

# ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУРНЫЙ ФРАГМЕНТ БЕНЗОПИРАН-2-ОНА

## Д.С. Золотых

к.фарм.н., доцент кафедры аналитической химии,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: metranidazol@mail.ru

## Ж.В. Дайронас

д.фарм.н., профессор, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: daironas@mail.ru

## Д.И. Поздняков

к.фарм.н., доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, зав. лабораторией живых систем,  
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ (г. Пятигорск, Россия)  
E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Производные бензопиран-2-она характеризуются обширным спектром фармакологической активности, среди которой особенно выделяются противовирусные свойства. Противовирусной активностью обладают не только природные дериваты бензопиран-2-она, но и их полусинтетические аналоги. Особенно актуальным представляется оценка эффективности производных бензопиран-2-она в отношении вируса SARS-CoV-2. Ряд работ указывает на то, что бензопиран-2-оны способны подавлять основные факторы вирулентности SARS-CoV-2: рецептор-связывающий домен S-белка, основная и папаино-подобная протеазы. Как SARS-CoV-2 ингибирующие агенты наибольший интерес представляют хебулаговая кислота и пуникалагин, которые сочетают в себе поливалентный механизм противовирусного действия, высокую эффективность и низкую токсичность.

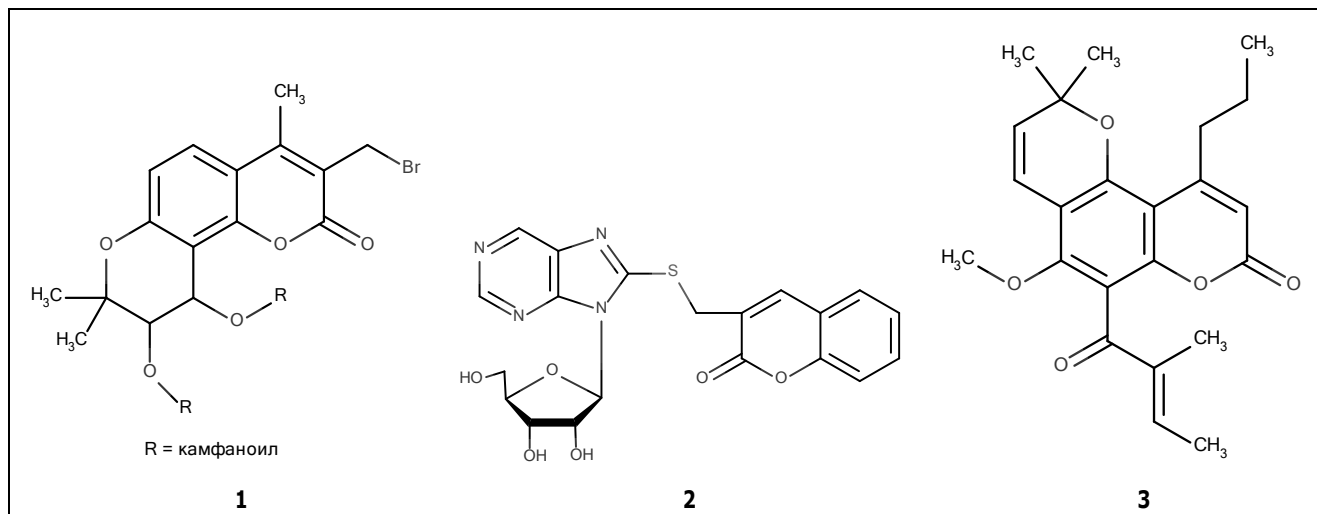
**Ключевые слова:** противовирусные свойства, производные бензопиран-2-она, SARS-CoV-2.

**Для цитирования:** Золотых Д.С., Дайронас Ж.В., Поздняков Д.И. Противовирусная активность соединений, содержащих структурный фрагмент бензопиран-2-она. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(6):22–27. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-06-03>

Структурный фрагмент бензопиран-2-она входит в состав ряда синтетических производных с разными видами биологической активности [1, 2], некоторых полифенольных соединений и является основой такого класса вторичных метаболитов растений, как кумарины. Следует отметить, что произ-

водные бензопиран-2-она обладают выраженной противовирусной активностью [3–6].

