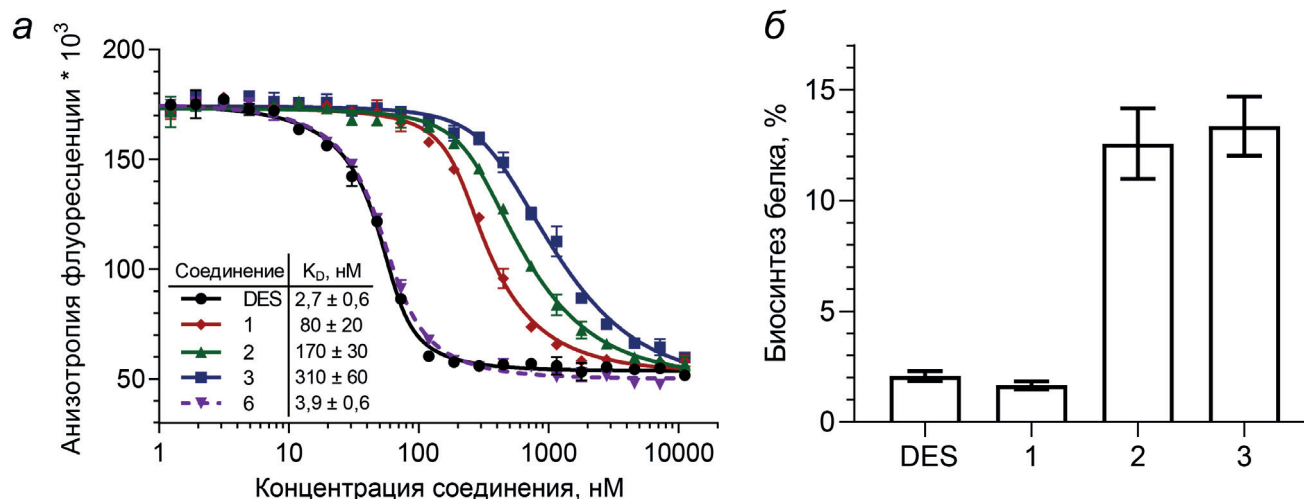


Рис. 3. Аффинность к рибосоме и ингибирующая активность конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина 1–3. *а* – Конкурентное связывание BODIPY-ERY и соединений 1–3 с 70S-рибосомами *E. coli*. Для каждой точки приведено среднее значение со стандартным отклонением. Эффективные константы диссоциации (K_D) комплексов исследуемых соединений с рибосомами представлены как средние значения с доверительным интервалом ($\alpha = 0,05$). *б* – Способность конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина ингибировать бактериальную трансляцию *in vitro*. Приведены средние значения со стандартным отклонением

динение также имело наибольшую аффинность к РТ (рис. 3, *a*), корреляции между ингибирующей активностью и сродством к рибосоме для всего ряда производных не наблюдается.

Антибактериальная активность. Способность синтезированных конъюгатов 1–3 к подавлению роста бактерий была проверена на ряде штаммов *E. coli*, в том числе резистентных к макролидам (рис. 4 и рис. S3 в Приложении).

Штамм *E. coli* JW5503 *ΔtolC pDualrep2* содержит двойную репортёрную систему с плазмидой *pDualrep2*. Действие соединений, вызывающих остановку рибосомы, приводит в такой системе к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S, что позволяет быстро и точно определить механизм действия вещества [54]. Результаты эксперимента (рис. 4, *a*) показали, что соединения в разной степени проявляют антимикробную активность, причём их действие на бактерии связано с подавлением бактериальной трансляции, о чём свидетельствует появление красного окрашивания вокруг зон ингибирования штамма JW5503 *pDualrep2*, содержащего репортёрную систему. Активность триацетилированного производного 6 в отношении этого штамма близка к исходному антибиотику DES, а антибактериальное действие конъюгатов 1–3 несколько снижено.

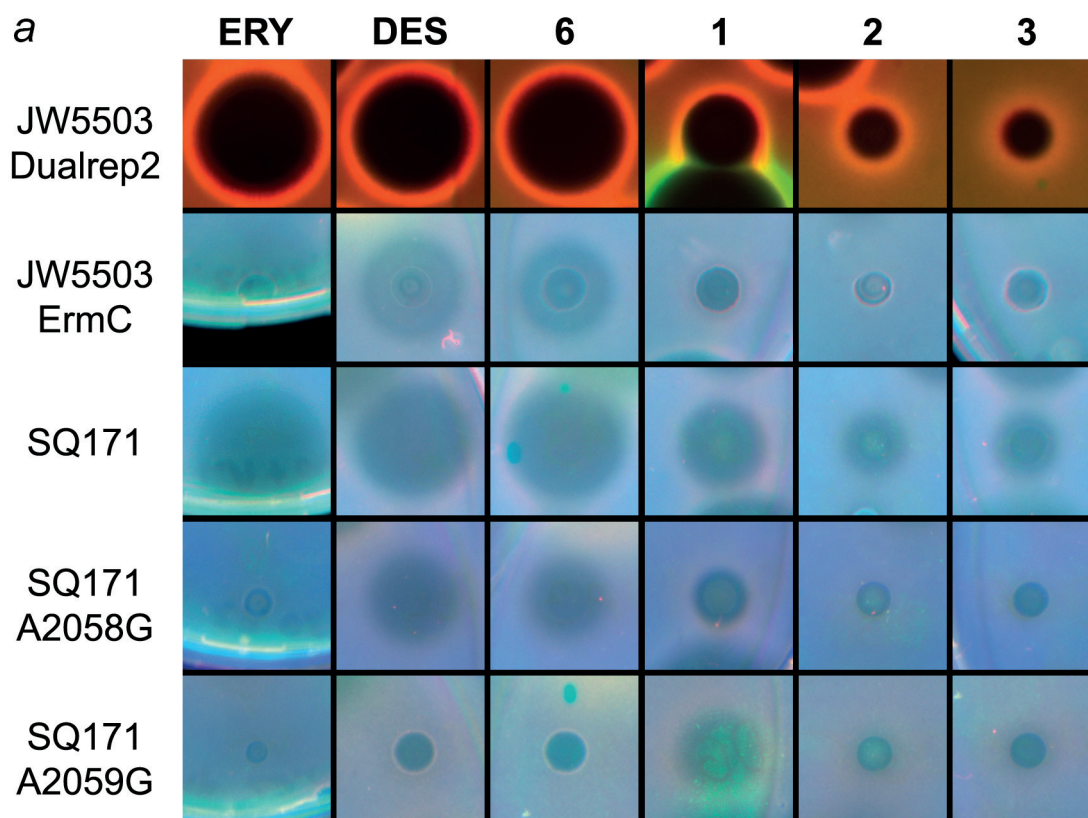
Устойчивость штамма *E. coli* JW5503 *ΔtolC pKH80* к макролидам возникает за счёт трансляции метилтрансферазы ErmC, которая метилирует A2058 23S рРНК бактерий, что приводит к понижению эффективности связывания макролидов и рибосомы [89]. Тестирование конъюгатов 1–3 на этом резистентном штамме (рис. 4, *a* и *b*) показало, что все соединения ингибируют его рост. Несмотря на то что по действию на немодифицированный штамм производное 1 уступает DES и ERY, на резистентном штамме, содержащем метилтрансферазу ErmC, оно проявляет активность, в отличие от полностью неактивного ERY, и эта активность оказывается более значительной, чем в случае DES (рис. 4, *b*). Несколько меньшая активность отмечена для гексапептидного производного 3. Следует отметить, что триацетилированный аналог десмикозина 6 проявил слабое антибактериальное действие в отношении ErmC-устойчивого штамма (рис. 4, *b*).

