

©Коллектив авторов

## МОДЕЛИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И *IN VITRO* ТЕСТИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ НЕБЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А.С. Саргсян<sup>1\*</sup>, Л.Т. Карапетян<sup>1</sup>, А.В. Мхитарян<sup>1</sup>, Л.А. Степанян<sup>1</sup>, Т.О. Саргсян<sup>1,2</sup>,  
Ю.М. Дангян<sup>1</sup>, А.В. Саргсян<sup>1</sup>, Г.Г. Оганезова<sup>1</sup>, Н.А. Оганесян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА,  
Армения, 0056, Ереван, Гюрдян, 14; \*эл. почта: armenssargsyan@gmail.com

<sup>2</sup>Ереванский Государственный Университет, Армения, 0025, Ереван, Алек Манукян, 1

В настоящее время небелковые аминокислоты и синтетические пептиды широко используются в качестве блоков при создании лекарственных препаратов. Многие протеазы представляют большой интерес для фармакологии в связи с их ключевой ролью в различных патологиях. Бактериальная коллагеназа (КФ 3.4.24.3) является весьма привлекательной мишенью для разработки лекарственных препаратов, поскольку ингибиторы бактериальной коллагенолитической протеазы могут остановить распространение заболеваний, вызванных инфекциями. В данной работе исследовали взаимодействие пептидов, содержащих необычные аминокислоты, с коллагеназой *Clostridium histolyticum*. По результатам докинг-анализа для дальнейших исследований были отобраны 4 пептида, и был проведён их синтез. Все протестированные соединения ингибировали активность коллагеназы с диапазоном значений IC<sub>50</sub> 1,45–2,08 мкМ. Выявлена антибактериальная активность синтезированных соединений в отношении штаммов, устойчивых к антибиотикам. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) были определены в диапазоне 4,6–9,2 мкг/мл.

**Ключевые слова:** небелковая аминокислота; докинг; коллагеназа; ингибитор; антибактериальная активность

**DOI:** 10.18097/PBMC20247006413

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время появление штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) представляет собой глобальную проблему здравоохранения. Терапевтическое лечение бактериальных инфекций антибиотиками становится всё более затруднительным, поскольку у бактерий развивается устойчивость к применяемым против них антибиотикам или к тем, с которыми они никогда раньше не сталкивались [1]. Спрос на новые противомикробные препараты растёт в связи с распространением устойчивых к антибиотикам патогенных штаммов бактерий. Бактериальные внеклеточные протеазы, действующие как факторы вирулентности, являются фармакологическими мишенями для борьбы с бактериальными инфекциями. Сочетание ингибиторов протеазы и ингибиторов роста бактерий может повысить эффективность лечения инфекций.

Небелковые аминокислоты представляют собой класс соединений, которые широко используются в разработке лекарственных препаратов, в частности, для разработки лекарственных препаратов на основе пептидов [2].

Оптически активные небелковые α-аминокислоты были исследованы на их способность взаимодействовать с коллагеназой *Clostridium histolyticum*. Для идентификации низкомолекулярных ингибиторов коллагеназы были использованы как структурно-ориентированный подход к разработке лекарственных средств, так и метод определения активности ферментов в присутствии аминокислот. По данным докинг-анализа, ряд небелковых

аминокислот продемонстрировали способность образовывать связи с коллагеназой. После докинг-анализа определяли активность фермента в присутствии исследуемых аминокислот. Результаты показали, что (S)-β-[4-аллил-3-бутил-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин ингибируют активность коллагеназы. Было высказано предположение, что ингибиторы коллагеназ имеют различные замещённые группы, такие как -3-бутил, 3-(пиридин-4'-ил) и -3-(пиридин-3'-ил) [3].

С целью повышения уровня ингибирования коллагеназы было проведено моделирование пептидов, содержащих в своей структуре (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин, после чего проведён синтез выбранных пептидов, изучено их влияние на активность коллагеназы и рост бактерий.

Грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются распространёнными инфекциями, представляющими угрозу для общества. Большинство штаммов, выделенных в клиниках, обладают МЛУ, что позволяет исследовать различные механизмы устойчивости к антибиотикам. Одним из подходов к преодолению резистентности является разработка и синтез новых противомикробных препаратов, преимущественно воздействующих на более чем одну мишень в бактериальной клетке [4]. В течение последних десятилетий нами были синтезированы небелковые аминокислоты и пептиды и исследована их биологическая активность.

В результате были выявлены ингибиторы сериновых протеаз и металлопротеаз, ингибиторы роста МЛУ/полирезистентных штаммов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* [5].

Целью данного исследования было выявление новых небелковых аминокислот и пептидов, обладающих антибактериальной активностью по отношению к антибиотикорезистентным штаммам *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia*.

## МЕТОДИКА

### Молекулярный докинг

Структуры соединений были построены с помощью ChemBioOffice 2010 (ChemBio3D Ultra 12.0). Свободная энергия лиганда была минимизирована с использованием силового поля MM2 и усечённого метода Ньютона-Рафсона. Пространственная структура коллагеназы G была взята из Банка данных белков Исследовательской лаборатории структурной биоинформатики (PDB ID: 2Y50). Молекулы воды удаляли и добавляли полярные атомы водорода. Докинг лиганда с ферментом осуществляли с помощью программ AutoGrid 4 и AutoDock Vina [6]. Лиганды ранжировали с использованием функции оценки энергии связывания, а для ускорения расчёта оценок использовали взаимодействие белка с лигандом на основе решетки. Были выбраны наиболее перспективные модели взаимодействия, для которых определяли вид взаимодействия, а также тип и длину связей.