Например, производные (3'R,4'R)-3',4'-ди-О-(S) камфаноил-(+)-цис-хеллактона оказывают влияние на репликацию ВИЧ. Одно из наиболее активных соединений (1) представлено на рис. 1 [3, 4].



**Рис. 1.** Структурные формулы соединений, содержащих фрагмент бензопиран-2-она, обладающие противовирусной активностью

Jih Ru Hwu и соавт. было показано, что конъюгаты кумаринов и рибофуранозидов пурина проявляют высокую активность в отношении вируса гепатита С. Одно из наиболее перспективных соединений этой группы (2) ингибировало репликацию вируса со значением  $EC_{50}$  5,5 мкМ [5].

В коре стеблей каллофилума бразильского (*Chlophyllum brasiliense* Cambess. семейство Clusiaceae) обнаружен трициклический кумарин (3), который был далее получен синтетическим путем. Помимо установленной противораковой активности данное вещество ингибировало репликацию ВИЧ [7].

Приведенные примеры противовирусной активности соединений, содержащих структурный фрагмент бензопиран-2-она, свидетельствуют о высоком потенциале рассматриваемой группы веществ в целях поиска новых противовирусных агентов, действующих на коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома второго типа (SARS-CoV-2), что актуально в условиях развившейся пандемии.

### ОСНОВНАЯ (ХИМОТРИПСИНОПОДОБНАЯ) ПРОТЕАЗА SARS-CoV-2/M<sup>PRO</sup>/3CL<sup>PRO</sup>/nsp5

Цикл репродукции вируса SARS-CoV-2 включает ряд этапов. Первый этап – связывания вируса SARS-CoV-2 со специфическими рецепторами на поверхности мембраны клетки-хозяина, на следующем этапе РНК вируса попадает в цитоплазму клетки. Цепь РНК включает 14 открытых рамок считывания (ORF — Open reading frame). Две основные ORF1a и ORF1b составляют 2/3 генома и используются для сборки двух полипротеинов pp1a и pp1ab. Указанные белки должны быть расщеплены на 16 неструктурных белков (nsp – nonstructural protein) nsp1 – nsp16. Расщепление осуществляется двумя цистеиновыми протеазами: папаин-подобной протеазой (PL<sup>PRO</sup>) и химотрипсин-подобной протеазой (3CL<sup>PRO</sup>) (другое назва-

ние – основная протеаза (M<sup>PRO</sup>). Название 3CL<sup>PRO</sup> связано со схожестью с 3С-подобной протеазой пикокоронавирусов, тогда как название M<sup>PRO</sup> основывается на том, что данный фермент ответственен за протеолитическое расщепление большей части участков полипротеинов [8, 9].

Основная протеаза (3CL<sup>PRO</sup>/ M<sup>PRO</sup>/nsp5) представляет собой цистеиновую протеазу. Мономер M<sup>PRO</sup> SARS-CoV-2 обычно не обладает активностью. Гомодимеры активны, при этом протомеры расположены друг к другу ортогонально. Каждый из них включает домен I (остатки 8-101), домен II (остатки 102-184) и домен III (остатки 201-303). Домены I и II включают антипараллельные β-листы. Домен II связан с доменом III с помощью длинной петлевой области (остатки 185-200). Домен III содержит пять α-цепей. Каждый протомер содержит отдельный сайт связывания с субстратом [10].

Основная протеаза содержит каталитическую диаду (цистеин Cys145 и гистидин His41) в каждом активном центре, расположенную в углублении между доменом I и доменом II. Тогда как другие цистеиновые и сериновые протеазы содержат каталитическую триаду, в основной протеазе в каталитическом центре присутствует молекула воды. Протон от SH-группы цистеинового остатка переходит к имидазольному фрагменту гистидинового остатка и образуется тиолат-анион, осуществляющий нуклеофильную атаку амидной связи субстрата. Высвобождается N-концевой пептидный продукт, присоединяя протон от гистидинового остатка, а затем происходит гидролиз тиоэфира с высвобождением C-концевого пептида. В конце при участии молекулы воды каталитическая диада восстанавливается до изначального состояния [10, 11] (рис. 2).