Устойчивость штаммов *E. coli* SQ171 *ΔtolC* A2058G и *E. coli* SQ171 *ΔtolC* A2059G к макролидам обеспечена за счёт соответствующих замен нуклеотидов в консервативном участке 23S рРНК. A2058 и A2059 являются ключевыми нуклеотидами во взаимодействии макролидов с рибосомой, замена которых на G приводит к значительному снижению аффинности ан-

тибиотиков к рибосоме и потере ими антибактериальной активности [90, 91]. Мутация A2058G – одна из наиболее частых в клинически выделенных резистентных к макролидам штаммах. ERY практически не проявляет антибактериального действия по отношению к данным штаммам, в то время как активность DES и его ацетилированного аналога 6 значительно снижена, особенно в случае мутации A2059G (рис. 4, *a* и табл. S1 в Приложении). В то же время производное 1 оказалось активным как в отношении штамма с заменой A2058G, так и в случае мутации A2059G (рис. 4, *a*). Этот факт может свидетельствовать об ином, уникальном по сравнению с исходным антибиотиком, паттерне взаимодействий полученной молекулы с элементами РТ.

Молекулярная динамика. Методами молекулярной динамики были исследованы комплексы конъюгатов десмикозина с N-концевыми пептидными фрагментами онкоцина (1 и 3) с рибосомами *E. coli* дикого типа, а также содержащими мутацию A2059G в сравнении с аналогичными комплексами DES и ONC (таблица и рис. 5). Производные десмикозина были ковалентно связаны с экзоциклической аминогруппой основания A2062 через карбиноламинную группу (рис. S4 в Приложении), как это было показано для TYL [28]. Количество и протяжённость траекторий приведены в табл. S2 в Приложении. В результате было выявлено, что DES в комплексе с рибосомой *E. coli*, подобно другим 16-членным макролидам [79], удерживается в сайте связывания прочными водородными связями между гидроксильными группами мицинозы и нуклеотидными остатками G748 и A751 и между 2'-гидроксильной группой микаминозы и остатком A2058. При введении мутации A2059G DES почти полностью теряет водородные связи с мицинозой, а встречаемость водородной связи 2'-гидроксильной группы микаминозы с A2058 уменьшается более чем вдвое. При этом водородная связь, образованная протонированной 3'-аминогруппой, переключается с 4'-гидроксильной группы остатка G2505 на N7 его гетероциклического основания. Причиной служит возникающее стерическое противоречие между остатком микаминозы и экзоциклической аминогруппой G2059, вследствие которого DES поворачивается в сайте связывания, разрывая водородные связи с мицинозой (рис. S5 в Приложении и таблица).

При введении в структуру конъюгатов ацетильных групп по 4'-гидроксильной группе остатка мицинозы, 2'-гидроксильной группе остатка микаминозы и 3-гидроксильной груп-



б

Штамм	МИК (мкМ)				
	ERY	DES	6	1	3
JW5503	4	12	25	37	41
JW5503 ErmC	>1360	23	>200	19	83

Рис. 4. Тестирование конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина на антибиотическую активность. *а* – Зоны ингибирования исследуемыми соединениями роста различных штаммов бактерий *E. coli*. JW5503 *pDualrep2* – штамм *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, модифицированный репортёрной системой *pDualrep2*, красное свечение вокруг зон ингибирования свидетельствует об аресте трансляции; JW5503 ErmC – штамм *E. coli* JW5503 $\Delta tolC$, трансформированный *pKH80* (резистентный к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC); SQ171 – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552*; SQ171 A2058G – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552* с заменой A2058G в 23S рРНК; SQ171 A2059G – штамм *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, трансформированный плазмидой *pAM552* с заменой A2059G в 23S рРНК. DES, а также соединения **1–3** и **6** наносили в количестве 10 нмоль, ERY – в количестве 6,8 нмоль. Полная версия отсканированных чашек представлена на рис. S3 в Приложении. *б* – Значения МИК, полученные для штаммов JW5503 (*E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ *KanR*) и JW5503 ErmC (*E. coli* JW5503 $\Delta tolC$ *pKH80*, резистентный к эритромицину за счёт экспрессии метилтрансферазы ErmC)

пе тилонолида в комплексах конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* возникают стерические противоречия между ацетильными группами и остатками 23S рРНК при связывании десмикозиновой части конъюгатов в MBS, соответствующем рентгеноструктурным данным [28]. Поэтому мы методами молекулярно-динамического моделирования нашли такие конформации конъюгатов (**1** и **3**), которые обеспечивали бы их стабильное взаимодействие с MBS при условии возможности образования кова-

лентной связи с основанием A2062, наблюдаемой для TYL [28] (рис. 5, *а–г*).

