

На правах рукописи

Сафронова Виктория Николаевна

**ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ VRICHOS-АССОЦИИРОВАННЫХ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ**

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2026

Работа выполнена в Учебно-научном центре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Доктор химических наук **Овчинникова Татьяна Владимировна**

Официальные оппоненты:

Костров Сергей Викторович, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский Технологический университет».

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией геномной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Защита состоится «11» ноября 2026 г. в 11:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, к.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте ГНЦ ИБХ РАН www.ibch.ru.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Количество резистентных штаммов бактерий прогрессивно растет во всем мире, создавая серьезную угрозу здоровью людей и значительно повышая нагрузку на систему здравоохранения. В рамках поиска решения данной проблемы разрабатываются новые антибактериальные агенты на основе уже известных соединений с использованием методов медицинской химии. Однако структурные модификации антибиотиков не обеспечивают их долгосрочную эффективность. Анализ данных для 204 стран, опубликованный в журнале *Lancet* в 2022 году, показывает, что антибиотикорезистентность является одной из ведущих причин смертности во всем мире, особенно в странах Африки и Южной Азии. Наибольшую угрозу представляют так называемые ESKAPEE-патогены: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* и *Escherichia coli*, которые на сегодняшний день являются доминирующими возбудителями резистентных бактериальных инфекций.

Одним из наиболее перспективных подходов к преодолению проблемы антибиотикорезистентности является поиск и внедрение новых классов антибактериальных агентов, механизм действия которых принципиально отличается от такового у традиционных антибиотиков. В этом контексте антимикробные пептиды (АМП) представляют особый интерес, поскольку являются компонентами системы врожденного иммунитета и обеспечивают защиту живых организмов от бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Природное разнообразие биологических источников АМП охватывает весь спектр организмов – от прокариот до человека. Особую ценность представляют морские беспозвоночные животные, у которых эволюция протекала в непрерывном контакте с патогенной микрофлорой в отсутствие приобретенного иммунитета, что привело к формированию эффективных систем защиты, связанных напрямую с наличием АМП в клетках и тканях животных. Примером эволюционно древних беспозвоночных животных являются морские полихеты, сравнительно малоизученные с точки зрения поиска и изучения биологически активных молекул. Биоразнообразие морских полихет позволяет рассматривать их в качестве богатого источника различных по структуре и свойствам АМП. Углубленные структурно-функциональные исследования этих соединений могут привести к конструированию на их основе лекарственных средств нового поколения для лечения инфекционных заболеваний, вызванных мульти- и панрезистентными бактериальными штаммами.

Степень разработанности области исследования

В ранних исследованиях, направленных на поиск новых биологически активных соединений у морских беспозвоночных животных класса Polychaeta, из морского червя *Arenicola marina* были впервые выделены и структурно-функционально охарактеризованы β -спилечные антимикробные пептиды, названные ареницинами. При анализе структур их белков-предшественников был обнаружен BRICHOS-домен, ранее идентифицированный в составе белков многих животных и человека. Показано, что мутации в генах, кодирующих BRICHOS-содержащие белки человека, ассоциированы с нейродегенеративными и респираторными заболеваниями, а также с сахарным диабетом II типа. Изначально считалось, что BRICHOS-домен у полихет действует как внутримолекулярный шаперон, способствующий фолдингу АМП при процессинге предшественников исключительно β -спилечных пептидов. Однако в наших исследованиях выявлены α -спиральные АМП никомицины в арктической полихете *Nicomache minor*, белки-предшественники которых также содержали BRICHOS-домен.

Полученные данные позволили высказать предположение о том, что BRICHOS-домен может функционировать как универсальный фрагмент белков-предшественников, участвующий в биосинтезе АМП различных структурных классов у полихет аналогично кателин-подобному домену (cathelin-like domain или CLD) у позвоночных животных. Это предположение побудило нас расширить границы поиска BRICHOS-ассоциированных пептидов у полихет с целью обнаружения новых структурных семейств биологически активных молекул.

Цели и задачи работы

Целью работы является поиск и изучение свойств новых защитных пептидов полихет, биосинтез которых осуществляется путём протеолитического процессинга белков-предшественников, содержащих BRICHOS-домен (BRICHOS-ассоциированных АМП).

