

Влияние новых производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она с остатками аминокислот и дипептидов на активность главной (Mpro) и папаиноподобной (PLpro) протеаз SARS-CoV-2

Д.И. Поздняков, А.С. Чиряпкин, И.П. Кодониди

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, является высококонтагиозным заболеванием со значительным риском развития осложнений вплоть до летального исхода. Разработка анти-SARS-CoV-2 препаратов началась практически сразу после идентификации вируса, при этом обозначились две перспективные фармакологические мишени – основная и папаиноподобная протеазы.

Цель. Оценка влияния новых производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она с остатками аминокислот и дипептидов на активность протеаз SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы. Изучаемые вещества получали из коммерчески доступной 2-амино-4,5-диметоксибензойной кислоты, которую гетероциклизовали до 2-алкил-6,7-диметокси-3,1-бензоксазин-4-онов с последующим взаимодействием с аминокислотами и дипептидами. Изменение активности вирусных протеаз оценивали спектрофотометрически с использованием соответствующих субстратов. В ходе исследования рассчитывали коэффициент полуингибиции IC_{50} .

Результаты. В ходе исследования было установлено, что полученные соединения проявляют выраженную ингибирующую активность по отношению как к основной, так и папаиноподобной протеазе SARS-CoV-2 с диапазоном IC_{50} 0.012–0.100 и 0.013–0.100 мкМ/мл соответственно. Наиболее выраженное действие установлено для соединения **3h** с фрагментом дипептида глицил-триптофан с изопропильным радикалом, которое снижало активность основной протеазы (IC_{50} 0.012 ± 0.005 мкМ/мл) и папаиноподобной протеазы (IC_{50} 0.013 ± 0.009 мкМ/мл).

Заключение. Соединение **3h**, содержащее изопропильный радикал и дипептид глицил-триптофан, может стать перспективным объектом для дальнейшего изучения и разработки на его основе нового противовирусного средства.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, основная протеаза, папаиноподобная протеаза, хиназолины.

Образец цитирования: Поздняков Д.И., Чиряпкин А.С., Кодониди И.П. Влияние новых производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она с остатками аминокислот и дипептидов на активность главной (Mpro) и папаиноподобной (PLpro) протеаз SARS-CoV-2 // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(3):27-36. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-3-27-36

Поступила в редакцию 15.01.2023
Прошла рецензирование 23.01.2023
Принята к публикации 11.03.2023

Автор, ответственный за переписку
Поздняков Дмитрий Игоревич: Пятигорский медико-фармацевтического институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет». 357532, г. Пятигорск, просп. Калинина, 11.
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 15.01.2023
Revised 23.01.2023
Accepted 11.03.2023

Corresponding author
Dmitry I. Pozdnyakov: Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of Volgograd State Medical University, 11, prosp. Kalinina, Pyatigorsk, 357532, Russia.
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Effect of new derivatives of 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one with amino acid residues and dipeptide fragments on the activity of the main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) of SARS-CoV-2

D.I. Pozdnyakov, A.S. Chiriapkin, I.P. Kodonidi

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. A novel coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus is a highly contagious disease with a significant risk of complications up to mortality. The development of anti-SARS-CoV-2 drugs began almost immediately after the identification of the virus, while two promising pharmacological targets were identified: the main and papain-like proteases.

Aim. Evaluation of the effect of new derivatives of 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one with amino acid residues and dipeptide fragments on the activity of SARS-CoV-2 proteases *in vitro*.

Materials and methods. The studied substances were obtained from commercially available 2-amino-4,5-dimethoxybenzoic acid which were cyclized into 2-alkyl-6,7-dimethoxy-3,1-benzoxazine-4-ones, followed by reaction with amino acids and dipeptides. The changes in the activity of viral proteases were evaluated with spectrophotometry using the appropriate substrates. During the study, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated.

Results. As a result, it was found that the obtained compounds exhibit pronounced inhibitory activity with respect to both the main and papain-like protease of SARS-CoV-2 with an IC_{50} range of 0.012–0.100 and 0.013–0.100 $\mu\text{M}/\text{ml}$, respectively. The most pronounced effect was shown for the **3h** compound with a fragment of the glycyl-tryptophan dipeptide with the isopropyl radical, which reduced the activity of the main protease (IC_{50} 0.012 $\pm$ 0.005 $\mu\text{M}/\text{ml}$) and the papain-like protease (IC_{50} 0.013 $\pm$ 0.009 $\mu\text{M}/\text{ml}$).

Conclusion. Compound **3h** containing the isopropyl radical and the glycyl-tryptophan dipeptide may become a promising object for further study and development of a new antiviral agent based on it.

Keywords: coronavirus infection, SARS-CoV-2, main protease, papain-like protease, quinazolinones.