### Реактивы

Все реагенты были получены из коммерческих источников и использованы без дополнительной очистки. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на листах алюминиевой фольги, предварительно покрытых Кизельгелем 60 F254 толщиной 0,2 мм (“Merck”, США). Точку плавления (mp) определяли с использованием прибора для измерения температуры плавления Elektrothermal (“Elektrothermal Engineering”, Великобритания). Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометре Varian Mercury 300 МГц (“Varian Inc.”, США) с использованием TMS в качестве внутреннего стандарта. Элементный анализ выполняли на анализаторе Euro EA3000 (“Eurovector”, Италия). Химическую чистоту синтезированной аминокислоты оценивали с использованием системы ВЭЖХ Waters Separation Module e2695 (“Waters”, США), оснащённой УФ-детектором Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance (“Waters”). Хроматографический анализ проводили на колонке Alltima C18 (250 мм  $\times$  4,6 мм, размер частиц 5 мкм; “Hichrom Ltd.”, Германия). Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и 2 мМ персульфата аммония (15:85 v/v). Пробу (10 мг в 1 мл воды) вводили в объёме 5 мкл.

### Синтез 9-флуоренилметоксикарбонил-аминокислот

В круглодонную колбу добавляли смесь из 0,0043 моль аминокислот (**2**, **3**) и

0,456 г (0,0043 моль)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Смесь перемешивали при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки до образования прозрачного раствора. Затем к реакционной смеси добавляли 1,955 г (0,0058 моль) N-(9-флуоренилметоксикарбонил)сукцинимид (**1**), растворённого в 2 мл 1,4-диоксана. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч.

За ходом реакции следили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле ( $\text{SiO}_2$ ), подвижная фаза состояла из  $\text{CHCl}_3$ /этилацетата/MeOH (4:2:1) и проявлялась хлортолуидином.

Для удаления исходных материалов, не вступивших в реакцию, реакционную смесь сначала дважды обрабатывали диэтиловым эфиром. Затем добавляли 20 мл дистиллированного этилацетата и подкисляли смесь до pH 2 при помощи 2 N соляной кислоты. После добавляли 10 мл этилацетата и дважды экстрагировали. Объединённые органические фракции сушили над безводным сульфатом натрия.

После декантации органические растворители удаляли вакуумным выпариванием при температуре 50–60°C. Целевой продукт перекристаллизировали из смеси этилацетата и гексана (1:3), отфильтровали и высушивали в условиях вакуума при температуре 50–60°C, в результате чего была получена белая кристаллическая масса.

### 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)- $\beta$ -[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- $\alpha$ -аланин (**4**)

Выход конечного продукта составил 65%. Вычислено, %:  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$  (527,60) C, 63,74; H, 4,78; N, 13,27. Найдено, %: C, 63,81; H, 4,79; N, 13,31.

$^1\text{H}$  ЯМР спектр ( $\text{DMSO}-d_6/\text{CCl}_4$  1/3,  $\delta$ , p.p.m, Hz): 4,08–4,24 m (3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ); 4,48 dd (1H,  $J=13,0$ , 8,4,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ); 4,72 ddd (1H,  $J=8,4$ , 8,2, 4,6,  $\text{NHCH}$ ); 4,81 dd (1H,  $J=13,0$ , 4,6,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ); 4,72–4,86 m (2H,  $\text{CH}_2$  All); 5,05 br.d (1H,  $J=17,3$ ,  $=\text{CH}_2$ ); 5,18 br. d (1H,  $J=10,6$ ,  $=\text{CH}_2$ ); 5,89 ddt (1H,  $J=17,3$ , 10,6, 4,6,  $=\text{CH}$ ); 7,18–7,26 m (2H, Ar), 7,30–7,37 m (2H, Ar); 7,51–7,55 m (2H, Py); 7,54 b.d (1H,  $J=8,2$ , NH); 7,59–7,65 m (2H, Ar); 7,70–7,74 m (2H, Ar); 8,52–8,56 m (2H, Py); 12,5 v.b (1H, COOH);  $^{13}\text{C}$ : 46,5 (CH); 47,0 ( $\text{CH}_2$ ); 49,4 ( $\text{CH}_2$ ); 51,8 (NCH); 65,9 ( $\text{OCH}_2$ ); 117,3; 119,29; 119,31; 121,5; 124,9; 125,0; 126,5; 126,96; 127,0; 130,8; 132,6; 140,4; 140,5; 143,4; 143,5; 147,5; 149,7; 155,3; 168,2; 170,4.

### 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)- $\beta$ -[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]- $\alpha$ -аланин (**5**)

Выход конечного продукта составил 67%. Вычислено, %:  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$  (527,60) C, 63,74; H, 4,78; N, 13,27. Найдено, %: C, 63,80; H, 4,80; N, 13,32.