Для конъюгатов **1** и **3**, ацетилированных по 3-, 2'- и 4"-гидроксильным группам, не сохраняются водородные связи DES, в образовании которых участвовали соответствующие гидроксильные группы (таблица и табл. S3–S5 в Приложении). Кроме того, как указывалось выше, введённые ацетильные группы создают стерические противоречия, приводящие к изменению положения десмикозинового

Встречаемость водородных связей, образованных DES, ONC и их фрагментами в составе конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми пептидами онкоцина в комплексах с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G

Донор	Акцептор	DES WT	DES A2059G	ONC WT	ONC A2059G	1 WT	1 A2059G	3 WT	3 A2059G
Фрагмент десмикозина									
Мициноза/O ₄ –H	A751/O ₂	74	2	–	–	–	–	–	–
Мициноза/O ₄ –H	G748/O ⁶	88	–	–	–	–	–	–	–
Микаминоза/N ₃ –H	G2505/N ⁷	–	60	–	–	–	–	–	–
Микаминоза/N ₃ –H	G2505/O ₄	73	2	–	–	–	1	–	3
Микаминоза/O ₂ –H	A2058/N ¹	94	35	–	–	–	–	–	–
A752/N ⁶ –H	Мициноза/O ₉ *	–	–	–	–	–	18	–	35
G748/N ¹ –H	Мициноза/O ₃ *	96	4	–	–	1	4	–	–
G748/N ¹ –H	Мициноза/O ₄ *	–	–	–	–	52	7	23	9

Фрагмент онкоцина									
Val ¹ /N–H	C2507/O ₂	–	–	–	2	–	–	82	53
Lys ³ /N _ε –H	C2452/O ₂	–	–	–	28	3	3	20	10
Lys ³ /N _ε –H	C2507/O _{фосфат}	–	–	–	–	95	96	89	89
Lys ³ /N _ε –H	C2573/O _{фосфат}	–	–	–	–	85	95	98	97
Tyr ⁶ /N–H	U2506/O ₂	–	–	82	–	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _δ –H	C2610/O _{фосфат}	–	–	9	28	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _ω –H	C2610/O ¹ _{фосфат}	–	–	7	32	–	–	–	–
Arg ⁹ /N _ω –H	C2610/O ² _{фосфат}	–	–	14	50	–	–	–	–

Примечание. Таблица составлена по данным молекулярно-динамических расчётов. Встречаемость состояний дана в % от кадров траекторий. Нумерация атомов представлена в соответствии с рис. S4 в Приложении.

фрагмента конъюгата в комплексе с рибосомой по сравнению с исходным десмикозином. Тем не менее в смоделированных структурах комплексов конъюгатов **1** и **3** с рибосомой (рис. 5, *в*) имеется водородная связь между N¹–H основания G748 и сложноэфирным кислородом 4"-ацетокси-группы остатка мицинозы, эта связь более стабильна в комплексах, образованных конъюгатом **1** (таблица). Разрушение водородных связей, типичных для 16-членных макролидов, и одновременная стабилизация взаимодействий онкоциновой части конъюгатов с 23S рРНК приводят к смещению десмикозиновой части конъюгатов в сторону ПТЦ (рис. 5, *а*). В этой новой конформации соединений **1** и **3** их пептидные фрагменты образуют довольно стабильные водородные связи, но не характерные для исход-

ного пептида ONC (таблица и рис. S6 в Приложении).

Введение мутации A2059G приводит к некоторому ослаблению водородных связей онкоциновой части конъюгатов **1** и **3** и существенному ослаблению водородных связей ацетилированной мицинозы с основанием G748 (табл. S1 и S6 в Приложении и рис. 5, *б* и *г*). При этом конформация конъюгатов **1** и **3** меняется относительно дикого типа слабо, поскольку их связывание в целом зависит в первую очередь от связывания фрагментов онкоцина и во вторую очередь – от связывания ацетилированного остатка мицинозы. Ацетилированный остаток микаминозы обеспечивает лишь неспецифическое кулоновское притягивание к 23S рРНК, которое оказывается нечувствительным к виду пуринового основания нуклеотида 2059.

Проведённый анализ значений RMSF для DES, ONC, а также конъюгатов **1** и **3** показал, что замена остатка A2059 на G в MBS рибосомы приводит к росту значений RMSF для всех исследуемых соединений (рис. 6). Наиболее выраженный эффект наблюдается для DES – подвижность его атомов увеличивается в 2 раза при связывании с мутантной рибосомой, что согласуется с его низкой антибактериальной активностью на соответствующем резистентном штамме (рис. 4, а). Введение в структуру DES фрагментов онкоцина ожидаемо приводит к росту RMSF за счёт большей подвижности пептидной части молекулы. Влияние мутации A2059G на флуктуации атомов ONC, а также соединений **1** и **3** заметно слабее. По-видимому, компенсация потерянных водородных связей тилонолида за счёт остатков онкоцина приводит к стабилизации конформации антибиотиков в мутированном MBS, что проявляется в сохранении антибактериальной активности

конъюгатов **1** и **3** при переходе к резистентному штамму (рис. 4, а).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе осуществлён дизайн и синтез серии конъюгатов *N*-концевых фрагментов онкоцина (Val¹–Tyr⁶, Asp²–Tyr⁶, Lys⁴–Tyr⁶) и 3,2',4''-триацетилдесмикозина, в которых пептидные фрагменты присоединены по 4'-положению мицинозы через линкер на основе 4-аминобутановой кислоты (**1**–**3**). Конъюгаты представляли интерес как потенциальные антимикробные агенты, а также как лиганды, взаимодействующие с функционально важными центрами бактериальной рибосомы – MBS, с которым связывается десмикозин, и ПТЦ, с которым взаимодействуют *N*-концевые фрагменты онкоцина.

В синтезированных аналогах десмикозина по 3, 2' и 4''-гидроксилам макролида содержатся