Citation example: Pozdnyakov D.I., Chiriapkin A.S., Kodonidi I.P. Effect of new derivatives of 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one with amino acid residues and dipeptide fragments on the activity of the main protease (Mpro) and papain-like protease (PLpro) of SARS-CoV-2. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(3):27-36. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-3-27-36

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, привела к пандемии и оказала существенное влияние на системы здравоохранения различных государств. Патологический процесс, вызываемый SARS-CoV-2, в значительной степени вариабелен и может протекать в различных вариантах клинических проявлений: от бессимптомного течения до тяжелой формы заболевания, которая сопровождается рядом осложнений, такими как пневмония, «цитокиновый шторм», острый респираторный дистресс-синдром, острое повреждение легких [1]. Во многом непредсказуемый характер течения инфекционного процесса, а также высокий риск осложнений и летальности способствовал практически мгновенному старту научно-прикладных исследований, направленных на поиск новых анти-

INTRODUCTION

A novel coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus has led to a pandemic and has had a significant impact on the healthcare systems of various states. The pathological process caused by SARS-CoV-2 is variable and can proceed in a wide range of clinical manifestations: from asymptomatic to severe, which is accompanied by several complications, such as pneumonia, the cytokine storm, acute respiratory distress syndrome, acute lung injury [1]. The largely unpredictable nature of the infectious process, as well as the high risk of complications and mortality, contributed to the almost immediate start of scientific research aimed at finding new anti-SARS-CoV-2 drugs [2]. At the same time, two viral proteases were selected as pharmacological targets for new antiviral agents against SARS-CoV-2: the main protease (Mpro) and the papain-like protease

SARS-CoV-2 лекарственных препаратов [2]. При этом в качестве фармакологических мишеней для действия новых противовирусных средств против SARS-CoV-2 были выбраны две вирусных протеазы: главная протеаза (Mpro) и папаиноподобная протеаза (PLpro). Главная протеаза SARS-CoV-2 известна также как 3C-подобная протеаза (3CLpro). Mpro отвечает за индуцированный вирусом апоптотический сигнал, а PLpro – за удаление убиквитина и ISG15 из белков клетки-хозяина, что помогает коронавирусам уклоняться от врожденных иммунных реакций хозяина. Таким образом, ингибирующее воздействие на данные протеазы SARS-CoV-2 может снизить активность вирусной репликации и привести к нарушению регуляторных каскадных сигналов в инфицированных клетках [3].

Новыми анти-SARS-CoV-2 соединениями могут являться производные пириимидина. Известно, что производные пириимидина проявляют широкий спектр биологической активности. В частности, для некоторых представителей данного класса химических соединений было установлено выраженное противовирусное действие (зидовудин, ламивудин, трифлуридин, ацикловир), что нашло свое применение в медицинской практике лечения и профилактики вирусных заболеваний [4]. Среди производных пириимидина можно выделить группу органических соединений, в структуре которых пириимидиновый гетероцикл бензанилирован – производные хиназолинона [5]. Имеются обширные данные, указывающие, что производные хиназолинона обладают выраженными противовирусными свойствами, в частности против SARS-CoV-2. Так, производные хиназолинона способны ингибировать синтез РНК, обусловленный РНК-зависимой РНК-полимеразой SARS-CoV-2. Также была отмечена низкая токсичность данных соединений [6]. Имеются данные, указывающие, что некоторые производные хиназолин-2,4-диона проявляют высокое сродство к Mpro вируса SARS-CoV-2 [7]. Кроме того, J.Y. Lee et al. (2021) показано, что производные 2-аминохиназолин-4(3H)-она снижали уровень инфицирования клеток линии Vero вирусами SARS-CoV-2 и MERS-CoV [8]. Также ингибировать репродукцию вируса SARS-CoV-2 способны производные 2-бензиламинохиназолина-4(3H)-она, причем эффективность данных соединений была выше аналогичной у ремдесивира, фармакокинетический профиль которого отличался высокой стабильностью. Так, для дериватов 2-бензиламинохиназолина-4(3H)-она не уста-

(PLpro). The main protease of SARS-CoV-2 is also known as 3C-like protease (3CLpro). Mpro is responsible for the virus-induced apoptotic signal, and PLpro is responsible for removing ubiquitin and ISG15 from host cell proteins, which helps coronaviruses evade host innate immune responses. Thus, the inhibitory effect on these proteases of SARS-CoV-2 can reduce the activity of viral replication and lead to impairment of regulatory signal transduction in infected cells [3].

New anti-SARS-CoV-2 compounds may be pyrimidine derivatives. Pyrimidine derivatives are known to exhibit a wide range of biological activity. In particular, for some representatives of this family of chemical compounds, a pronounced antiviral effect was established (zidovudine, lamivudine, trifluridine, acyclovir) which is used in medical practice for the treatment and prevention of viral diseases [4]. Among the pyrimidine derivatives, a group of organic compounds can be distinguished in the structure of which the pyrimidine heterocycle is benzanylated – these are quinazolinone derivatives [5]. There is an extensive evidence indicating that quinazolinone derivatives have pronounced antiviral properties, in particular against SARS-CoV-2. Thus, quinazolinone derivatives are able to inhibit RNA synthesis caused by the RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2. The low toxicity of these compounds was also noted [6]. There is evidence indicating that some derivatives of quinazoline-2,4-dione exhibit high affinity for Mpro of the SARS-CoV-2 virus [7]. In addition, Lee et al. (2021) showed that derivatives of 2-aminoquinazoline-4(3H)-one reduced the level of infection of Vero cells by SARS-CoV-2 and MERS-CoV viruses [8]. Also, derivatives of 2-benzylaminoquinazoline-4(3H)-one are able to inhibit the propagation of the SARS-CoV-2 virus, and the effectiveness of these compounds was higher than that of remdesivir, whose pharmacokinetic profile was highly stable. Thus, for 2-benzylaminoquinazoline-4(3H)-one derivatives, the interaction (induction-inhibition) with isoenzymes of the cytochrome P450 system has not been established [9]. In this regard, the development of new compounds with the quinazolinone ring is a promising direction for the search for highly effective antiviral agents, in particular, for the treatment of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2.