$^1\text{H}$  ЯМР спектр ( $\text{DMSO}-d_6/\text{CCl}_4$  1/3,  $\delta$ , p.p.m, Hz): 4,08–4,26 m (3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ); 4,50 dd (1H,  $J=12,9$ , 8,0,  $\text{NCH}_2\text{CH}$ ); 4,73–4,77 m (2H,  $\text{CH}_2$  All); 4,70 ddd (1H,  $J=8,2$ , 8,0, 4,8,  $\text{NHCH}$ ); 4,79 dd (1H,  $J=12,9$ , 4,8,  $\text{NCH}_2\text{CHNH}$ ); 5,03 br.d (1H,  $J=17,1$ ); 5,18 br. d (1H,  $J=10,5$ ,  $=\text{CH}_2$ ); 5,88 ddt (1H,  $J=17,1$ , 10,5, 4,7,  $=\text{CH}$  All); 7,19–7,26 m (2H, Ar), 7,30–7,38 m (3H, Ar);

7,50 b.d (1H, J=8,2, NH); 7,60–7,65 m (2H, Ar); 7,70–7,74 m (2H, Ar); 7,97 ddd (1H, J=8,0, 2,0, 1,5, 6-H Py); 8,63 dd (1H, J=4,8, 1,5, 4-H Py); 8,80 d (1H, J=2,0, 2-H Py); <sup>13</sup>C: 46,5 (CH); 46,9 (NCH<sub>2</sub>); 49,2 (NCH<sub>2</sub>); 51,9 (NCH); 65,9 (OCH<sub>2</sub>); 117,3 (CH); 119,22 (CH); 119,24 (CH); 121,8; 122,9 (CH); 124,9 (CH); 125,0 (CH); 126,5 (2.CH); 126,91 (CH); 126,94 (CH); 130,9 (CH); 135,2 (CH); 140,4; 140,5; 143,3, 143,5; 147,3; 148,4 (CH); 150,8 (CH); 155,3; 167,9; 170,4.

*Синтез N-гидроксисукцинимидных эфиров 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (7) и 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (8)*

0,291 г (0,0025 моль) N-гидроксисукцинимид (2), растворённого в смеси 6 мл 1,4-диоксана и 3 мл метилхлорида, добавляли к 0,0023 моль 9-флуоренилметоксикарбониламинокислот (4, 5). Затем к реакционной смеси добавляли 0,495 г (0,0024 моль) дициклогексилкарбодиимид (ДЦК), растворённого в 3 мл 1,4-диоксана. Смесь перемешивали приблизительно 2 ч при 0°C и в течение 1 ч при комнатной температуре.

Образовавшийся осадок фильтровали, а растворитель удаляли дистилляцией с использованием ротаторного выпаривателя. Остаток кристаллизовали из смеси этилацетата и гексана (1:2). Выход конечного продукта 7 составил 75%, конечного продукта 8 — 70%.

*Синтез дипептидов I*

В плоскодонную колбу помещали 0,1425 г (0,0019 моль) глицина и добавляли 6,75 мл 0,5 М NaOH и 0,053 г (0,00063 моль) NaHCO<sub>3</sub>. Через 15 мин к реакционной смеси добавляли 0,0017 моль 9-флуоренил-метоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина и 9-флуоренилметокси-карбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланил N-гидроксисукцинимидных эфиров, растворённых в 2 мл 1,4-диоксана.

Реакционные смеси перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре, а затем выдерживали при 5°C в течение ночи. На следующий день к каждой реакционной смеси добавляли 5 мл этилацетата, 3 мл 10% раствора лимонной кислоты и 0,2 г NaCl и перемешивали в течение 15 мин. Органический слой отделяли, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и удаляли растворитель в вакууме при 50°C. Остаток перекристаллизовали из смеси этилацетата и гексана (1:3). Реакцию контролировали методом тонкослойной хроматографии с использованием системы хлороформ:метанол:этилацетат (3:2:1).

*9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (9)*

Выход конечного продукта составил 60%. Вычислено, %: C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S (584,65) C, 61,63; H, 4,83; N, 14,37. Найдено, %: C, 61,69; H, 4,85; N, 14,41.

<sup>1</sup>H ЯМР спектр (DMSO-d<sub>6</sub>/CCl<sub>4</sub> 1/3, δ, p.p.m, Hz): 3,81 dd (1H, J=17,7, 5,6, CH<sub>2</sub>NH); 3,84 dd (1H, J=17,7, 5,6, CH<sub>2</sub>NH); 4,04–4,12 m (2H); 4,20 dd (1H, J=8,6, 6,0); 4,45 dd (1H, J=13,5, 8,8); 4,68–4,85 m (4H); 5,05 dtd (1H, J=17,2, 1,1, 0,7, =CH<sub>2</sub>); 5,16 br. d (1H, J=10,5, =CH<sub>2</sub>); 5,87 ddt (1H J=17,2, 10,5, 4,8, =CH); 7,20–7,27 m (2H); 7,30–7,37 m (2H); 7,50 br.d (1H, J=6,5, NHCH), 7,50–7,54 m (2H, H-2,2' Py); 7,60–7,66 m (2H, Ar); 7,70–7,75 m (2H, Ar); 8,17 br.t (1H, J=5,6, NHCH<sub>2</sub>), 8,48–8,54 m (2H, H-3-3' Py); 12,30 br (1H, COOH); <sup>13</sup>C: 40,6 (CH<sub>2</sub>); 46,4 (CH); 46,9 (NCH<sub>2</sub>); 50,0 (NCH<sub>2</sub>); 52,9 (NCH); 66,0 (OCH<sub>2</sub>); 117,2; 119,20; 119,25; 121,5; 124,9; 125,1; 126,4; 126,90; 126,95; 130,8; 132,5; 140,4; 140,5; 143,2, 143,5; 147,5; 149,6; 155,3; 168,2; 168,3; 170,3.

*9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (10)*

Выход конечного продукта составил 60%. Вычислено, %: C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S (584,65) C, 61,63; H, 4,83; N, 14,37. Найдено, %: C, 61,71; H, 4,84; N, 14,40.