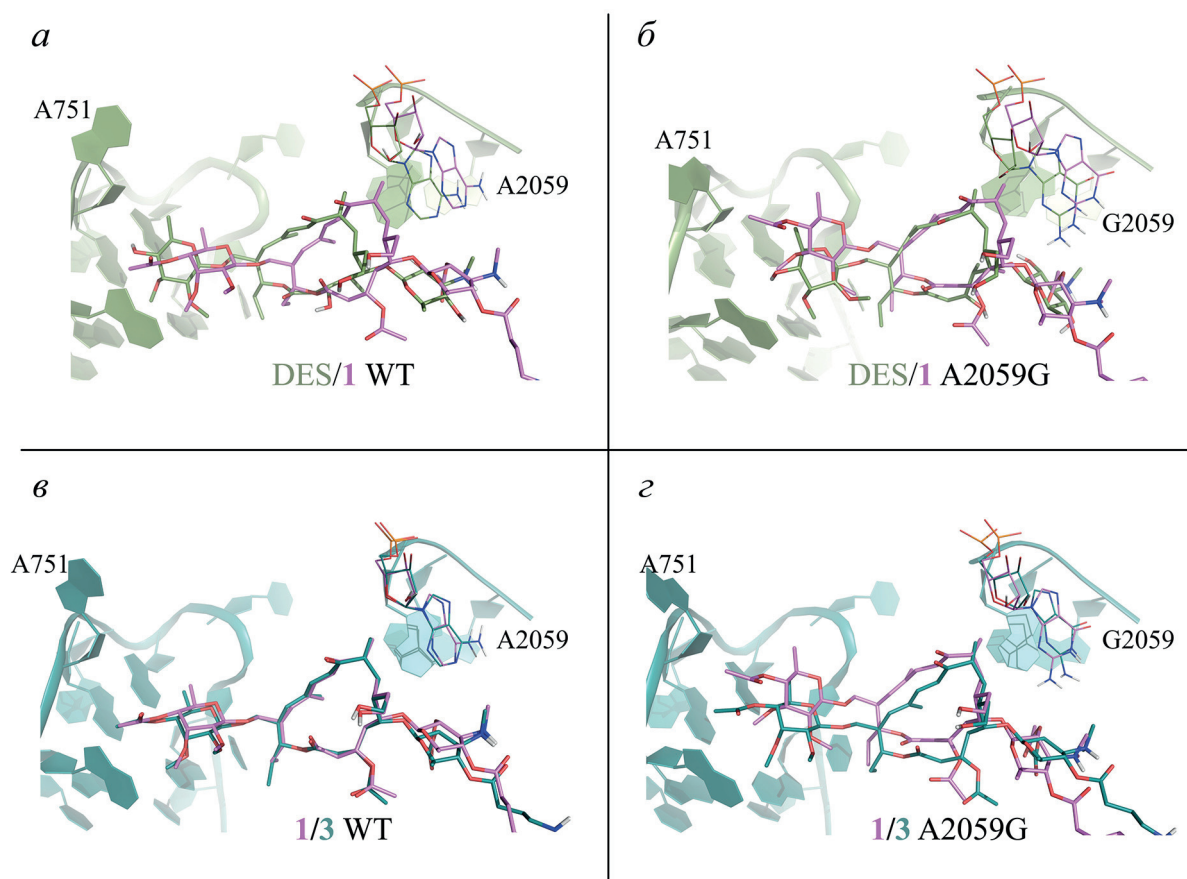


Рис. 5. Структуры соединений **1**, **3** и DES в комплексе с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G, полученные методом молекулярной динамики. Изображены только десмикозиновые части молекул. Альдегидная группа в положении 20 тилонолида показана в форме карбиноламина, образованного с участием экзотической аминогруппы основания A2062 (само основание A2062 на рисунке не показано). а – Наложение структуры DES (зелёный) и соединения **1** (фиолетовый) в комплексе с рибосомой дикого типа. б – Наложение структуры DES (зелёный) и соединения **1** (фиолетовый) в комплексе с рибосомой, содержащей мутацию A2059G. в – Наложение структуры соединения **1** (фиолетовый) и **3** (голубой) в комплексе с рибосомой дикого типа. г – Наложение структуры соединения **1** (фиолетовый) и **3** (голубой) в комплексе с рибосомой, содержащей мутацию A2059G

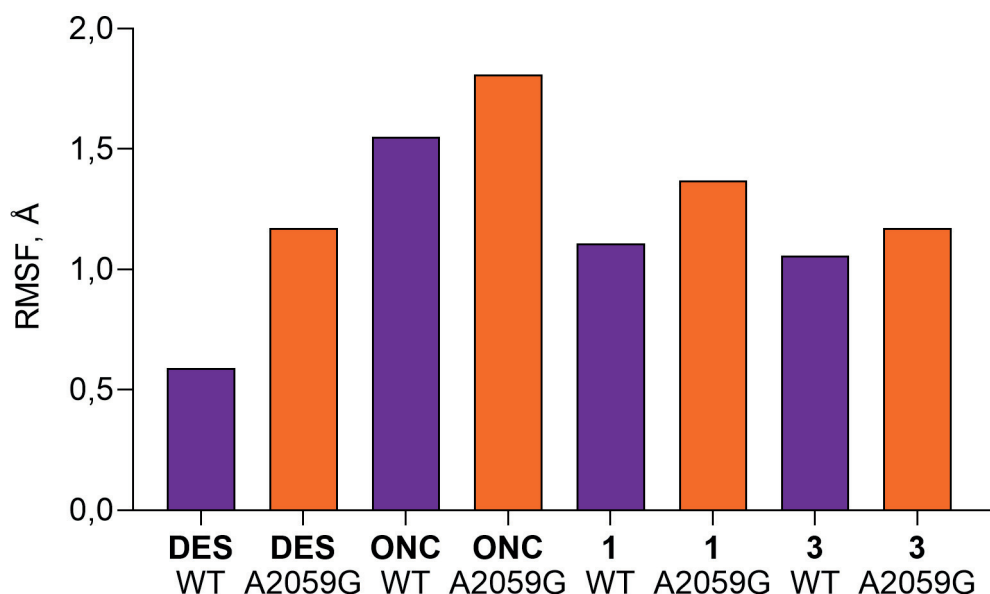


Рис. 6. Среднеквадратичные флуктуации атомов (RMSF) для структур конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми фрагментами онкоцина **1** и **3** в сравнении с DES и ONC в рибосоме *E. coli* дикого типа (WT, фиолетовый цвет) и *E. coli*, содержащей мутацию A2059G (оранжевый цвет) по данным молекулярной динамики

ся ацетильные группы (рис. 2), которые были введены по следующим соображениям. Ацетилирование антибиотиков обычно упоминается в литературе в контексте возникновения устойчивости у бактерий по отношению к ним [92, 93], однако в случае макролидов существуют природные антибиотики, ацетилированные или ацилированные по гидроксильным группам лактона и углеводных остатков (например, 14-членный макролид ланкамицин [94, 95], 16-членный макролид карбомицин А [28, 96] или триацетилолеандомицин [97, 98]). Введение ацильных и ацетильных заместителей в структуру макролидов улучшает фармакокинетические свойства антибиотиков [99, 100], а в некоторых случаях приводит к активным антибактериальным соединениям, действующим в отношении резистентных штаммов [27, 101, 102]. Кроме того, при конструировании конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина мы полагали, что введение ацетильных групп по 3, 2' и 4"-гидроксилам десмикозинового фрагмента должно ослабить взаимодействия макролидной части молекул с РТ вследствие нарушения водородных связей, образованных с участием этих гидроксильных групп [28, 98], и привести к большей подвижности десмикозинового фрагмента в комплексе конъюгата с рибосомой. Ослабление взаимодействий десмикозиновой части конъюгата с нуклеотидами РТ может способствовать тому, что влияние пептидных фрагментов онкоцина на связывание всей молекулы в целом проявится более отчетливо.

Сконструированные и синтезированные в данной работе конъюгаты **1–3** оказались

способными связываться с бактериальными рибосомами, однако степень их аффинности снижена по сравнению с исходным антибиотиком десмикозином и 3,2',4"-триацетилдесмикозином (рис. 3, а). Тем не менее все конъюгаты подавляют бактериальную трансляцию *in vitro* (рис. 3, б), причём конъюгат с тетрапептидным заместителем (**1**) по уровню ингибирования подобен DES. Эти результаты согласуются с данными тестирования в двойной репортёрной системе, где наибольшим ингибирующим действием среди полученных конъюгатов также обладает соединение **1** (рис. 4, а).