AIM OF THE RESEARCH

Evaluation of the potential inhibitory properties of new 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one derivatives in relation to the main and papain-like proteases of SARS-CoV-2.

новлено взаимодействие с изоферментами системы цитохрома P450 на уровне индукции-ингибиции [9]. В связи с этим разработка новых соединений с ядром хиназолинона является перспективным направлением для поиска высокоэффективных противовирусных средств, в частности для лечения коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка потенциальных ингибирующих свойств новых производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она в отношении основной и папаиноподобной протеаз SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – новые производные 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она с остатками аминокислот и дипептидов. Их получение осуществлялось из коммерчески доступной 2-амино-4,5-диметоксибензойной кислоты (98%, CAS номер: 5653-40-7, Acros Organics, Бельгия), которую на первом этапе синтеза гетероциклизовали до 2-алкил-6,7-диметокси-3,1-бензоксазин-4-онов (2a–2c) путем кипячения исходного соединения в избытке соответствующего ангидрида. Соединения 3a–3j получали путем взаимодействия синтезированных бензоксазинов (2a–2c) с глицином, глицил-глицином, глицил-лейцином и глицил-триптофаном в среде ЛУК (ледяная уксусная кислота) при добавлении 0.5 мл диметилформамида (ДМФА) (рис. 1).

Получение 2-фенил-6,7-диметокси-3,1-бензоксазин-4-она (2d) и 2-метил-6,7-диметокси-3,1-бензоксазин-4-она (2e) осуществлялось через стадию синтеза амидов (4a–4b) путем взаимодействия 2-амино-4,5-диметоксибензойной кислоты с хлорангидридами. Далее синтез целевых соединений проводился аналогичным образом, как в случае соединений 3a–3j (рис. 2). Более подробно результаты синтеза описаны в [10].

Оценка ингибирующей активности полученных соединений в отношении главной протеазы SARS-CoV-2

20 мг исследуемого соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до получения маточного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Далее приготавливали серию двукратных разведений (растворитель – ДМСО) с конечным содержанием исследуемого соединения 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 и 7.8125 мкг/мл. В микропланшет вносили 20 мкМ Mpro SARS-CoV-2 (Sigma-Aldrich, Германия) в объеме 100 мкл, добавляли

MATERIALS AND METHODS

The objects of study are new 6,7-dimethoxyquinazoline-4(3H)-one derivatives with amino acid residues and dipeptide fragments. They were obtained from commercially available 2-amino-4,5-dimethoxybenzoic acid (98%, CAS Registry Number 5653-40-7, Acros Organics, Belgium), which was cyclized into 2-alkyl-6,7-dimethoxy-3,1-benzoxazine-4-ones (2a–2c) by boiling the parent compound at the first stage of synthesis in excess of the appropriate anhydride. Compounds 3a–3j were obtained by reaction of synthesized benzoxazinones (2a–2c) with glycine, glycyl-glycine, glycyl-leucine and glycyl-tryptophan in GAA (glacial acetic acid) with the addition of 0.5 ml dimethylformamide (DMF) (Fig. 1).

The preparation of 2-phenyl-6,7-dimethoxy-3,1-benzoxazine-4-one (2d) and 2-methyl-6,7-dimethoxy-3,1-benzoxazine-4-one (2e) was carried out via the synthesis of amides (4a–4b) by reaction of 2-amino-4,5-dimethoxybenzoic acid with acid chloride. Further, the synthesis of target compounds was carried out in the same way as in the case of compounds 3a–3j (Fig. 2). The synthesis results are described in more detail in [10].

Evaluation of the inhibitory effect of the obtained compounds on the main protease of SARS-CoV-2

The tested compound (20 mg) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution with a concentration of 1 mg/ml. Next, a two-fold dilution series (solvent – DMSO) was prepared with the final concentration of the compound of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 and 7.8125 µg/ml. To a microplate, 20 µM of SARS-CoV-2 Mpro (Sigma-Aldrich, Germany) in a volume of 100 µl were added; 100 µl of a twofold-diluted solution of the tested compound was added. The resulting mixture was incubated for 10 minutes at a temperature of 37°C, after which a chromogenic peptide substrate Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-pNA (Sigma-Aldrich) was introduced into the analyzed medium at a final concentration of 40 µM and re-incubated for 20 minutes at a similar temperature regimen. Simultaneously, a control sample was placed with a solution of DMSO + SARS-CoV-2 Mpro + substrate and a blank with water for injection. The optical density of the obtained mixtures was recorded at 405 nm using an Infinite F50 microplate reader (Tecan, Austria). The degree of inhibition of enzymatic activity was calculated by the difference in the optical density of the test/control and blank sam-