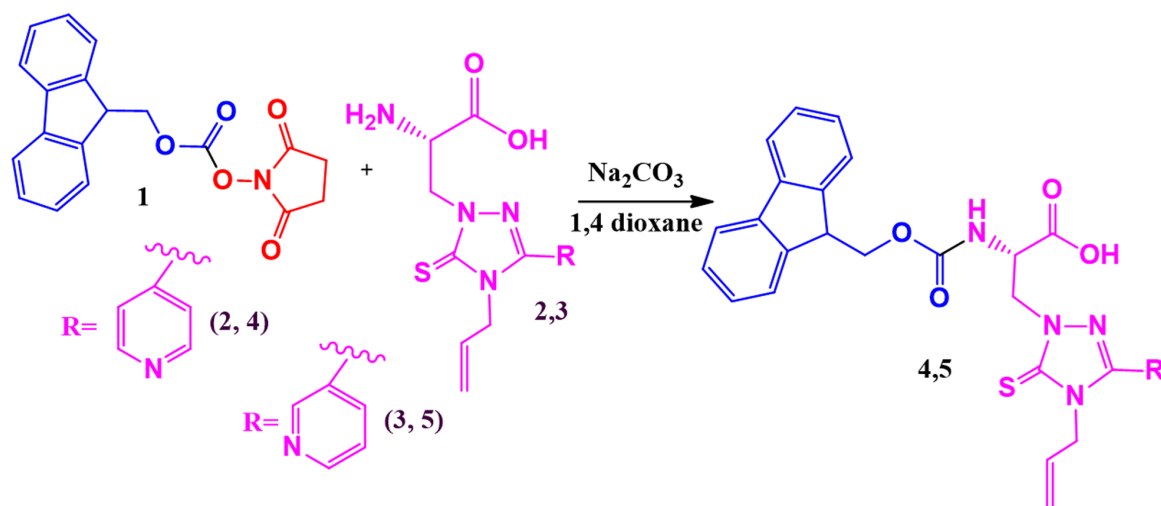
<sup>1</sup>H ЯМР спектр (DMSO-d<sub>6</sub>/CCl<sub>4</sub> 1/3, δ, p.p.m, Hz): 3,80 dd (1H, J=17,5, 5,6, CH<sub>2</sub>NH); 3,84 dd (1H, J=17,7, 5,6, CH<sub>2</sub>NH); 4,04–4,14 m (2H); 4,17–4,26 m (1H, OCH<sub>2</sub>CH); 4,47 dd (1H, J=13,6, 8,9, NCH<sub>2</sub>); 4,65–4,75 m (3H, NCH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub> All); 4,81 td (1H, J=8,9, 4,6, NCH); 5,02 dtd (1H, J=17,2, 1,7, 0,9, =CH<sub>2</sub>); 5,15 br. d (1H, J=10,5, =CH<sub>2</sub>); 5,86 ddt (1H, J=17,2, 10,5, 4,8, =CH); 7,20–7,27 m (2H); 7,30–7,37 m (2H); 7,30–7,37 (1H, 5-H Py); 7,49 b.d (1H, J=8,9, NHCH) 7,61–7,65 m (2H); 7,70–7,74 m (2H, 8H); 7,96 ddd (1H, J=8,0, 2,2, 1,4, 6-H Py); 8,16 br.t (1H, J=5,6, NHCH<sub>2</sub>), 8,61 dd (1H, J=4,8, 1,4, 4-H, Py); 8,79 b.d (1H, J=2,2, 2-H, Py); 12,18 v. B. (1H, COOH); <sup>13</sup>C: 40,7 (CH<sub>2</sub>); 46,5 (CH); 46,9 (CH<sub>2</sub>); 49,9 (CH<sub>2</sub>); 53,1 (NCH); 66,1 (OCH<sub>2</sub>); 117,3; 119,27; 119,30; 121,8; 123,0; 125,0; 125,1; 126,54; 127,00; 127,03; 131,0; 135,3; 140,4; 140,5; 143,3, 143,5; 147,5; 148,4; 150,8; 155,3; 168,2; 168,0.

*Синтез защищённых 9-флуоренилметокси-карбонильных потенциально биологически активных небелковых аминокислот (4, 5)*

Синтез оптимизировали путём варьирования комбинаций растворителя и основания. Были протестированы следующие комбинации растворителя/основы: метанол/NaOH, метанол/KOH, метанол/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, метанол/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ацетон/KOH, ацетон/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-диоксан/NaOH, 1,4-диоксан/KOH, 1,4-диоксан/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-диоксан/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Реакцию проводили по ранее разработанной методике [7]. Было установлено, что оптимальными условиями реакции являются 1,4-диоксан в качестве растворителя и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в качестве основания при комнатной температуре, при таких условиях реакция протекает быстрее и с высокими выходами. Схема реакции представлена на рисунке 1.

*Выбор небелковых аминокислот*

Небелковые аминокислоты выбирали на основе ряда ключевых свойств гетероциклических



**Рисунок 1.** Реакция защиты для получения аминокислот 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин и 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (4, 5).

аминокислот. Аминокислоты и пептиды, содержащие гетероциклы, играют важную роль в разработке лекарственных препаратов благодаря своей повышенной стабильности и терапевтическому потенциалу. Такие соединения обычно обладают низкой токсичностью, высокой биодоступностью и благоприятными метаболическими и фармакокинетическими свойствами. Синтетические гетероциклически замещённые аминокислоты и пептиды предлагают многообещающий путь для разработки новых, менее токсичных и более безопасных лекарственных препаратов с многочисленными полезными свойствами [8–10]. Азотсодержащие гетероциклические соединения представляют значительный интерес ввиду их разнообразного применения. Было обнаружено, что они проявляют положительную активность в различных терапевтических областях, включая: противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое, противоязвенное, антидепрессивное, противомаларийное, противотуберкулёзное, противовирусное, антигипертензивное, антидиабетическое, ингибирование холинэстеразы [11, 12].