Конъюгаты **1** и **3** проявили активность в отношении устойчивых к макролидам штаммов (рис. 4), один из которых содержит ген метилазы ErmC, метилирующей A2058 [56], а два других содержат замены в 23S рРНК A2058G либо A2059G [103, 104]. Поскольку ацетилированное производное десмикозина (**6**) не проявляет значительной активности на резистентных штаммах (рис. 4 и табл. S1 в Приложении), по-видимому, такое действие конъюгатов **1** и **3** определяется наличием пептидных фрагментов в структуре этих соединений.

Для выяснения роли различных структурных элементов в молекулах конъюгатов десмикозина с *N*-концевыми фрагментами онкоцина в их взаимодействии с бактериальными рибосомами были выполнены расчёты молекулярной динамики комплексов десмикозина, онкоцина и конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* дикого типа, а также с содержащей мутацию A2059G в 23S рРНК, приводящую к устойчивости соответствующего штамма к макролидам.

По-видимому, как и для других 16-членных макролидов, для взаимодействия с рибосомой конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина (**1**, **3**) большое значение имеет возможность расположения тилонолида в комплексе с рибосомой оптимальным образом для образования ковалентной связи с н.о. A2062 23S рРНК. При взаимодействии конъюгатов **1** и **3** с рибосомой *E. coli* интенсивные взаимодействия онкоциновых фрагментов и наличие ацетильных группировок в десмикозиновой части соединений способствуют смещению тилонолида от оптимального расположения в MBS (рис. 5, а). Возможно также, что длина линкера на основе 4-аминобутановой кислоты, соединяющего макролидный и пептидные фрагменты конъюгатов, недостаточна, чтобы эти фрагменты могли в полной мере, синергически, взаимодействовать со своими участками РТ, не перетягивая друг друга. Вероятно, более длинный линкер, например, на основе δ-аминовалериановой или ε-аминокапроновой кислот, мог бы обеспечить синергическое действие онкоциновой и десмикозиновой частей конъюгата. Изменение расположения тилонолида в комплексах конъюгатов **1** и **3** с рибосомой подтверждается результатами расчёта среднеквадратичных флуктуаций атомов исследуемых соединений (RMSF), значения которых для соединений **1** и **3** выше, чем для исходного антибиотика DES (рис. 6). Этим может объясняться как уменьшение аффинности конъюгатов **1** и **3** к рибосоме, так и некоторое снижение их антибактериальной активности по сравнению с DES на рибосомах дикого типа (рис. 3, а и рис. 4).

В случае рибосомы *E. coli*, содержащей мутацию A2059G, происходит увеличение подвижности DES и соединений **1** и **3** в MBS по сравнению с рибосомой дикого типа (рис. 5 и 6), что свидетельствует о дестабилизации взаимодействий десмикозинового фрагмента с элементами РТ. Однако, если для DES такое изменение значительно и проявляется в снижении его антибактериальной активности по отношению к резистентному штамму, то флуктуация производных **1** и **3** увеличивается слабо, по-видимому, вследствие значительного вклада онкоцинового фрагмента во взаимодействие с рибосомой. Соединение **1** оказалось наиболее устойчивым к мутации в MBS: несмотря на ослабление взаимодействия десмикозиновой части конъюгата из-за влияния мутации, онкоциновый фрагмент «удерживает» десмикозиновую часть от покидания MBS. Это согласуется с тем, что данное производное

проявляет наибольшую активность в отношении резистентного штамма, содержащего мутацию A2059G в 23S РНК (рис. 4, а).

Таким образом, в настоящей работе показано, что модификация десмикозина фрагментами антимикробного пептида онкоцина приводит к соединениям, способным связываться с бактериальными рибосомами подобно десмикозину и онкоцину и подавлять трансляцию *in vitro*. Конъюгаты гекса- и тетрапептидных N-концевых фрагментов онкоцина с 3,2',4"-триацетилдесмикозином оказались активными в отношении штаммов, резистентных к макролидам. Методом молекулярной динамики найдены структурные особенности взаимодействий этих производных с бактериальными рибосомами, в том числе содержащими мутацию A2059G в 23S РНК, позволяющие объяснить полученные экспериментальные результаты.

Вклад авторов. З.З. Хайруллина – проведение экспериментов (синтез, связывание с рибосомами), обсуждение результатов исследования, написание текста, редактирование текста; Г.И. Макаров – моделирование молекулярной динамики, обсуждение результатов исследования, написание и редактирование текста; А.Г. Терещенков – проведение экспериментов (связывание с рибосомами), обсуждение результатов, написание и редактирование текста, оформление рисунков; В.С. Буев – проведение экспериментов (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность); Д.А. Лукьянов – проведение экспериментов (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность); В.И. Польшаков – проведение экспериментов (ЯМР), анализ данных; В.Н. Ташлицкий – проведение экспериментов (хроматография, масс-спектрометрия); И.А. Остерман – руководство работой, обсуждение результатов исследования; Н.В. Сумбатьян – концепция и руководство работой, обсуждение результатов, написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 20-04-00873-а (синтез аналогов, молекулярное моделирование, связывание с рибосомами), № 19-14-00115 (ЯМР исследования) и № 21-64-00006 (*in vitro* трансляция, антибактериальная активность)).

Благодарности. Мы благодарим А.А. Богданова за инициирование и поддержку работ по изучению пептидных производных рибосомных антибиотиков. Авторы также благодарят

А.Л. Коневу за предоставленные для работы рибосомы; М.В. Серебрякову за масс-спектрометрические анализы; А.Л. Ксенофонтова за проведение аминокислотного анализа; О.Ю. Савельева за экспертную техническую помощь в измерениях ЯМР. Работа выполнена с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств Программы развития Московского университета. Авторы выражают благодарность МГУ имени М.В. Ломоносова за возможность использовать установки ЯМР, а также Вычислительному центру МГУ имени