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Биоинформатический поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих новые BRICHOS-ассоциированные АМП в транскриптомах полихет.
2. Разработка биотехнологических способов получения рекомбинантных аналогов представителей обнаруженных семейств АМП.
3. Анализ биологической активности полученных АМП и изучение механизмов их антибактериального действия.
4. Рациональный дизайн модифицированных аналогов обнаруженных АМП с повышенной антибактериальной активностью и/или сниженной цитотоксичностью.
5. Изучение эффективности и безопасности отобранных АМП *in vitro* и *in vivo* на экспериментальных моделях инфицированных мышей.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Одним из распространенных подходов к обнаружению новых АМП, синтезируемых рибосомой, является поиск в базах данных транслированных геномных или транскриптомных последовательностей по гомологии с ранее охарактеризованными АМП и депонированными в специализированных базах данных (например, Antimicrobial Peptide Database или APD). Однако, данный метод имеет определенные ограничения, главным из которых является невозможность обнаружить принципиально новые структурные семейства АМП. Известно, что большинство известных АМП животных синтезируется в составе белков-предшественников, из которых зрелый активный пептид высвобождается путем частичного протеолиза, что можно рассматривать в качестве дополнительных вводных данных при разработке стратегий поиска новых АМП-подобных молекул.

Теоретическая значимость работы подтверждается публикациями в высокорейтинговых рецензируемых профильных международных журналах, входящих в списки изданий, индексируемых базами данных Web of Science, SCOPUS и РИНЦ.

Результаты, полученные в ходе данного исследования, свидетельствуют о том, что для АМП полихет различных структурных классов характерен биосинтез в виде белков-предшественников, содержащих консервативный BRICHOS-домен. Применение нового подхода, основанного на поиске последовательности BRICHOS-домена на уровне транскриптомов полихет, позволило идентифицировать 84 нуклеотидные последовательности, кодирующие пептиды с потенциальными антимикробными свойствами. Показано, что поиск новых АМП полихет на основе консервативной последовательности в структуре их белков-предшественников позволяет не только идентифицировать новые антимикробные соединения, но и открывает возможность обнаружения целых семейств новых защитных пептидов, тем самым существенно

изменяя подход к поиску новых АМП у животных. Полученные результаты не только расширяют знания о природном разнообразии АМП у полихет, но и формируют основу для дальнейшего исследования их терапевтического потенциала в биомедицине.

В результате углублённого изучения обнаруженных BRICHOS-ассоциированных АМП были разработаны два прототипа антибиотика с высокой активностью в отношении наиболее опасных грамотрицательных бактерий, что представляет особую практическую значимость для разработки новых стратегий лечения внутрибольничных бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Для одного из них – Ар9 – был детально изучен механизм антибактериального действия, а также проведен анализ вероятности возникновения бактериальной резистентности и выявлены потенциальные пути защиты клетки-мишени. В целом, Ар9 благодаря высокой эффективности *in vitro* и *in vivo*, сравнительно низкой цитотоксичности и широкому терапевтическому окну может рассматриваться в качестве многообещающей замены полимиксином – антибиотикам резервного ряда, применяемым для лечения осложненных заболеваний, вызванных мультирезистентными грамотрицательными патогенами.

Положения, выносимые на защиту

1. BRICHOS-домен является универсальным фрагментом белков-предшественников различных структурных семейств АМП у полихет.

2. Зрелые АМП, синтезируемые в составе BRICHOS-содержащих белков-предшественников, проявляют активность в отношении широкого спектра патогенов, реализуя различные молекулярные механизмы антимикробного действия.

3. Природные АМП и их модифицированные аналоги демонстрируют высокую эффективность на мышинных моделях инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями группы ESKAPEE, и могут рассматриваться в качестве прототипов новых антибактериальных агентов.

Степень достоверности и апробация работы

Результаты исследования опубликованы в 7 статьях в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, преимущественно относящихся к первому и второму квартилям (Q1, Q2). Основные положения работы прошли апробацию на следующих российских и международных конференциях: «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020, 2021); 45-ый конгресс FEBS (Любляна, Словения, 2021); XXXIII и XXXIV Международные зимние молодёжные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2021, 2022); Международная конференция «Антимикробные пептиды в качестве прототипов новых антибиотиков» (Санкт-Петербург, 2023).

Личный вклад автора

Формулировка целей, постановка задач, планирование диссертационной работы и анализ обоснованности выводов осуществлялись соискателем совместно с научным руководителем, планирование экспериментов – совместно с с.н.с., к.х.н. Пантелеевым П.В. Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема экспериментальных исследований, изложенных в диссертационной работе, включая приготовление и детальное изучение свойств образцов АМП, анализ полученных данных и их статистическую обработку, а также оформление результатов для их публикации. Обсуждение полученных результатов и написание статей осуществлялось соискателем совместно с коллективом соавторов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 163 страницах, содержит 54 рисунка, 11 таблиц и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и библиографический список использованных литературных источников.