#### Синтез дипептидов II

Для синтеза дипептидов 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (9) и 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицина (10) на первом этапе было осуществлено превращение в сукцинимидные эфиры согласно схеме, представленной на рисунке 2.

#### Реакция конденсации

На последней стадии активированные эфиры 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина и 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланина (7, 8) вступали в реакцию

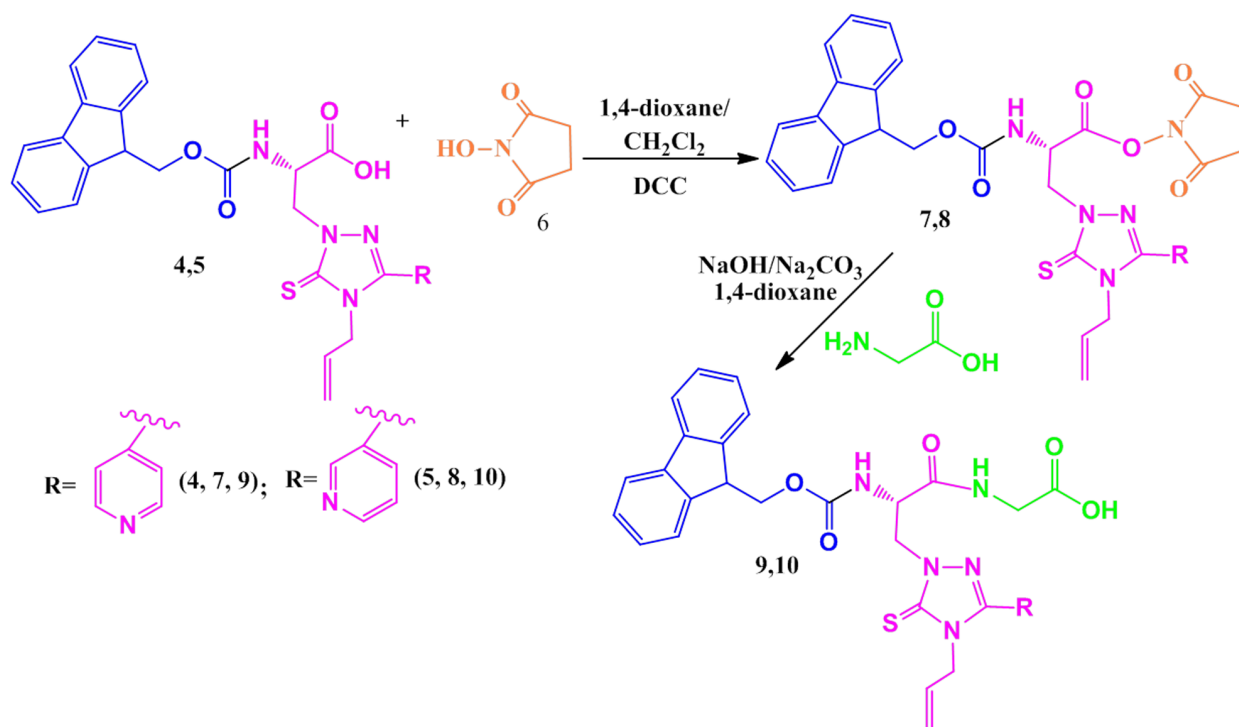
с глицином в 0,5 М водном растворе NaOH в 1,4-диоксане при комнатной температуре. В результате этой реакции были синтезированы дипептиды 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (9) и 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (10) (рис. 2).

#### Определение активности коллагеназы

Коллагеназную активность измеряли методом, основанным на определении свободных аминогрупп, высвобождающихся в результате гидролиза субстрата [13]. Реакционная смесь содержала 0,05 М буфера HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, “Merck”), pH 7,2, 10 мг/мл желатина (“Merck”) и 0,025 мг/мл коллагеназы (“Alfa Aesar”, США). Реакция протекала при температуре 37°C. Концентрацию аминогрупп в реакционной смеси определяли с помощью реагента орто-фталового альдегида (OPA), содержащего 0,2 М боратный буфер, pH 9,7, 0,1667 мг/мл OPA (“Alfa Aesar”) и 1,18 мМ меркаптоэтанол (“Alfa Aesar”). Аликвоты (50 мкл) отбирали каждые 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 6 мкл 30% трихлоруксусной кислоты. Реагент OPA (1,5 мл) и H<sub>2</sub>O (1,5 мл) добавляли к аликвоте и после 5-минутной инкубации при 27°C регистрировали A<sub>340</sub>.

#### Антибактериальная активность

В качестве тестовых культур использовали следующие штаммы: *P. aeruginosa* MDC 5249, устойчивый к канамицину (kan), стрептомицину (str), хлорамфениколу (cam), аугментину (amc), амоксициллину (amx), ампициллину (amp), цефиксиму (cfx) и ципрофлоксацину (cip) (ЦДМ, НПО “Армбиотехнология” НАН РА), и клинические образцы полученные из Национального института здоровья Республики Армения: *P. aeruginosa* 80 (моча) устойчивый к имипенему (imi),



**Рисунок 2.** Реакция получения пептидов 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицина и 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридинил-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицина (9, 10).

пиперациллину/тазобактаму (pip/tab), азтреонаму (azt), ципрофлоксацину (cip), цефепиму (cfp); *E. coli* ESB� 64 (раневые выделения) устойчивый к имипенему (imi), азтреонаму (azt), гентамицину (gen), тобрамицину (tob), амикацину (amk), ципрофлоксацину (cip); *K. pneumonia* 63 (мокрота) устойчивый к ампициллину (amp), цефазолину (cfz), ципрофлоксацину (cip), цефуроксиму (Rx), левофлоксацину (lfx). Устойчивость штаммов к антибиотикам определяли в соответствии со стандартными определениями Европейского комитета по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам (EUCAST).