В настоящее время SARS-CoV-2 M<sup>PRO</sup> является одной из основных мишеней для поиска новых соединений (рис. 3), нарушающих репродукцию вируса в клетке.

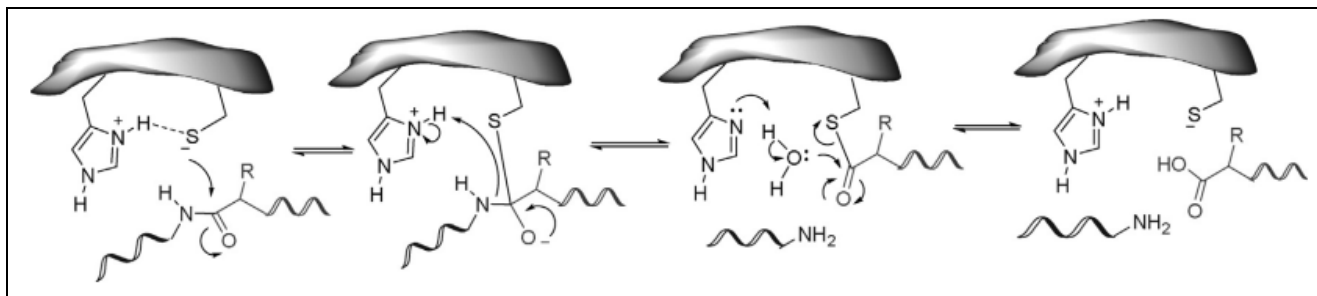


Рис. 2. Механизм действия основной протеазы M<sup>PRO</sup> [10]