М.В. Ломоносова за предоставленную возможность вести расчёты молекулярной динамики на суперкомпьютере «Ломоносов-II».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- König, G., Sokkar, P., Pryk, N., Heinrich, S., Möller, D., et al. (2021) Rational prioritization strategy allows the design of macrolide derivatives that overcome antibiotic resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2113632118, doi: 10.1073/pnas.2113632118.
- Llano-Sotelo, B., Dunkle, J., Klepacki, D., Zhang, W., Fernandes, P., et al. (2010) Binding and action of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic that inhibits protein synthesis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 4961-4970, doi: 10.1128/AAC.00860-10.
- Jelić, D., and Antolović, R. (2016) From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials, *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **5**, 29, doi: 10.3390/antibiotics5030029.
- Skripkin, E., McConnell, T. S., DeVito, J., Lawrence, L., Ippolito, J. A., et al. (2008) Rchi-01, a new family of oxazolidinones that overcome ribosome-based linezolid resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3550-3557, doi: 10.1128/AAC.01193-07.
- Lenz, K. D., Klosterman, K. E., Mukundan, H., and Kubicek-Sutherland, J. Z. (2021) Macrolides: from toxins to therapeutics, *Toxins*, **13**, 347, doi: 10.3390/toxins13050347.
- Fernandes, P., Martens, E., and Pereira, D. (2017) Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics, *J. Antibiot.*, **70**, 527-533, doi: 10.1038/ja.2016.137.
- Dinos, G. P. (2017) The macrolide antibiotic renaissance, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 2967-2983, doi: 10.1111/bph.13936.
- Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) How macrolide antibiotics work, *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 668-684, doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.011.
- Mankin, A. S. (2008) Macrolide myths, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 414-421, doi: 10.1016/j.mib.2008.08.003.
- Kannan, K., and Mankin, A. S. (2011) Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1241**, 33-47, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06315.x.
- Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
- 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.
- Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., et al. (2021) Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 412-420, doi: 10.1038/s41589-020-00715-0.
- Breiner-Goldstein, E., Eyal, Z., Matzov, D., Halfon, Y., Cimicita, G., et al. (2021) Ribosome-binding and anti-microbial studies of the mycinamicins, 16-membered macrolide antibiotics from *Micromonospora griseorubida*, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 9560-9573, doi: 10.1093/nar/gkab684.
- McGuire, J. M., Boniece, W. S., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., Stark, W. M., et al. (1961) Tylosin, a new antibiotic: I. Microbiological studies, *Antibiot. Chemother.*, **11**, 320-327.
- Baltz, R. H., Seno, E. T., Stonesifer, J., and Wild, G. M. (1983) Biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. A preferred pathway from ty lactone to tylosin, *J. Antibiot.*, **36**, 131-141, doi: 10.7164/antibiotics.36.131.
- Hamill, R. L., Haney, M. E., and McGuire, J. M. (1965) Stamper MC: Antibiotics tylosin and desmicosin and derivatives thereof., Apr.13, U.S. Pat. № 3178341.
- Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., et al. (2018) 16-membered macrolide antibiotics: a review, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **51**, 283-298, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020.
- McColm, A. A., and McHardy, N. (1984) Evaluation of a range of antimicrobial agents against the parasitic protozoa, *Plasmodium falciparum*, *Babesia rodhaini* and *Theileria parva in vitro*, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **78**, 345-354, doi: 10.1080/00034983.1984.11811831.
- Goodman, C. D., Useglio, M., Peirú, S., Labadie, G. R., McFadden, G. I., et al. (2013) Chemobiosynthesis of new antimalarial macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 907-913, doi: 10.1128/AAC.01825-12.
- Dahl, E. L., and Rosenthal, P. J. (2007) Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium*

- falciparum* apicoplast, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 3485-3490, doi: 10.1128/AAC.00527-07.
22. Von Geldern, T. W., Morton, H. E., Clark, R. F., Brown, B. S., Johnston, K. L., et al. (2019) Discovery of ABBV-4083, a novel analog of tylosin A that has potent anti-Wolbachia and anti-filarial activity, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13**, e0007159, doi: 10.1371/journal.pntd.0007159.
 23. Debono, M., Willard, K. E., Kirst, H. A., Wind, J. A., Crouse, G. D., et al. (1989) Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxy-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives, *J. Antibiot.*, **42**, 1253-1267, doi: 10.7164/antibiotics.42.1253.
 24. Miyake, T., Takita, M., Hamada, M., Takeuchi, T., and Umezawa, S. (2001) Macrolide antibiotics and treatment of pasteurellosis, Patent WO2001016148A1.
 25. Kleefeld, G., Froyman, R., Ludwig, C., Omura, S., Sunazuka, T., Tomoyasu, H., Akihiro, S., Kazuro, S. (2014) WO2014/187957 Tylosin derivatives and method for preparation thereof.
 26. Phan, L. T., Jian, T., Chen, Z., Qiu, Y. L., Wang, Z., et al. (2004) Synthesis and antibacterial activity of a novel class of 4'-substituted 16-membered ring macrolides derived from tylosin, *J. Med. Chem.*, **47**, 2965-2968, doi: 10.1021/jm034233n.
 27. Kiyoshima, K., Sakamoto, M., Nomura, H., Yoshioka, T., Okamoto, R., et al. (1989) Structure-activity relationship studies on 4"-O-acyltylosin derivatives: significance of their 23-O-mycinosyl and 4"-O-acyl moieties in antimicrobial activity against macrolide-resistant microbes, *J. Antibiot.*, **42**, 1661-1672, doi: 10.7164/antibiotics.42.1661.
 28. Hansen, J. L., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., et al. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117-128, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00570-1.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., et al. (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.
 32. Pavlova, A., Parks, J. M., Oyeler, A. K., and Gumbart, J. C. (2017) Toward the rational design of macrolide antibiotics to combat resistance, *Chem. Biol. Drug Des.*, **90**, 641-652, doi: 10.1111/cbdd.13004.
 33. Sugawara, A., Maruyama, H., Shibusawa, S., Matsui, H., Hirose, T., et al. (2017) 5-O-Mycaminosyltylonolide antibacterial derivatives: design, synthesis and bioactivity, *J. Antibiot.*, **70**, 878-887, doi: 10.1038/ja.2017.61.
 34. Fu, H., Marquez, S., Gu, X., Katz, L., and Myles, D. C. (2006) Synthesis and *in vitro* antibiotic activity of 16-membered 9-O-arylalkyloxime macrolides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1259-1266, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.11.061.
 35. Karahalios, P., Kalpaxis, D. L., Fu, H., Katz, L., Wilson, D. N., et al. (2006) On the mechanism of action of 9-O-arylalkyloxime derivatives of 6-O-mycaminosyltylonolide, a new class of 16-membered macrolide antibiotics, *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1271-1280, doi: 10.1124/mol.106.026567.
 36. Sumbatyan, N. V., Korshunova, G. A., and Bogdanov, A. A. (2003) Peptide derivatives of antibiotics tylosin and desmycosin, protein synthesis inhibitors, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 1156-1158, doi: 10.1023/a:1026318914546.
 37. Starosta, A. L., Karpenko, V. V., Shishkina, A. V., Mikolajka, A., Sumbatyan, N. V., et al. (2010) Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition, *Chem. Biol.*, **17**, 504-514, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.008.
 38. Shishkina, A., Makarov, G., Tereshchenkov, A., Korshunova, G., Sumbatyan, N., et al. (2013) Conjugates of amino acids and peptides with 5-O-mycaminosyltylonolide and their interaction with the ribosomal exit tunnel, *Bioconjugate Chem.*, **24**, 1861-1869, doi: 10.1021/bc400236n.
 39. Schneider, M., and Dorn, A. (2001) Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera), *J. Invertebr. Pathol.*, **78**, 135-140, doi: 10.1006/jipa.2001.5054.
 40. Knappe, D., Piantavigna, S., Hansen, A., Mechler, A., Binas, A., et al. (2010) Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRRRIYNR-NH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens, *J. Med. Chem.*, **53**, 5240-5247, doi: 10.1021/jm100378b.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Li, J., Kim, I. H., Roche, E. D., Beeman, D., Lynch, A. S., et al. (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.

46. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., et al. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR*, **6**, 277-293, doi: 10.1007/BF00197809.
47. Lee, W., Tonelli, M., and Markley, J. L. (2015) NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy, *Bioinformatics*, **31**, 1325-1327, doi: 10.1093/bioinformatics/btu830.
48. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., et al. (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics*, **4**, 17, doi: 10.1186/1758-2946-4-17.
49. Yan, K., Hunt, E., Berge, J., May, E., Copeland, R. A., et al. (2005) Fluorescence polarization method to characterize macrolide-ribosome interactions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3367-3372, doi: 10.1128/AAC.49.8.3367-3372.2005.
50. Tereshchenkov, A. G., Dobosz-Bartoszek, M., Osterman, I. A., Marks, J., Sergeeva, V. A., et al. (2018) Binding and action of amino acid analogs of chloramphenicol upon the bacterial ribosome, *J. Mol. Biol.*, **430**, 842-852, doi: 10.1016/j.jmb.2018.01.016.
51. 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.
52. Polikanov, Y. S., Osterman, I. A., Szal, T., Tashlitsky, V. N., Serebryakova, M. V., et al. (2014) Amicoumacin A inhibits translation by stabilizing mRNA interaction with the ribosome, *Mol. Cell*, **56**, 531-540, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.020.
53. Svetlov, M. S., Kommer, A., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2006) Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family, *Protein Sci.*, **15**, 242-247, doi: 10.1110/ps.051752506.
54. Osterman, I. A., Komarova, E. S., Shiryayev, D. I., Korniltsev, I. A., Khven, I. M., et al. (2016) Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 7481-7489, doi: 10.1128/AAC.02117-16.
55. Zakalyukina, Y. V., Birykov, M. V., Lukianov, D. A., Shiriaev, D. I., Komarova, E. S., et al. (2019) Nybomycin-producing *Streptomyces* isolated from carpenter ant *Camponotus vagus*, *Biochimie*, **160**, 93-99, doi: 10.1016/j.biochi.2019.02.010.
56. Hardy, K., and Haefeli, C. (1982) Expression in *Escherichia coli* of a staphylococcal gene for resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics, *J. Bacteriol. Res.*, **152**, 524-526, doi: 10.1128/jb.152.1.524-526.1982.
57. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., et al. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, doi: 10.1038/s41467-020-16694-8.
58. Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., and Cate, J. H. (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.
59. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., et al. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinform.*, **3**, 2, doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
60. Byrd, R., Lu, P., and Nocedal, J. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization, *SIAM J. Scientific. Comput.*, **16**, 1190-1208, doi: 10.1137/0916069.
61. Petrone, P. M., Snow, C. D., Lucent, D., and Pande, V. S. (2008) Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16549-16554, doi: 10.1073/pnas.0801795105.
62. Lucent, D., Snow, C. D., Aitken, C. E., and Pande, V. S. (2010) Non-bulk-like solvent behavior in the ribosome exit tunnel, *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000963, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000963.
63. Ruiz-Carmona, S., Alvarez-Garcia, D., Foloppe, N., Garmendia-Doval, A. B., Juhos, S., et al. (2014) rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003571, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003571.
64. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., et al. (2005) GROMACS: fast, flexible, free, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1701-1718, doi: 10.1002/jcc.20291.
65. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
66. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., et al. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
67. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157-1174, doi: 10.1002/jcc.20035.
68. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10269-10280, doi: 10.1021/j100142a004.
69. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.*, **18**, 1463-1472, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
70. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101, doi: 10.1063/1.2408420.
71. Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A., and Haak, J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690, doi: 10.1063/1.448118.

72. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an N²-log(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089-10092, doi: 10.1063/1.464397.
73. Horn, H. W., Swope, W. C., Pitner, J. W., Madura, J. D., Dick, T. J., et al. (2004) Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: TIP4P-Ew, *J. Chem. Phys.*, **120**, 9665-9678, doi: 10.1063/1.1683075.
74. Joung, I. S., and Cheatham, T. E., 3rd (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 9020-9041, doi: 10.1021/jp8001614.
75. Athavale, S. S., Petrov, A. S., Hsiao, C., Watkins, D., Prickett, C. D., et al. (2012) RNA folding and catalysis mediated by iron (II), *PLoS One*, **7**, e38024, doi: 10.1371/journal.pone.0038024.
76. Barducci, A., Bussi, G., and Parrinello, M. (2008) Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 020603, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.020603.
77. Domene, C., Barbini, P., and Furini, S. (2015) Bias-exchange metadynamics simulations: an efficient strategy for the analysis of conduction and selectivity in ion channels, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 1896-1906, doi: 10.1021/ct501053x.
78. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., and Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new features for an old bird, *Comput. Phys. Commun.*, **185**, 604-613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
79. Makarov, G. I., Sumbatyan, N. V., and Bogdanov, A. A. (2017) Structural insight into interaction between C20 phenylalanyl derivative of tylosin and ribosomal tunnel, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 925-932, doi: 10.1134/S0006297917080077.
80. Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W. F., et al. (1999) Peptide folding: when simulation meets experiment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 236-240, doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M.
81. Ludwig, T., Krizsan, A., Mohammed, G. K., and Hoffmann, R. (2022) Antimicrobial activity and 70S ribosome binding of apidaecin-derived Api805 with increased bacterial uptake rate, *Antibiotics*, **11**, 430, doi: 10.3390/antibiotics11040430.
82. Kolano, L., Knappe, D., Volke, D., Sträter, N., and Hoffmann, R. (2020) Ribosomal target-binding sites of antimicrobial peptides Api137 and Onc112 are conserved among pathogens indicating new lead structures to develop novel broad-spectrum antibiotics, *Chembiochem.*, **21**, 2628-2634, doi: 10.1002/cbic.202000109.
83. Krizsan, A., Volke, D., Weinert, S., Sträter, N., Knappe, D., et al. (2014) Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 12236-12239, doi: 10.1002/anie.201407145.
84. Holfeld, L., Hoffmann, R., and Knappe, D. (2017) Correlating uptake and activity of proline-rich antimicrobial peptides in *Escherichia coli*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 5581-5592, doi: 10.1007/s00216-017-0496-2.
85. Tereshchenkov, A. G., Shishkina, A. V., Karpenko, V. V., Chertkov, V. A., Konevega, A. L., et al. (2016) New fluorescent macrolide derivatives for studying interactions of antibiotics and their analogs with the ribosomal exit tunnel, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1163-1172, doi: 10.1134/S0006297916100138.
86. Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2012) Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel, *Cell*, **151**, 508-520, doi: 10.1016/j.cell.2012.09.018.
87. Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A. S. (2018) Context-specific action of ribosomal antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.*, **72**, 185-207, doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062329.
88. Beckert, B., Leroy, E. C., Sothselvam, S., Bock, L. V., Svetlov, M. S., et al. (2021) Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics, *Nat. Commun.*, **12**, 4466, doi: 10.1038/s41467-021-24674-9.
89. Dzyubak, E., and Yap, M. N. (2016) The expression of antibiotic resistance methyltransferase correlates with mRNA stability independently of ribosome stalling, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 7178-7188, doi: 10.1128/AAC.01806-16.
90. Vester, B., and Douthwaite, S. (2001) Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1-12, doi: 10.1128/AAC.45.1.1-12.2001.
91. Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2005) Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance, *Cell*, **121**, 257-270, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.005.
92. Jeong, C. S., Hwang, J., Do, H., Cha, S. S., Oh, T. J., et al. (2020) Structural and biochemical analyses of an aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*, *Sci. Rep.*, **10**, 21503, doi: 10.1038/s41598-020-78699-z.
93. Shaw, W. V. (1984) Bacterial resistance to chloramphenicol, *Br. Med. Bull.*, **40**, 36-41, doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071945.
94. Gäumann, E., Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Neipp, L., Prelog, V., et al. (1960) Lankamycin und lankacidin, *Helv. Chim. Acta*, **80**, 601-606, doi: 10.1002/hlca.19600430221.
95. Belousoff, M. J., Shapira, T., Bashan, A., Zimmerman, E., Rozenberg, H., et al. (2011) Crystal structure of the synergistic antibiotic pair, lankamycin and lankacidin, in complex with the large ribosomal subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2717-2722, doi: 10.1073/pnas.1019406108.
96. Wagner, R. L., Hochstein, F. A., Murai, K., Messina, N., and Regna, P. P. (1953) Magnamycin. A new antibiotic, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4684-4687, doi: 10.1021/ja01115a019.
97. Ross, S. (1968) Erythromycin, oleandomycin and triacetyloleandomycin, *Pediatr. Clin. N. Am.*, **15**, 119-129, doi: 10.1016/s0031-3955(16)32093-4.
98. Gürel, G., Blaha, G., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2009) Structures of triacetyloleandomycin and

- mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 5010-5014, doi: 10.1128/AAC.00817-09.
99. Sano, M., Sunazuka, T., Tanaka, H., Yamashita, K., Okachi, R., et al. (1985) Chemical modification of spiramycins. VI. Synthesis and antibacterial activities of 3,3"-di-O-acyl-4"-O-sulfonyl and 3,3"-di-O-acyl-4"-O-alkyl derivatives of spiramycin I, *J. Antibiot.*, **38**, 1350-1358, doi: 10.7164/antibiotics.38.1350.
100. Omura, S., Katagiri, M., Umezawa, I., Komiyama, K., and Maekawa, T. (1968) Structure-biological activities relationships among the leucomycins and their derivatives, *J. Antibiot.*, **21**, 532-538, doi: 10.7164/antibiotics.21.532.
101. Okamoto, R., Fukumoto, T., Nomura, H., Kiyoshima, K., Nakamura, K., et al. (1980) Physico-chemical properties of new acyl derivatives of tylosin produced by microbial transformation, *J. Antibiot.*, **33**, 1300-1308, doi: 10.7164/antibiotics.33.1300.
102. Huang, G., Okabe, M., Kahar, P., Tsunekawa, H., and Park, Y. (2001) Optimization of tylosin feeding rate profile in production of acetyl-isovaleryl tylosin (AIV) from tylosin by *Streptomyces thermotolerans* YN554, *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 504-508, doi: 10.1263/jbb.91.504.
103. Ettayebi, M., Prasad, S. M., and Morgan, E. A. (1985) Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **162**, 551-557, doi: 10.1128/jb.162.2.551-557.1985.
104. Sander, P., Prammananan, T., Meier, A., Frischkorn, K., and Böttger, E. C. (1997) The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance, *Mol. Microbiol.*, **26**, 469-480, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5811946.x.

CONJUGATES OF DESMYCOSIN WITH FRAGMENTS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ONCOCIN: SYNTHESIS, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, INTERACTION WITH RIBOSOME

Z. Z. Khairullina¹, G. I. Makarov², A. G. Tereshchenkov³, V. S. Buev⁴, D. A. Lukianov^{1,5}, V. I. Polshakov⁶, V. N. Tashlitsky¹, I. A. Osterman^{1,5}, and N. V. Sumbatyan^{1*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: sumbtyan@belozersky.msu.ru

² South Ural State University, 454080 Chelyabinsk, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁵ Skolkovo Institute of Science and Technology, 143025 Skolkovo, Russia

⁶ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Design and synthesis of conjugates consisting of the macrolide antibiotic desmycosin and fragments of the antibacterial peptide oncocin were performed to develop approaches to the creation of new antimicrobial compounds. New compounds were shown to bind to the *E. coli* 70S ribosomes, to inhibit bacterial protein synthesis *in vitro* as well as to suppress bacterial growth. The conjugates of *N*-terminus hexa- and tripeptide fragments of oncocin and 3,2',4"-triacetyldesmycosin were found to be active against some strains of macrolide-resistant bacteria. By simulating the dynamics of the complexes of these compounds with wild-type bacterial ribosomes and with ribosomes, containing A2059G 23S RNA mutation, the specific structural features of their interactions, were revealed.

Keywords: macrolides, peptide derivatives, antimicrobial peptides, ribosome, molecular dynamics simulations, nascent peptide exit tunnel