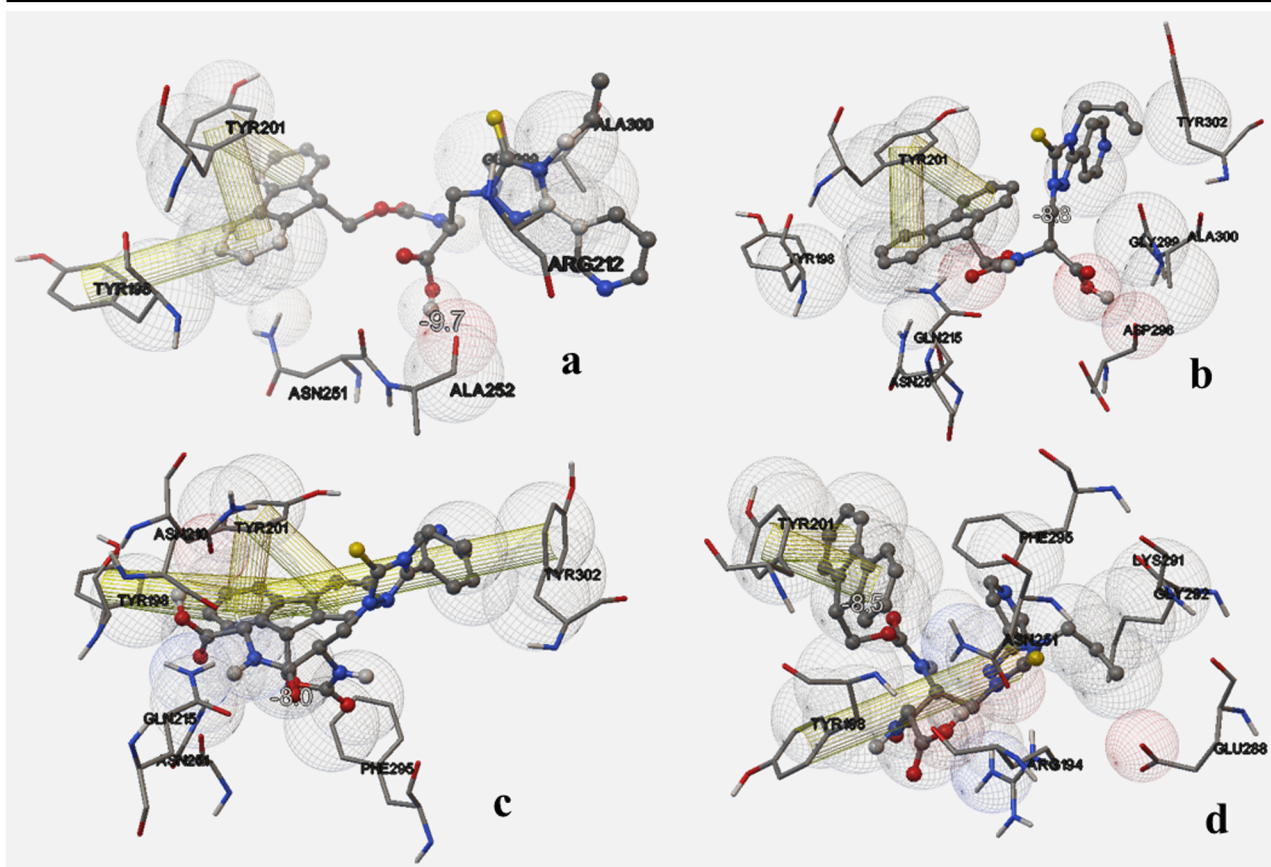
Антибактериальную активность оценивали методом серийных разведений. Для стандартных методов микроразведения в агаре (Nutrient Agar, "Himedia Laboratories Pvt.Ltd.", Индия) и LB использовали инокулят с концентрацией  $10^8$  КОЕ/мл. Антибактериальную активность тестировали в отношении МЛУ/полирезистентных штаммов *P. aeruginosa* 5249, *P. aeruginosa* 80, *K. pneumoniae* 63, *E. coli* ESB� 64. Чувствительность штаммов оценивали путём серийных разведений в присутствии исследуемого соединения в конечных концентрациях в бульоне от 0,005 мМ до 0,5 мМ. В 96-луночные планшеты добавлялось 10 мкл культуры, 10 мкл небелковой аминокислоты и 200 мкл бульона. Затем инокулированные планшеты инкубировали в течение 16–18 ч при температуре 37°C (*S. maltophilia* инкубировали при температуре 30°C). Оптическую плотность бактериальных культур измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC ("Thermo Scientific", США). Каждый анализ проводили не менее двух раз в разные дни.