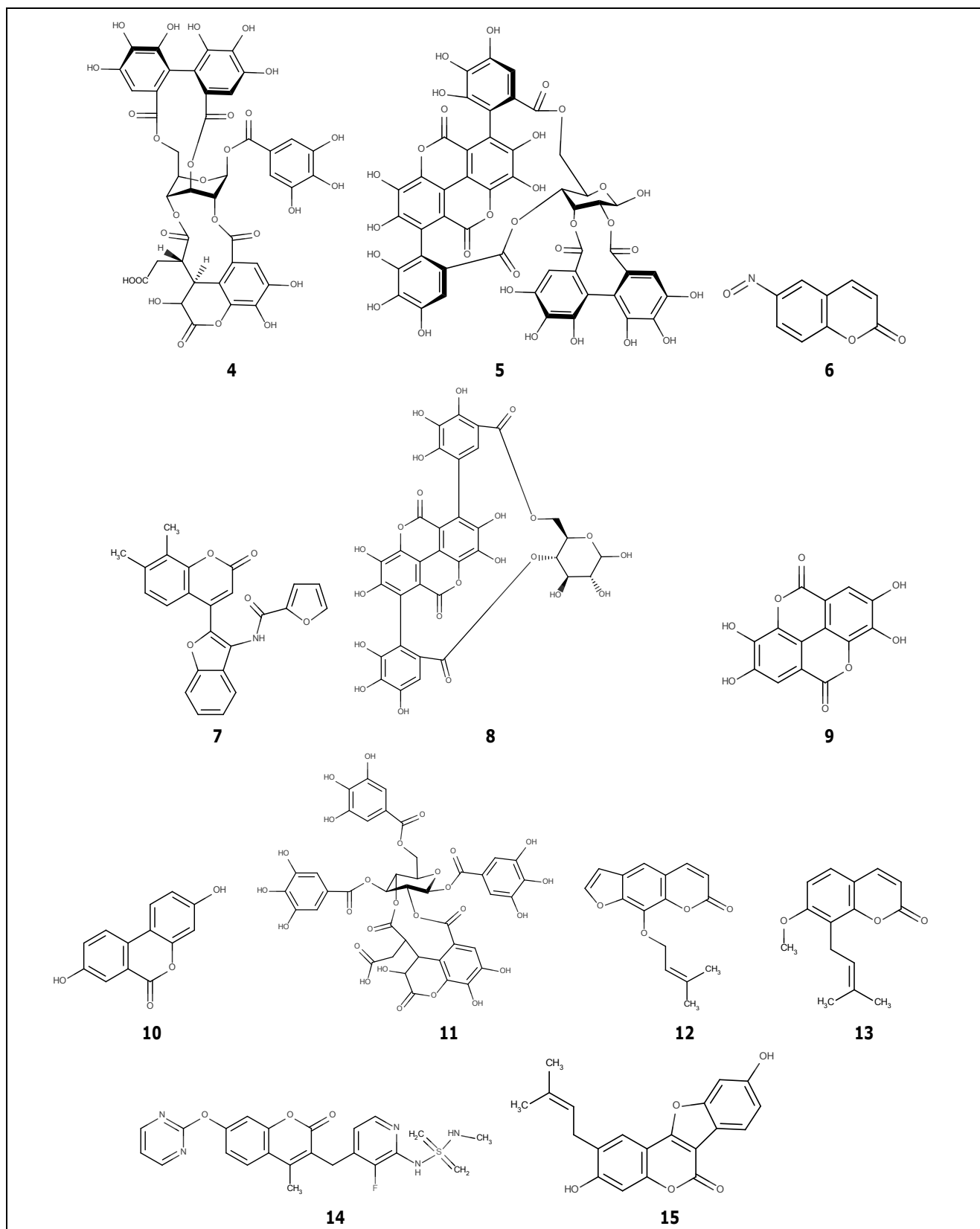


Рис. 2. Соединения, содержащие структурный фрагмент бензопиран-2-она, для которых проводились исследования влияния на репликацию вируса SARS-CoV-2

Ruikun Du и соавт. проводили исследования противовирусной активности двух полифенольных соединений (хебулаговой кислоты (4) и пуникалагина (5)), содержащих фрагмент бензопиран-2-она, в отношении ингибирования репликации SARS-CoV-2.

Хебулаговая кислота содержится преимущественно в плодах терминалии (*Terminalia chebula* Retz. семейство *Combretaceae*)

Кожура граната обыкновенного (*Punica granatum* L. семейство *Lythraceae*) обычно выбрасывается за ненадобностью, однако химический анализ ее извлечений показал ряд биологически активных полифенолов, в том числе пуникалагина.

Результаты реакции нейтрализации бляшкообразования, используя ремдесивир в качестве вещества сравнения, привели к значениям EC<sub>50</sub> для хебулаговой кислоты (4) и пуникалагина (5)  $9,76 \pm 0,42$  мкМ и  $7,20 \pm 1,08$  мкМ соответственно. Для установления того, что цитотоксичность исследуемых соединений не является причиной нарушения репликации вируса, были получены значения CC<sub>50</sub> более 100 мкМ. Индекс селективности для исследуемых соединений превышал 10 и 13. Приведенные выше результаты исследования свидетельствовали о том, что соединения (4) и (5) проявляют *in vitro* активность в отношении SARS-CoV-2. Далее авторами было проведено изучение механизма действия рассматриваемых полифенолов. Доказано, что хебулаговая кислота (4) и пуникалагин (5) ингибируют основную протеазу вируса 3CL<sup>PRO</sup> со значениями IC<sub>50</sub>  $9,09 \pm 0,87$  мкМ и  $4,62 \pm 0,27$  мкМ. Исследуемые вещества являются неконкурентными аллостерическими ингибиторами. Данные молекулярного докинга показали, что соединения (4) и (5) связываются с участком между доменами II и III 3CL<sup>PRO</sup>, который немного отстоит от участка связывания субстрата [12].

Tika R. Malla и соавт. было установлено, что синтетическое производное бензопиран-2-она 6-нитрозо-2H-хромен-2-он (6), ингибирует основную протеазу SARS-CoV-2 на 99,5% при уровне концентрации 20 мМ [13].