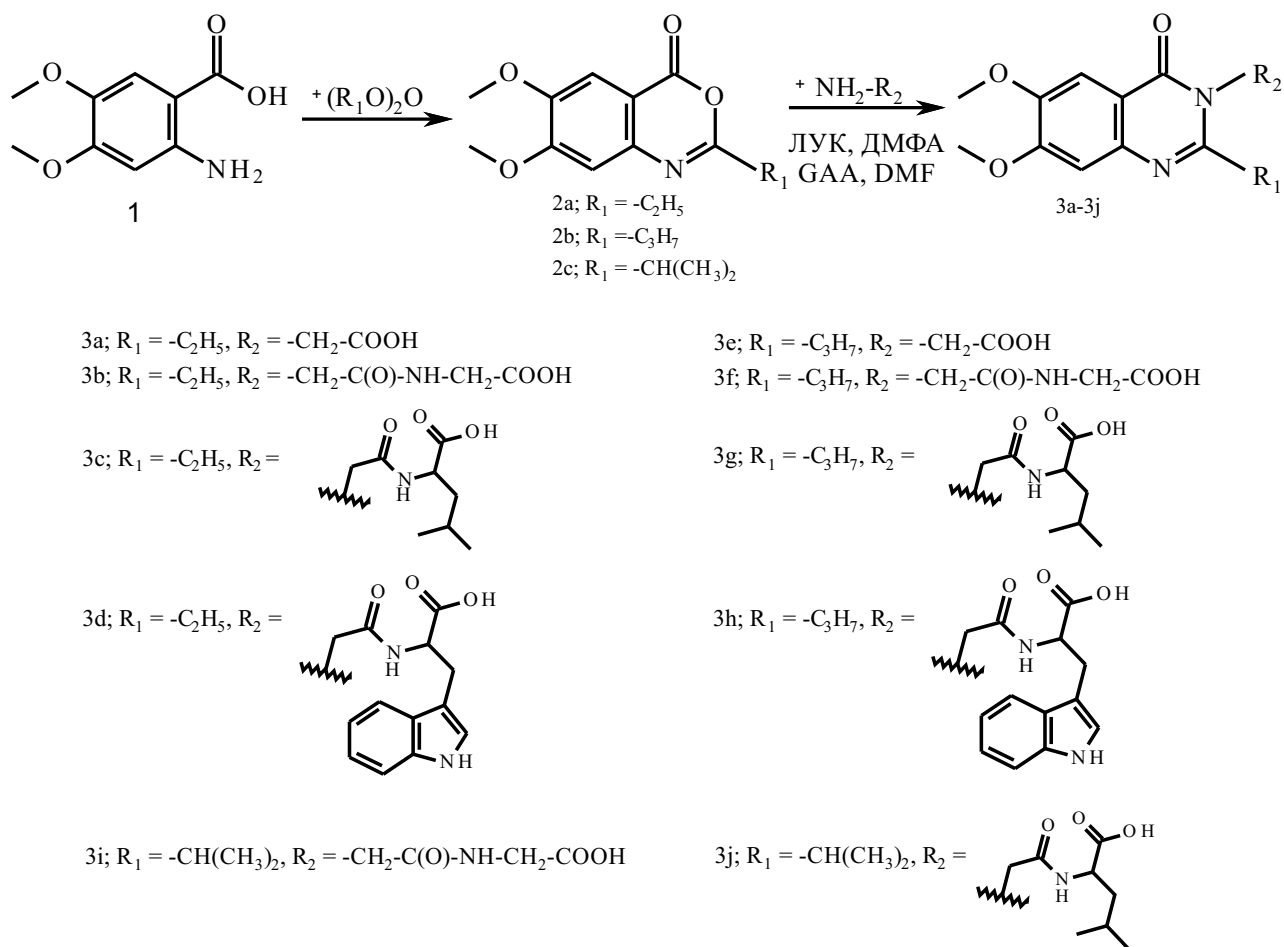


Рис. 1. Схема синтеза соединений 3а–3j (ЛУК – ледяная уксусная кислота; ДМФА – диметилформамид)
Fig. 1. Synthesis of compounds 3a–3j (GAA – glacial acetic acid; DMF – dimethylformamide)

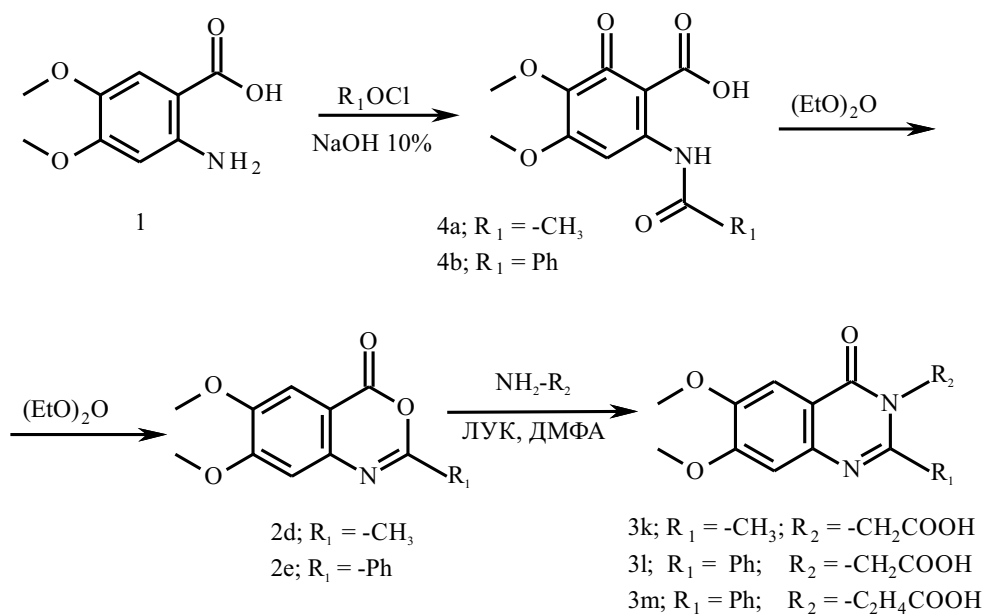


Рис. 2. Схема синтеза соединений 3к–3м (ЛУК – ледяная уксусная кислота; ДМФА – диметилформамид)
Fig. 2. Synthesis of 3k–3m compounds (GAA – glacial acetic acid; DMF – dimethylformamide)