МИК определяли как минимальную концентрацию соединения, которая подавляла видимый рост бактерий после инкубации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании наших предыдущих результатов, где было показано ингибирование коллагеназы (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланином и (S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланином, было решено создать на их основе ряд пептидов [3]. Были созданы различные структуры с включением упомянутых небелковых аминокислот и оценена возможность их синтеза. На втором этапе был проведён докинг-анализ с помощью AutoDock Vina. Согласно значениям  $\Delta G$  (< -8 ккал/моль) были отобраны 4 пептида, которые связывались с коллагеназой в одном и том же участке/кармане каталитического субдомена (рис. 1) [14]. Были рассчитаны число, положение и длина связей в комплексах фермент-лиганд. Результаты расчётов показали, что основную роль в этом взаимодействии играют *p-p* связи. Так, согласно результатам расчётов, 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (9) образует *p-p* связь с триазольным кольцом  $\text{Tu}^{198}$  (10,438 Å) и двойную *p-p* связь с  $\text{Tu}^{201}$  (4,325 Å и 3,918 Å) (рис. 3а). 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (4) образует двойную *p-p* связь с  $\text{Tu}^{201}$  (4,231 Å и 4,295 Å) (рис. 3б). 9-флуоренилметоксикарбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-





**Рисунок 3.** Взаимодействие бактериальной коллагеназы с **a.** 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (**9**), **b.** 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (**4**), **c.** 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин (**10**) и **d.** 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (**5**). Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

**Таблица 1.** Взаимодействие и ингибирующий эффект синтетических пептидов на активность коллагеназы

Название	ΔG (ккал/моль)	IC <sub>50</sub> (мкМ)
9-флуоренилметоксикарбонил-( <i>S</i> )-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин ( <b>4</b> )	-8,8	1,45
9-флуоренилметоксикарбонил-( <i>S</i> )-β-[4-аллил-3-(пиридин-4'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин ( <b>9</b> )	-8,5	2,08
9-флуоренилметоксикарбонил-( <i>S</i> )-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин ( <b>5</b> )	-9,7	1,56
9-флуоренилметоксикарбонил-( <i>S</i> )-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланилглицин ( <b>10</b> )	-8,0	1,75

α-аланилглицин (**10**) взаимодействует с коллагеназой, образуя 5 *p-p* связей: двойную *p-p* с Tyr<sup>201</sup> (4,859 Å и 3,798 Å), двойную *p-p* с Tyr<sup>198</sup> (6,116 Å и 9,926 Å) и *p-p* взаимодействие с включением трёх ароматических колец с Tyr<sup>302</sup> его флуоренильной и пиридиновой группами (13,224 Å) (рис. 3с). 9-флуоренилметоксикарбонил-(*S*)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин (**5**) образует двойную *p-p* связь с Tyr<sup>201</sup> (4,277 Å и 4,224 Å) и еще одну с Tyr<sup>198</sup> (6,492 Å) (рис. 3d). Эти 4 соединения были выбраны для синтеза, который проводили по описанным выше методам. После синтеза влияние новых соединений на активность коллагеназы *C. histolyticum*

определяли путём измерения свободных аминогрупп с использованием *o*-фталальдегида (OPA). Все они ингибировали коллагеназу (значения IC<sub>50</sub> представлены в таблице 1).

Антибактериальная активность вышеупомянутых непротеиногенных аминокислот и пептидов на их основе была протестирована в отношении *P. aeruginosa* MDC 5249, а также клинических изолятов *P. aeruginosa* 80, *E. coli* ESBL 64 и *K. pneumoniae* 63 методом микроразведений. В 96-луночные планшеты добавляли 10 мкл разбавленной культуры. К инокуляту добавляли различные концентрации исследуемых соединений и 200 мкл бульона. Была определена

Таблица 2. Антибактериальная активность соединений 4, 5, 9 и 10

Штаммы* / Соединения	(5) (мкг/мл)	(10) (мкг/мл)	(4) (мкг/мл)	(9) (мкг/мл)
<i>P. aeruginosa</i> MDC 5249	27	30	55	60
<i>P. aeruginosa</i> 80 (моча)	27	30	55	60
<i>E. coli</i> ESBL 64 (выделения из ран)	55	60	>55	>60
<i>K. pneumonia</i> 63 (мокрота)	55	30	55	>60

Примечание: \* инокулят – 10<sup>4</sup> КОЕ/мл.

чувствительность штаммов к вышеупомянутым соединениям в конечных концентрациях от 0,001 мМ до 0,5 мМ. Затем инокулированные планшеты инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C. Оптическую плотность бактериальных культур измеряли с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC.

Согласно полученным результатам, все соединения обладают антибактериальной активностью по отношению к исследованным штаммам. Наибольшую антибактериальную активность продемонстрировал 9-флуоренилметокси-карбонил-(S)-β-[4-аллил-3-(пиридин-3'-ил)-5-тиоксо-1,2,4-триазол-1-ил]-α-аланин с МИК 55 мкг/мл. *E. coli* ESBL 64 оказалась более устойчивой к исследуемым соединениям с МИК >60 мкг/мл (табл. 2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам моделирования в качестве потенциальных ингибиторов коллагеназы были выбраны для синтеза соединения 4, 5, 9, 10. Все протестированные соединения ингибировали активность коллагеназы в диапазоне значений IC<sub>50</sub> 1,45–2,08 мкМ. Кроме того, эти соединения продемонстрировали антибактериальную активность по отношению к МЛУ тест-культурам. Выявленные особенности соединений 4, 5, 9 и 10 позволяют рассматривать их в качестве потенциальных антибактериальных веществ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по высшему образованию и науке РА в рамках научного проекта № 23Т/АА-006 и НАН РА в рамках “Программы поддержки молодых ученых” по коду 22YSSPD-015.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).