Jennifer Loschwitz и соавт. проведено исследование поиска потенциальных ингибиторов основной протеазы SARS-CoV-2. В этой связи из первоначального набора (более чем 168000 веществ) на основании молекулярного докинга и дальнейшей молекулярной динамики были отобраны 35 соединений, среди которых присутствовал N-[2-(7,8-диметил-2-оксо-2H-хромен-4-ил)-1-

бензофуран-3-ил]фуран-2-карбоксамид (7). Степень ингибирования основной протеазы для него составляло 83% [14].

Jennifer C. Milligan и соавт. проводилось скрининговое исследование выборки небольших молекул в качестве потенциальных ингибиторов основной протеазы. Одним из активных соединений оказалось производное фурукумарина 3,9-дигидрокси-2-(3-метил-2-бутенил)-6P-[1]бензофуоро[3,2-с]хромен-6-он (15), для которого степень ингибирования составляла 79% [15].

### РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН (RBD) S-БЕЛКА ДЛЯ АНГИТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА 2/ACE2

Контакт вируса SARS-CoV-2 с клеткой осуществляется посредством связи спайкового S-белка с ангиотензинпревращающим ферментом 2 на поверхности. Спайковый белок S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 состоит из двух субъединиц – S1 и S2, первая из которых содержит рецептор-связывающий домен (RBD), взаимодействующий с 18 аминокислотными остатками ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE-2) на поверхности клетки-хозяина [16]. В связи с этим перспективен поиск соединений-ингибиторов взаимодействия вируса с ACE-2.

Relja Surđić и соавт. проводились исследования ингибирования связывания S-гликопротеина и ACE-2 для извлечения из кожуры граната обыкновенного, а также ряда соединений этого экстракта, содержащих структурный фрагмент бензопиран-2-она (пуникалин (8), пуникалагин (5) и эллаговая кислота (9)), в том числе их основной метаболит уролитин А (10). Первоначально проводили *in silico* исследования. В качестве вещества сравнения использовали противовирусный препарат умифеновир. На начальном этапе исследований осуществлялся молекулярный докинг с использованием S-гликопротеина. Наибольшее значение скоринговой функции было получено для пуникалина. Немного меньший результат соответствовал пуникалагину. Прочие соединения образовывали водородные связи с аминокислотными остатками S-гликопротеина, но с более высокой энергией связывания. На следующем этапе проводили молекулярную динамику выбранных комплексов лиганд-белок. Графики распределения значений среднеквадратического отклонения (RMSD) показывают, что эллаговая кислота, пуникалин и уролитин А характеризовались более стабильными

комплексами, тогда как наименьшее отклонение наблюдалось для пуникалагина и умифеновира. Последним этапом исследований была оценка ингибирующей активности *in vitro*, по результатам которой наиболее эффективным оказался экстракт из кожуры граната обыкновенного ( $IC_{50} = 0,06$  мг/мл, степень ингибирования 83,25 %), среди соединений наибольшее ингибирование проявил пуникалин ( $IC_{50} = 0,14$  мг/мл, степень ингибирования 78 %). Немного меньшая активность получена для пуникалагина, тогда как остальные вещества значительно им уступали [17].

### РНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА/RdRp/nsp12

РНК-зависимая РНК-полимераза является важнейшим ферментом многих РНК-содержащих вирусов, в том числе вируса SARS-CoV-2. RdRp также известна как неструктурный белок nsp 12, который вместе с nsp 7 и nsp8 в качестве кофакторов катализирует синтез вирусной РНК и играет центральную роль в репликации и транскрипции, следовательно, является актуальной молекулярной мишенью [18].

В патенте компании Sytheon Ltd. было показано, что хебулиновая (**11**) и хебулаговая (**4**) кислоты ингибируют RdRp со значениями  $EC_{50} < 0,01$  мкМ относительно препарата сравнения ремдесвира ( $EC_{50} 0,77$  мкМ). Также установлено, что соединения **11** и **12** ингибируют провоспалительные ИЛ-6 и ИЛ-8, что важно для устранения эффектов цитокинового шторма [19].