Содержание работы

Выбор объектов исследования

В качестве объектов исследования нами были выбраны различные виды морских полихет, большая часть из которых принадлежит к инфраклассу *Scolecida*. Выбор был обусловлен тем, что у морских многощетинковых червей *Arenicola marina* и *Nicomache minor* ранее были идентифицированы BRICHOS-ассоциированные АМП.




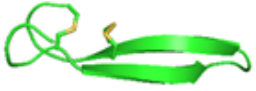
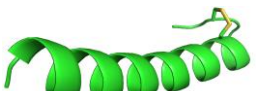


Поиск и получение новых BRICHOS-ассоциированных АМП

На сегодняшний день биоинформатический поиск нуклеотидных последовательностей в геномных и транскриптомных базах данных представляет собой оптимальную стратегию для обнаружения новых АМП. В рамках данного исследования был применен подход, основанный на *de novo* сборке транскриптомов 10 видов полихет.

Поиск транскриптов, кодирующих BRICHOS-домен, позволил отобрать из полученных транскриптомных данных около 100 целевых последовательностей. Учитывая механизм процессинга известных представителей данного семейства АМП, дальнейший поиск последовательностей зрелых пептидов осуществлялся на основании их расположения между стоп-кодоном и сайтом процессинга фуриновой протеазой. В результате такого анализа и отсеивания транскриптов с неполной информацией о С-концевой части белков-предшественников была сформирована библиотека из 82 аминокислотных последовательностей. Поскольку большинство обнаруженных АМП обладали низкой гомологией первичной структуры между собой и известными АМП, их классификацию проводили на основе расчётных данных о вероятной пространственной структуре с использованием программы AlphaFold3.

В результате, было предсказано и подтверждено существование следующих структурных семейств АМП: β -шпильчатые с симметричным и асимметричным расположением остатков цистеина; α -спиральные, в том числе несущие С-концевой «Rapa-box»; дефенсин-подобные, обогащенные остатками цистеина. Для определения биологической активности у представителей данных семейств нами была получена панель АМП, представленная в **Таблице 1**.

Таблица 1. Характеристика отобранных BRICHOS-ассоциированных АМП

Объект исследования	Вид	Первичная структура	Пространственная структура*
Капителлацин (β-шпилечный АМП)	<i>Capitella teleta</i>	SPRVCIRVCRNGVCYRRCWG	
Абареницин (β-шпилечный АМП)	<i>Abarenicola pacifica</i>	GYCFTACYLRNGVRI CYRRCN	
UuBRI-21 (β-шпилечный АМП)	<i>Urechis unicinctus</i>	GF CGYACYYRNGVRI CVRYCN	
HfBRI-25 (β-шпилечный АМП с асимметричным расположением остатков цистеина)	<i>Heteromastus filiformis</i>	SPRGCFCVWISVNGRRVRCWGS GC	
CtBRI-28 и CtBRI-28(i) (α-спиральные АМП, содержащие С-концевой «Ranabox»)	<i>Clymenella torquata</i>	GWLSKAWKKAKEVAGKVVVACIQ TRCLG GWLSKAWKKAKEAAGKAVGACIQ TRCLG	
HfBRI-28 (α-спиральный АМП)	<i>Heteromastus filiformis</i>	GWLSIWKGIKKAVKWVLRHGVY VRITF	
AmBRI-44a (дефенсин-подобный АМП, стабилизированный 4 дисульфидными связями)	<i>Arenicola marina</i>	ATCPAGDVLVRYNTCYWFCCDFC VRYSNGYTT CYRCSYLGRSCK	

* Информация о пространственной структуре АМП была получена с использованием программы AlphaFold3.

На первом этапе работы в бактериальной системе экспрессии были получены рекомбинантные аналоги обнаруженных природных пептидов в составе гибридных белков с модифицированным тиоредоксином А (M37L) и последовательностью His-tag. Каждый из генов, кодирующих новые пептиды, был получен путем отжига 3'-концов двух праймеров, соответствующих N- и C-концевым областям пептида, с последующим клонированием в экспрессионный вектор на основе плазмиды серии pET. Штаммы-продуценты рекомбинантных пептидов были получены путем трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) соответствующими плазмидными конструкциями методом теплового шока. Очистку целевых белков осуществляли с помощью металлохелатной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ на полупрепаративной колонке Reprosil-Pur C18-AQ в системе водных буферов, содержащих ацетонитрил и 0,1% ТФУ. Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов были

подтверждены с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии. Выход пептидов составил от 4,5 до 8,2 мг на литр бактериальной культуры. Поскольку α -спиральный пептид HfBRI-28 обладает высокой гидрофобностью, усложняющей экспрессию и процесс очистки, его получение было осуществлено методом твердофазного химического синтеза сотрудниками отдела Общей патологии и патологической физиологии Института экспериментальной медицины.