100 мкл раствора двукратных разведений исследуемого соединения. Полученную смесь инкубировали 10 мин при температуре 37 °С, после чего в анализируемую среду вносили хромогенный пептидный субстрат Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-pNA (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 40 мкМ и повторно инкубировали 20 мин в аналогичном температурном режиме. Параллельно ставили контрольную пробу с раствором ДМСО + Mpro SARS-CoV-2 + субстрат и холостую пробу с водой для инъекций. Оптическую плотность полученных смесей регистрировали при 405 нм с использованием системы микропланшетного ридера Infinite F50 (Tecan, Австрия). Степень ингибирования ферментативной активности рассчитывали по разнице оптической плотности опытной/контрольной и холостой проб в процентах. На основании полученных результатов строили кривую зависимости «ингибирующая активность – logC» и рассчитывали коэффициент полуингибиции (IC_{50}) в мкМ/мл методом пробит-анализа. Все тесты выполнены в триплетном варианте с расчетом $M \pm SEM$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего) [11].

Оценка ингибирующей активности полученных соединений в отношении папаиноподобной протеазы SARS-CoV-2

20 мг исследуемого соединения растворяли в ДМСО до получения маточного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Далее готовили серию двукратных разведений (растворитель – ДМСО) с конечным содержанием исследуемого соединения 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 и 7.8125 мкг/мл. В микропланшет вносили 20 мкМ PLpro SARS-CoV-2 (Sigma-Aldrich, Германия) в объеме 10 мкл, добавляли 10 мкл раствора двукратных разведений исследуемого соединения. Полученную смесь инкубировали 10 мин при температуре 37 °С, после чего в анализируемую среду вносили хромогенный субстрат PLpro ubiquitinated substrate (BPS Bioscience, Inc., США) в конечной концентрации 20 мкМ и доводили до 200 мкл буферным раствором 20 мМ HEPES pH 6.0 + 0.4 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) + 1 мМ дитиотреитол + 1% глицерин. Полученную смесь повторно инкубировали 60 мин в аналогичном температурном режиме. Параллельно ставили контрольную пробу с раствором ДМСО + PLpro SARS-CoV-2 + субстрат и холостую пробу с водой для инъекций. Оптическую плотность полученных смесей регистрировали при 450 нм с использованием системы микропланшетного ридера Infinite F50. Степень

inhibition was calculated as a percentage. Based on the results obtained, the inhibitory activity–logC curve was plotted and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}), $\mu M/ml$ was calculated using probit assay. All tests were performed as a triplet series with the calculation of $M \pm SEM$ (mean $\pm$ standard error of the mean) [11].

Evaluation of the inhibitory effect of the obtained compounds on the papain-like protease of SARS-CoV-2

The tested compound (20 mg) was dissolved in DMSO to obtain a stock solution with a concentration of 1 mg/ml. Next, a twofold-dilution series (with DMSO as a solvent) was prepared with the final concentration of the test compound of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 and 7.8125 $\mu g/ml$. To the microplate, 20 μM of SARS-CoV-2 PLpro (Sigma-Aldrich, Germany) in a volume of 10 μl were added; then, 10 μl of a solution of twofold dilution of the test compound was added. The resulting mixture was incubated for 10 minutes at a temperature of 37°C. After that, a chromogenic ubiquitinated PLpro substrate (BPS Bioscience, Inc., USA) was introduced into the analyzed medium at a final concentration of 20 μM and was made up to 200 μl with a buffer solution of 20 mM HEPES pH 6.0 + 0.4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) + 1 mM dithiotreitol + 1% glycerin. The resulting mixture was re-incubated for 60 minutes in a similar temperature regimen. Simultaneously, a control sample with a solution of DMSO + SARS-CoV-2 PLpro + substrate and a blank with water for injection were placed. The optical density of the obtained mixtures was recorded at 450 nm using an Infinite F50 microplate reader. The degree of inhibition of enzymatic activity was calculated by the difference in the optical density of the experimental/control and blank samples as a percentage. Based on the results obtained, the dependence inhibitory activity–logC curve was plotted and IC_{50} in $\mu M/ml$ was calculated using probit assay. All tests were performed as a triplicate series with the calculation of $M \pm SEM$ [1].

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the evaluation of the inhibitory activity of the synthesized compounds in relation to the main and papain-like proteases of SARS-CoV-2 are presented in Table 1. The basic structure of the analyzed compounds is shown in Fig. 3.