### САЙТ РАСЩЕПЛЕНИЯ ФУРИНОМ S-ГЛИКОПРОТЕИНА

Для активации S-белка, слияния и входа в клетку необходимо, чтобы между субъединицами S1 и S2 белка S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 произошел разрыв. Сайт расщепления содержит последовательность из 4 аминокислот (RRAR), комплементарный активному центру фурина [20]. Таким образом, актуален поиск потенциальных ингибиторов фурина, которые могли бы препятствовать входу вируса в клетку.

Yuka Kiba и соавт. в спиртовом извлечении из плодов жгун-корня Моннье (*Cnidii monnieri* (L.) Spreng. семейство *Apiaceae*) идентифицировали два производных кумарина: императорин (**12**) и остол (**13**), для которых установлено значимое ингибирование схожей с фурином ферментативной

активности. Значение  $IC_{50}$  императорина – 1,45 мМ, остола – 9,45 мкМ [21].

### ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА (CaCo-2), ЗАРАЖЕННОЙ SARS-CoV-2

В патенте Общества содействия прикладным исследованиям имени Фраунгофера приведена оценка противовирусной активности по жизнеспособности клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека (CaCo-2), зараженной вирусом SARS-CoV-2, для производного бензопиран-2-она, 3-{2-(метиламиносульфонил)амино-3-фторпирidin-4-ил}-4-метил-7-(пиримидин-2-илокси)-2-оксо-2H-1-бензопиран (**14**). Значение  $IC_{50}$  составляло 5,36 мкМ [22].

### ВЫВОДЫ

Соединения, содержащие структурный фрагмент бензопиран-2-она обладают широким спектром биологической активности, в том числе могут рассматриваться как эффективные противовирусные агенты. В связи с доступностью сырья кожуры граната обыкновенного следует обратить внимание на высокую ингибирующую активность извлечения из этого сырья в отношении рецептор-связывающего домена (RDB) S-белка для ACE2. Интересно, что полифенольное соединение из этого извлечения со структурным фрагментом бензопиран-2-она пуникалагин действует сразу на две молекулярные мишени: RBD и основную протеазу ( $M^{PRO}$ ). Еще одним перспективным соединением является хебулаговая кислота, выделенная из плодов терминалии, также оказывающая влияние на две молекулярные мишени –  $M^{PRO}$  и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp).

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Hyaying Fan, Zhenfang Gao, Kai Ji et al.* The in vitro and in vivo anti-inflammatory effect of osthole, the major natural coumarin from *Cnidium monnieri* (L.) Cuss, via the blocking of the activation of the NF- $\kappa$ B and MAPK/p38 pathways. *Phytomedicine*. 2019; 58: 152864
2. *Toshihiro Aoki, Ikumi Hyohdoh, Noriyuki Furuichi et al.* Optimizing the Physicochemical Properties of Raf/MEK Inhibitors by Nitrogen Scanning. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014; 5(4): 304–309.
3. *Lan Xie, Donglei Yu, Carl Wild et al.* Anti-AIDS Agents. 52. Synthesis and Anti-HIV Activity of Hydroxymethyl(3'R,4'R)-3',4'-Di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone Derivatives. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 756–760.