Исследование биологической активности новых АМП

Для обнаруженных семейств АМП была определена активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий методом двукратных серийных разведений в среде Мюллера-Хинтона (МН) с добавлением 0,9% NaCl. Стоит отметить, что активность большинства АМП значительно снижается в среде с повышенной ионной силой, что следует учитывать при определении истинных значений минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Для поддержания оптимальных условий роста штамма *Vibrio harveyi* BB120 использовали среду с 3% NaCl. Цитотоксическое действие пептидов было исследовано на свежевыделенных человеческих эритроцитах и адгезионной клеточной линии человека НЕК293Т (Рисунок 1).

АМП	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК, мкМ)													*Токсичность в отношении эукариотических клеток при 128 мкМ (%)	
	Г(-)							Г(+)						Эритроциты	НЕК293Т
	ЕС	АВ	КР	РА	ЕС1	РМ	ВН	SA	BS	BL	ВМ	MP			
Капителлацин	0,5	0,25	4	4	4	н.д.	0,5	>16	16	н.д.	н.д.	н.д.			
Абареницин	0,25	0,125	2	0,25	2	0,5	0,125	16	2	4	н.д.	16			
UuBRI-21	0,25	0,5	4	1	2	1	0,125	8	2	2	н.д.	16			
HfBRI-25	1	1	32	>32	16	н.д.	1	>16	4	16	32	16			
CtBRI-28	0,25	1	1	1	1	0,25	0,25	0,5	0,125	0,125	0,125	н.д.			
CtBRI-28(i)	0,25	0,125	4	2	4	2	1	16	1	2	8	н.д.			
HfBRI-28	2	2	16	>32	2	>32	0,063	8	0,5	4	2	1			
AmBRI-44a	>64							>64	2	1	8	4			
ЕС: <i>E. coli</i> ATCC 25922 PA: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 VH: <i>V. harveyi</i> BB120 АВ: <i>A. baumannii</i> XDR Cl 2675 ЕС1: <i>E. cloacae</i> XDR Cl 4272 SA: <i>S. aureus</i> ATCC 29213 КР: <i>K. pneumonia</i> ATCC 700603 РМ: <i>P. mirabilis</i> XDR Cl 3423 BS: <i>B. subtilis</i> B-886 BL: <i>B. licheniformis</i> B-511 ВМ: <i>B. mycoides</i> B-814 MP: <i>M. phlei</i> Ac-1291													*0-10 10-20 20-30 30-40 40-50 50-60 60-70 70-80 80-90 90-100		

Рисунок 1. Антимикробная активность и цитотоксичность обнаруженных АМП

Семейство α -спиральных BRICHOS-ассоциированных АМП, включая ранее обнаруженный никомицин-1, характеризуется выраженной активностью в отношении грамположительных бактерий. Среди них CtBRI-28 демонстрирует наивысшую антибактериальную активность, однако обладает высокой токсичностью в отношении клеток млекопитающих. Его изоформа, CtBRI-28(i), отличается сниженной гидрофобностью по сравнению с CtBRI-28 (индекс GRAVY -0,126 и 0,2, соответственно), что приводит к уменьшению активности как против бактериальных, так и против эукариотических клеток. В то же время, HfBRI-28 проявляет умеренную антибактериальную активность наряду с высокой токсичностью, но при этом демонстрирует специфичность к грамотрицательным бактериям *V. harveyi* – основным патогенам ряда беспозвоночных морских животных.

Семейство β -шпилечных АМП включает пептиды как с симметричным (капителлацин, абареницин и UuBRI-21), так и с асимметричным (HfBRI-25) расположением остатков цистеина. Структура рекомбинантного HfBRI-25 с типом замыкания C1-C4/C2-C3 была подтверждена с помощью триптического расщепления с