As Table 1 shows, the obtained compounds exhibit greater inhibitory effect on the papain-like protease. In addition, compounds **3e**, **3g** and **3h**

ингибирования ферментативной активности рассчитывали по разнице оптической плотности опытной/контрольной и холостой проб в процентах. На основании полученных результатов строили кривую зависимости «ингибирующая активность – $\log C$ » и рассчитывали коэффициент полуингибиции (IC_{50}) в мкМ/мл методом пробит-анализа. Все тесты выполнены в триплетном варианте с расчетом $M \pm SEM$ [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки ингибирующей активности синтезированных соединений в отношении основной и папаиноподобной протеазы SARS-CoV-2 представлены в табл. 1. Базовая структура анализируемых соединений представлена на рис. 3.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, полученные соединения проявляли большую ингибирующую активность в отношении папаиноподобной протеазы. При этом соединения **3e**, **3g** и **3h** в ряду изучаемых оказывали максимально выраженный эффект. В то же время соединение **3h** значительно ингибировало активность Mpro, остальные соединения проявляли меньшую активность. Оценка влияния растворителя (ДМСО) на активность протеаз SARS-CoV-2 показало отсутствие значимого действия ДМСО на активность как Mpro, так и PLpro, что исключает воздействие растворителя на фармакологические свойства изучаемых веществ. Как

in a number of studied ones had the most pronounced effect. At the same time, the compound **3h** significantly inhibited the activity of Mpro, the rest compounds were less active. Evaluation of the effect of the solvent (DMSO) on the activity of SARS-CoV-2 proteases showed the absence of a significant influence of DMSO on the activity of both Mpro and PLpro, which excludes the effect of the solvent on the pharmacological properties of the substances studied. It is known that the development of new candidate molecules for inhibitors of viral SARS-CoV-2 proteases started almost immediately after the discovery of the virus structure. The first crystal structure of SARS-CoV-2 Mpro was determined in early 2020 in combination with inhibitor N3. In many ways, it was the structure of N3 that provided the search direction for new Mpro inhibitors [6]. Currently, ebselen, tideglusib, shikonin, PX-12 and TDZD-8 are at the stage of preclinical and clinical trials. Of these, ebselen was the strongest Mpro inhibitor with $IC_{50} = 0.67 \mu M$. Later, more active compounds were synthesized, for example, ligand **11r** ($IC_{50} = 0.18 \mu M$) [12]. Interestingly that the papain-like protease of SARS-CoV-2 is not as well studied as Mpro, which may be due to the nonspecific nature of the action of this enzyme [13].

It is worth noting that the synthesis of the leader compound **3h** is a relatively simple process in which commercially available reagents and low-toxic solvents are used, which allows further to

Таблица 1. Ингибирующая активность соединений 3a–3m в отношении Mpro и PLpro SARS-CoV-2

Table 1. Inhibitory effect of compounds 3a–3m on Mpro and PLpro of SARS-CoV-2

Соединение Compound	R_1	R_2	IC_{50} , мкМ/мл ($\mu M/ml$)	
			Mpro	PLpro
3a	Et	Гли / Gly	0.090 ± 0.008	0.080 ± 0.002
3b	Et	Гли-Гли / Gly-Gly	0.090 ± 0.008	0.070 ± 0.004
3c	Et	Гли-Лей / Gly-Ley	0.100 ± 0.007	0.070 ± 0.004
3d	Et	Гли-Три / Gly-Try	0.080 ± 0.009	0.050 ± 0.006
3e	n-P	Гли / Gly	0.062 ± 0.002	0.016 ± 0.001
3f	n-P	Гли-Гли / Gly-Gly	0.081 ± 0.005	0.025 ± 0.007
3g	n-P	Гли-Лей / Gly-Ley	0.032 ± 0.009	0.018 ± 0.001
3h	n-P	Гли-Три / Gly-Try	0.012 ± 0.005	0.013 ± 0.009
3i	i-P	Гли-Гли / Gly-Gly	0.098 ± 0.008	0.041 ± 0.001
3j	i-P	Гли-Лей / Gly-Ley	0.062 ± 0.004	0.074 ± 0.004
3k	Me	Гли / Gly	0.046 ± 0.001	0.023 ± 0.002
3l	Ph	Гли / Gly	0.090 ± 0.004	0.070 ± 0.007
3m	Ph	β -Ала / β -Ala	0.100 ± 0.007	0.100 ± 0.003
ДМСО / DMSO	–	–	1.79×10^3	1.95×10^3

Примечание. ДМСО – диметилсульфоксид.

Note. DMSO – dimethylsulfoxide.

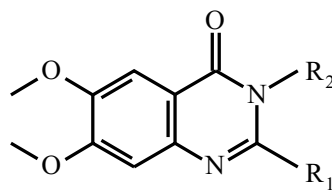


Рис. 3. Базовая структура анализируемых соединений
Fig. 3. Basic structure of the analyzed compounds

известно, разработка новых молекул-кандидатов ингибиторов вирусных протеаз SARS-CoV-2 стартовала практически сразу после определения строения вируса. Первая кристаллическая структура Mpro SARS-CoV-2 была определена в начале 2020 г. в комплексе с ингибитором N3. Во многом именно структура N3 определила вектор поиска новых ингибиторов Mpro [6]. В настоящее время на стадии доклинических и клинических испытаний находятся эбселен, тидеглусиб, шиконин, PX-12 и TDZD-8. Из них эбселен был самым сильным ингибитором Mpro с $IC_{50} = 0.67$ мкМ. В дальнейшем были синтезированы более активные соединения, например, лиганд **11r** ($IC_{50} = 0.18$ мкМ) [12]. Стоит отметить, что папаиноподобная протеаза SARS-CoV-2 является объектом не столь пристального изучения, как Mpro, что может быть связано с неспецифическим характером действия данного фермента [13].