4. *Jian Tang, Keduo Qianb, Bei-Na Zhang, et al.* Anti-AIDS agents 82: Synthesis of seco-(3'R,4'R)-3',4'-di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone (DCK) derivatives as novel anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010; 18: 4363–4373
5. *Xuemei Yu, Sainz Bruno (Jr.), Petukhov P.A., et al.* Identification of Hepatitis C Virus Inhibitors Targeting Different Aspects of Infection Using a Cell-Based Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012; 56(12): 6109–6120.
6. *Jih Ru Hwu, Shu-Yu Lin, Shwu-Chen Tsay, et al.* Coumarin-Purine Ribofuranoside Conjugates as New Agents against Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* 2011; 54: 2114–2126.
7. *Kudo E., Taura M., Matsuda K., et al.* Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70in acutely and chronically infected cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013; 23: 606–609.
8. *V'kovski Ph., Kratzel A., Steiner S., et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. 2021; 19: 155–170.
9. *Arya R., Kumari S., Pandey B., et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2021; 433: 166725.
10. *Banerjee R., Perera L., Tillekeratne L.M.V.* Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Drug Discov Today*. 2021; 26(3): 804–816.
11. *Ullrich S., Nitsche C.* The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020; 1 (30(17)): 127377.
12. *Du R., Cooper L., Chen Z., et al.* Discovery of chebulagic acid and punicalagin as novel allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. *Antiviral Res.* 2021; 190: 105075.
13. *Malla Tika R., Tumber A., John T., et al.* Mass spectrometry reveals potential of  $\beta$ -lactamsas SARS-CoV-2 Mpro inhibitors. *Chem. Commun.* 2021; 57: 1430.
14. *Loschwitz J., Jackering A., Keutmann M., et al.* Novel inhibitors of the main protease enzyme of SARS-CoV-2 identified via molecular dynamics simulation-guided in vitro assay. *Bioorganic Chemistry*. 2021; 11: 104862.
15. *Milligan J.C., Zeisner T.U., Papageorgiou G., et al.* Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of Nsp5 main protease. *Biochem. J.* 2021; 16; 478(13): 2499–2515.
16. *Hartenian E., Nandakumar D., Lari A.* The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.* 2020; 11; 295(37): 12910–12934.
17. *Suručić R., Travar M., Petković M., et al.* Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor: In silico and in vitro studies. *Bioorg. Chem.* 2021; 114: 105145.
18. *Mouffouk C., Mouffouk S., Mouffouk S., et al.* Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2). *Eur. J. Pharmacol.* 2021; 15, 891: 173759.
19. *Chaudhuri Ratan K.* Methods and composition for mitigating symptoms of acute respiratory distress syndrome. U.S. Patent № US 2021/0236580 A1. 2021.
20. *Bestle D., Heindl M.R., Limburg H.* TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci Alliance*. 2020; 23 (3(9)): e202000786
21. *Kiba Y., Oyama R., Misawa S., et al.* Screening for inhibitory effects of crude drugs on furin-like enzymatic activities. *J. Nat. Med.* 2021; 75(4): 1080–1085.
22. *Gribbon P., Zaliani A., Ellinger B., et al.* Composition for coronavirus infection treatment and/or prevention. World Intellectual Property Organization Patent № WO 2021/198440 A1. 2021.

Поступила 18 января 2022 г.

## ANTIVIRAL ACTIVITY OF COMPOUNDS CONTAINING A STRUCTURAL FRAGMENT OF BENZOPYRAN-2-ONE

© Authors, 2022

### D.S. Zolotyh

Ph.D. (Pharm.) Associate Professor, Analytical Chemistry Department, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: metranidazol@mail.ru

### Z.V. Dayronas

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Department of Pharmacognosy, Botany and Technology of Phytopreparations, Pyatigorsk medical and pharmaceutical institute (Pyatigorsk, Russia)  
E-mail: daironas@mail.ru

### D.I. Pozdnyakov

Ph.D. (Pharm.), Head of Living System Laboratory, Associate Professor of Department of Pharmacology with Clinical Pharmacology Course, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Pyatigorsk, Russia)

Benzopyran-2-oh derivatives are characterized by an extensive spectrum of pharmacological activity, among which antiviral properties are particularly distinguished. It is worth noting that both natural derivatives of benzopyran-2-one and their semi-synthetic analogues have antiviral activity. It is particularly relevant to evaluate the effectiveness of benzopyran-2-one derivatives in relation to the SARS-CoV-2 virus. A number of studies indicate that benzopyran-2-ones are able to suppress the main virulence factors of SARS-CoV-2: the receptor-binding domain of the S-protein, the main and papain-like proteases. As SARS-CoV-2 inhibiting agents, hebulinic acid and punicalagin are of the greatest interest, which combine a polyvalent mechanism of antiviral action, high efficiency and low toxicity.

**Key words:** antiviral properties, benzopyran-2-one derivatives, SARS-CoV-2.

**For citation:** Zolotyh D.S., Dayronas Zh.V., Pozdnyakov D.I. Antiviral activity of compounds containing a structural fragment of benzopyran-2-one. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2022;25(6):22–27. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-06-03>