## ЛИТЕРАТУРА

- Giacomini E., Perrone V., Alessandrini D., Paoli D., Nappi C., Degli Esposti L. (2021) Evidence of antibiotic resistance from population-based studies: A narrative review. *Infect. Drug Resist.*, **14**, 849–858. DOI: 10.2147/IDR.S289741
- Du Y., Li L., Zheng Y., Liu J., Gong J., Qiu Z., Li Y., Qiao J., Huo Y.X. (2022) Incorporation of non-canonical amino acids into antimicrobial peptides: Advances, challenges, and perspectives. *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**(23), e0161722. DOI: 10.1128/aem.01617-22
- Sargsyan A.S., Babayan B.G., Avetisyan N.S., Mkrtchyan A.G., Hovhannisyan A.M., Hovhannisyan N.A. (2018) Heterocyclic substituted non-protein amino acids as inhibitors of *Clostridium histolyticum* collagenase. *Armenian Biological J.*, **70**(1), 12–15.
- Karaman R., Jubeh B., Breijyeh Z. (2020) Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, **25**(12), 2888. DOI: 10.3390/molecules25122888.
- Hovhannisyan N., Harutyunyan Sh., Hovhannisyan A., Hambardzumyan A., Chitchyan M., Melkumyan M., Oganezova G., Avetisyan N. (2023) The novel inhibitors of serine proteases. *Amino Acids*, **37**(3), 531–536. DOI: 10.1007/s00726-009-0257-4.X11
- Trott O., 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**(2), 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334
- Sargsyan T., Stepanyan L., Israyelyan M., Hakobyan H., Jamgaryan S., Gasparyan A., Saghyan A. (2024) The synthesis and *in vitro* study of 9-fluorenylmethoxycarbonyl protected non-protein amino acids antimicrobial activity. *Eurasian Chem.-Technol. J.*, **25**(4), 235–240. DOI: 10.18321/ectj1546
- Jolene L.L., Dunn M.K. (2018) Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg. Med. Chem.*, **26**(10), 2700–2707. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052
- Bellotto O., Semeraro S., Bandiera A., Tramer F., Pavan N., Marchesan S. (2022) Polymer conjugates of antimicrobial peptides (AMPs) with d-amino acids (d-aa): State of the art and future opportunities. *Pharmaceutics*, **14**(2), 446–465. DOI: 10.3390/pharmaceutics14020446
- Wang G., Li X., Wang Z. (2016) APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.*, **44**(D1), D1087–D1093. DOI: 10.1093/nar/gkv1278
- Kerru N., Gummi L., Maddila S., Gangu K.K., Sreekantha B., Jonnalagadda A. (2020) A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. *Molecules*, **25**(8), 1909–1951. DOI: 10.3390/molecules25081909

12. Kumar A., Singh A.K., Singh H., Vijayan V., Kumar D., Naik J., Thareja S., Yadav J.P., Pathak P., Grishina M., Verma A., Khalilullah H., Jaremkov M., Emwas A.H., Kumar P. (2023) Nitrogen containing heterocycles as anticancer agents: A medicinal chemistry perspective. *Pharmaceuticals*, **16**(2), 299–367. DOI: 10.3390/ph16020299
13. Sargsyan A., Hakobyan H., Mardiyani Z., Jamharyan S., Dadayan A., Sargsyan T., Hovhannisyan N. (2023) Modeling, synthesis and *in vitro* screening of unusual amino acids and peptides as protease inhibitors. *J. Chem. Technol. Metall.*, **58**(3), 615–620. DOI: 10.59957/jctm.v58i3.93
14. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H. (2013) Structural basis for activity regulation and substrate preference of clostridial collagenases G, H, and T. *J. Biol. Chem.*, **288**(28), 20184–20194. DOI: 10.1074/jbc.M112.448548

Поступила в редакцию: 29. 09. 2024.  
После доработки: 06. 11. 2024.  
Принята к печати: 11. 11. 2024.

## MODELING, SYNTHESIS AND *IN VITRO* TESTING OF PEPTIDES BASED ON UNUSUAL AMINO ACIDS AS POTENTIAL ANTIBACTERIAL AGENTS

A.S. Sargsyan<sup>1\*</sup>, L.T. Karapetyan<sup>1</sup>, A.V. Mkhitarian<sup>1</sup>, L.A. Stepanyan<sup>1</sup>, T.H. Sargsyan<sup>1,2</sup>,  
Yu.M. Danghyan<sup>1</sup>, A.V. Sargsyan<sup>1</sup>, G.G. Oganezova<sup>1</sup>, N.A. Hovhannisyan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Scientific and Production Center “Armbiotechnology” NAS RA,  
14 Gyurjyan str., Yerevan, 0056 Armenia; \*e-mail: armenssargsyan@gmail.com  
<sup>2</sup>Yerevan State University, 1 Alex Manoogian, Yerevan, 0025 Armenia

Currently non-protein amino acids and synthetic peptides are widely used as blocks in drug design. Many proteases are of great interest for pharmacology due to their key role in various pathologies. Bacterial collagenase (EC 3.4.24.3) is quite an attractive target for drug development as the inhibitors of bacterial collagenolytic protease may stop propagation of diseases caused by infections. The interaction of peptides containing unusual amino acids with *Clostridium histolyticum* collagenase has been evaluated by molecular docking followed by the measurement of enzyme inhibition by selected compounds. According to the docking analysis, 4 compounds were selected and synthesized for further research. Measurement of enzyme activity revealed that all tested compounds inhibited collagenase activity with IC<sub>50</sub> values ranging within 1.45–2.08 μM. The antibacterial activity of synthesized compounds against some resistant strains was characterized by MICs values ranging within 4.6–9.2 μg/ml.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** unusual amino acid; docking; collagenase; inhibitor; antibacterial activity

**Funding.** This study was funded by the High Education and Science Committee of RA, in the frames of the research project No. 23T/AA-006 and the NAS RA within the framework of the “Young Scientists' Support Program” under the code 22YSSPD-015.

Received: 29.09.2024; revised: 06.11.2024; accepted: 11.11.2024.