Стоит отметить, что синтез соединения-лидера **3h** представляет собой в плане несложный процесс, в ходе которого используются коммерчески доступные реактивы и малотоксичные растворители, что позволяет в дальнейшем масштабировать методику получения перспективного вещества. При этом в структуре **3h** присутствует остаток глицил-триптофана, что может обуславливать у соединения церебропротекторные свойства [14]. Наличие церебропротекторной активности у соединения **3h** является важным дополнительным фармакологическим эффектом, способствующим защите центральной нервной системы (ЦНС) при возросшей вирусной нагрузке на организм, что особенно важно в контексте коррекции SARS-CoV-2-ассоциированного поражения ЦНС [15]. Тем самым соединение **3h**, содержащее изопропильный радикал и дипептид глицил-триптофан, можно рассматривать в качестве перспективного кандидата для разработки нового высокоэффективного противовирусного средства.

Таким образом, изучаемые производные 6,7-диметоксихиназолин-4(3H)-она являются перспективными молекулами-кандидатами для

scale up the method for obtaining a promising substance. At the same time, a glycyL-tryptophan residue is present in the **3h** structure, which may cause cerebroprotective effect of the compound [14]. The presence of cerebroprotective activity of the compound **3h** is an important additional pharmacological effect that contributes to the protection of the central nervous system (CNS) in the setting of increased viral load, which is especially important in the context of correction of SARS-CoV-2-associated CNS damage [15]. Thus, the compound **3h** containing the isopropyl radical and the glycyL-tryptophan dipeptide can be considered as a promising candidate for the development of a new highly effective antiviral drug.

Thus, the studied derivatives of 6,7-dimethoxyquinazolin-4(3H)-one are promising candidate molecules for the further development of anti-SARS-CoV-2 drugs, since the inhibitory activity of these compounds against viral proteases exceeds current analogues, the activity of which is described in the literature.

CONCLUSION

Several new derivatives of 6,7-dimethoxyquinazolin-4(3H)-one containing amino acid residues and peptide fragments have been synthesized. They have shown strong inhibitory effect on the main and papain-like proteases of SARS-CoV-2. Thus, these compounds can be considered as candidates for the development of anti-COVID-19 drugs, while the most promising of a number of substances being evaluated is **3h** compound, with the isopropyl substituent and the glycyL-tryptophan dipeptide in its structure.

Financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of scientific project No. 20-315-90060 (synthesis of the analyzed compounds).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

дальнейшей разработки анти-SARS-CoV-2 препаратов, поскольку ингибирующая активность данных соединений в отношении вирусных протеаз превосходит существующие аналоги, активность которых описана в соответствующих литературных источниках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован ряд новых производных 6,7-диметоксихиназолин-4(3*H*)-она, содержащих остатки аминокислот и пептидов, которые показали высокую ингибирующую активность по отношению к главной и папаиноподобной протеазам SARS-CoV-2. Таким образом, данные соединения можно рассматривать в качестве канди-

датов для разработки лекарственных средств против новой коронавирусной инфекции, при этом наиболее перспективным из ряда оцениваемых веществ является соединение **3h**, имеющее в структуре изопропильный заместитель и дипептид глицил-триптофан.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-315-90060 (синтез анализируемых соединений).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pitsillou E., Liang J., Ververis K. et al. Identification of small molecule inhibitors of the deubiquitinating activity of the SARS-CoV-2 papain-like protease: *in silico* molecular docking studies and *in vitro* enzymatic activity assay // *Front. Chem.* 2020;8:623971. DOI: 10.3389/fchem.2020.623971.
2. Abdelmonsef A., Amal I., Mosallam A. et al. Synthesis and *in silico* docking study of some new quinazolin-2,4-diones targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease: a search for anti-COVID19 drug candidates // *Egypt. J. Chem.* 2022. DOI: 10.21608/ejchem.2022.117407.5296.
3. Jin Z., Du X., Xu Y. et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors // *Nature*. 2020;582(7811):289-293. DOI: 10.1038/s41586-020-2223-y.
4. Rothan H.A., Byrareddy S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak // *J. Autoimmun.* 2020;109:102433. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102433.
5. Чиряпкин А.С. Обзор производных пиримидина как фармакологически активных соединений // *Juvenis scientia.* 2022;8(5):16-30. DOI: 10.32415/jscientia_2022_8_5_16-30.
6. Bhowmick S., AlFaris N.A., ALTamimi J.Z. et al. Identification of bio-active food compounds as potential SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors-modulators via negative image-based screening and computational simulations // *Comput. Biol. Med.* 2022;145:105474. DOI: 10.1016/j.compbimed.2022.105474.
7. Drożdżal S., Rosik J., Lechowicz K. et al. An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment // *Drug Resist. Updat.* 2021;59:100794. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100794.
8. Lee J.Y., Shin Y.S., Jeon S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-aminoquinazolin-4(3*H*)-one derivatives as potential SARS-CoV-2 and MERS-CoV treatments // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021;39:127885. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127885.
9. Lee J.Y., Shin Y.S., Jeon S. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-benzylaminoquinazolin-4(3*H*)-one derivatives as a potential treatment for SARS-CoV-2 //

REFERENCES

1. Pitsillou E., Liang J., Ververis K. et al. Identification of small molecule inhibitors of the deubiquitinating activity of the SARS-CoV-2 papain-like protease: *in silico* molecular docking studies and *in vitro* enzymatic activity assay. *Front. Chem.* 2020;8:623971. DOI: 10.3389/fchem.2020.623971.
2. Abdelmonsef A., Amal I., Mosallam A. et al. Synthesis and *in silico* docking study of some new quinazolin-2,4-diones targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease: a search for anti-COVID19 drug candidates. *Egypt. J. Chem.* 2022. DOI: 10.21608/ejchem.2022.117407.5296.
3. Jin Z., Du X., Xu Y. et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*. 2020;582(7811):289-293. DOI: 10.1038/s41586-020-2223-y.
4. Rothan H.A., Byrareddy S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.* 2020;109:102433. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102433.
5. Chiriapkin A.S. Review of pyrimidine derivatives as pharmacologically active compounds. *Juvenis scientia.* 2022;8(5):16-30. DOI: 10.32415/jscientia_2022_8_5_16-30. (In Russ.)
6. Bhowmick S., AlFaris N.A., ALTamimi J.Z. et al. Identification of bio-active food compounds as potential SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors-modulators via negative image-based screening and computational simulations. *Comput. Biol. Med.* 2022;145:105474. DOI: 10.1016/j.compbimed.2022.105474.
7. Drożdżal S., Rosik J., Lechowicz K. et al. An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. *Drug Resist. Updat.* 2021;59:100794. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100794.
8. Lee J.Y., Shin Y.S., Jeon S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-aminoquinazolin-4(3*H*)-one derivatives as potential SARS-CoV-2 and MERS-CoV treatments. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021;39:127885. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127885.
9. Lee J.Y., Shin Y.S., Jeon S. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-benzylaminoquinazolin-4(3*H*)-one derivatives as a potential treatment for SARS-CoV-2.

- Bull. Korean Chem. Soc. 2022;43(3):412-416. DOI: 10.1002/bkcs.12470.
10. Chiriapkin A.S., Kodonidi I.P., Pozdnyakov D.I., Glushko A.A. Synthesis, *in vitro* and docking studies of 2-substituted 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-4(3h)-one derivatives as agents for the treatment of Alzheimer's disease // *Chimica Techno Acta*. 2022;9(2):20229204. DOI: 10.15826/chim-tech.2022.9.2.04.
 11. Banerjee R., Perera L., Viranda Tillekeratne L.M. Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors // *Drug Discov. Today*. 2021;26(3):804-816. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.12.005.
 12. Singh N., Villoutreix B.O. Resources and computational strategies to advance small molecule SARS-CoV-2 discovery: Lessons from the pandemic and preparing for future health crises // *Comput. Struct. Biotechnol. J*. 2021;19:2537-2548. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.04.059.
 13. Rothan H.A., Teow T.C. Cell-based high-throughput screening protocol for discovering antiviral inhibitors against SARS-CoV-2 main protease (3CLpro) // *Mol. Biotechnol.* 2021;63(3):240-248. DOI: 10.1007/s12033-021-00299-7.
 14. Громова О.А., Пронин А.В., Торшин И.Ю. и др. Нейротрофический и антиоксидантный потенциал нейропептидов и микроэлементов // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2015;7(4):92-100. DOI: 10.14412/2074-2711-2015-4-92-100.
 15. Nagu P., Parashar A., Behl T., Mehta V. CNS implications of COVID-19: a comprehensive review // *Rev. Neurosci.* 2020;32(2):219-234. DOI: 10.1515/rev-neuro-2020-0070.
- Bull. Korean Chem. Soc. 2022;43(3):412-416. DOI: 10.1002/bkcs.12470.
10. Chiriapkin A.S., Kodonidi I.P., Pozdnyakov D.I., Glushko A.A. Synthesis, *in vitro* and docking studies of 2-substituted 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine-4(3h)-one derivatives as agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Chimica Techno Acta*. 2022;9(2):20229204. DOI: 10.15826/chim-tech.2022.9.2.04.
 11. Banerjee R., Perera L., Viranda Tillekeratne L.M. Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Drug Discov. Today*. 2021;26(3):804-816. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.12.005.
 12. Singh N., Villoutreix B.O. Resources and computational strategies to advance small molecule SARS-CoV-2 discovery: Lessons from the pandemic and preparing for future health crises. *Comput. Struct. Biotechnol. J*. 2021;19:2537-2548. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.04.059.
 13. Rothan H.A., Teow T.C. Cell-based high-throughput screening protocol for discovering antiviral inhibitors against SARS-CoV-2 main protease (3CLpro). *Mol. Biotechnol.* 2021;63(3):240-248. DOI: 10.1007/s12033-021-00299-7.
 14. Gromova O.A., Pronin A.V., Torshin I.Yu. et al. Neurotrophic and antioxidant potential of neuropeptides and trace elements. *Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2015;7(4):92-100. DOI: 10.14412/2074-2711-2015-4-92-100. (In Russ.)
 15. Nagu P., Parashar A., Behl T., Mehta V. CNS implications of COVID-19: a comprehensive review. *Rev. Neurosci.* 2020;32(2):219-234. DOI: 10.1515/rev-neuro-2020-0070.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Поздняков Дмитрий Игоревич – канд. фармацевт. наук, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия. ORCID: 0000-0002-5595-8182.

Чиряпкин Алексей Сергеевич – преподаватель кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия. ORCID: 0000-0001-8207-2953.

Кодониди Иван Панайотович – д-р фармацевт. наук, профессор кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия. ORCID: 0000-0003-1333-3472.

ABOUT THE AUTHORS

Dmitry I. Pozdnyakov – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Head, Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5595-8182.

Alexey S. Chiriapkin – Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia. ORCID: 0000-0001-8207-2953.

Ivan P. Kodonidi – Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Department of Organic Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1333-3472.