последующим анализом методами ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии (графические данные не приведены). Среди исследованных пептидов HfBRI-25 и капителлацин обладают максимальной селективностью действия в отношении бактериальных клеток, что делает их привлекательными матрицами для оптимизации физико-химических параметров АМП с целью повышения потенциала их антибактериального действия. HfBRI-25 проявляет активность против узкого спектра бактерий, включая *A. baumannii* и *E. coli*, в средах с повышенной ионной силой. При этом значения его МИК в отношении различных штаммов *E. coli*, в том числе образующих биоплёнку или обладающих *mcr-1*-опосредованной устойчивостью к полимиксидам, составляет 1 мкМ. Принципиально важной особенностью HfBRI-25 является его устойчивость к инактивации фетальной бычьей сывороткой (ФБС), которая для многих природных АМП значительно снижает или полностью подавляет их активность. В случае HfBRI-25 его эффективность сохраняется на уровне 1 мкМ в средах, содержащих 5, 10 и 25% ФБС. Кроме того, данный пептид действует на бактерии в составе биоплёнок, снижая жизнеспособность клеток *E. coli* K12 SBS1936 до 5% при концентрации, лишь вдвое превышающей МИК. Абареницин и UuBRI-21 обладают высокой активностью против грамотрицательных бактерий группы ESKAPEE, однако проявляют значительную токсичность в отношении человеческих эритроцитов. При этом UuBRI-21, в отличие от абареницина, не оказывает цитотоксического действия на эукариотические клетки линии HEK293T, что, вероятно, обусловлено его выраженной способностью связываться с компонентами ФБС. Было показано, что активность UuBRI-21 против *E. coli* M1-35r снижается в 16 раз в среде, обогащенной 10% ФБС. Следует отметить, что абареницин и UuBRI-21 являются структурными гомологами ареницина-3, на основе которого компания Adenium Biotech разработала аналог AA139 с подтвержденной *in vivo* эффективностью. В связи с этим, высокоактивные абареницин и UuBRI-21 являются перспективными соединениями для рационального дизайна аналогов со сниженной токсичностью. Таким образом, β -шпилечные BRICHOS-ассоциированные АМП преимущественно активны в отношении грамотрицательных бактерий.

Особый интерес представляет семейство дефенсин-подобных АМП, впервые обнаруженное у пескожила *Arenicola marina*. Ближайшими гомологами этих пептидов по расположению остатков цистеина являются хитин-связывающие растительные АМП семейства гевеинов, обладающие противогрибковой активностью. Биологические свойства пептидов данного семейства были изучены на примере пептида AmBRI-44a, стабилизированного 4 дисульфидными связями. Пептид демонстрирует специфическое действие в отношении грамположительных бактерий родов *Bacillus* и *Mycobacterium*. Примечательно, что его эффективность значительно возрастает в среде без NaCl (в отношении *B. subtilis* В-886 в 8 раз, *B. licheniformis* В-511 – в 4 раза и *M. phlei* Ac-1291 – в 8 раз), что свидетельствует о влиянии электростатического отталкивания на взаимодействие между AmBRI-44a и клетками-мишенями. Кроме того, пептид проявляет активность против дрожжеподобных грибов *C. albicans* ATCC 18804 и ATCC 10231, но при относительно высоких значениях МИК (16 мкМ), что скорее всего указывает на его неспецифическое действие на мембраны эукариотических клеток. Для ряда дефенсин-подобных пептидов животного происхождения был описан подобный селективный эффект в отношении некоторых грамположительных бактерий наряду с неспецифической умеренной активностью в отношении различных эукариотических клеток. Исследование потенциальных токсических свойств AmBRI-44a показало сравнительно высокую гемолитическую активность, сопровождающуюся агглютинацией эритроцитов, но только при концентрации выше 64 мкМ. При этом AmBRI-44a, активность которого не снижается в присутствии сыворотки, не оказывал

цитотоксического действия на клетки НЕК293Т даже при концентрации 128 мкМ. Таким образом, данный пептид обладает умеренной цитотоксичностью в отношении клеток млекопитающих, но лишь при концентрациях, значительно превышающих МИК в отношении чувствительных к нему бактерий.

Данные, полученные в ходе изучения биологической активности обнаруженных семейств BRICHOS-ассоциированных АМП, подчеркивают важность биоразнообразия этих молекул для обеспечения эффективной защиты организма-хозяина от различных патогенов, включая обитателей природных экосистем.

Изучение механизма действия BRICHOS-ассоциированных АМП

Основной мишенью большинства природных АМП является бактериальная мембрана. При этом многие пептиды проявляют гемолитическую и/или цитотоксическую активность в отношении клеток млекопитающих, что порождает необходимость поиска и разработки более селективных соединений для минимизации побочных эффектов на клетки хозяина. Для изучения механизма действия обнаруженных АМП на бактерии была оценена их способность нарушать целостность цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p. Разрушение мембран бактериальных клеток детектировали с помощью хромогенного маркера о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (ONPG). Как показано на **Рисунке 2**, α -спиральные АМП обладают быстрым мембранолитическим действием, что приводит к полной пермеабиллизации клеточных мембран менее чем за 70 минут при концентрациях 4 \times МИК. Однако, высокая токсичность АМП в отношении эукариотических клеток свидетельствует об отсутствии избирательности действия, что ограничивает их системное применение.

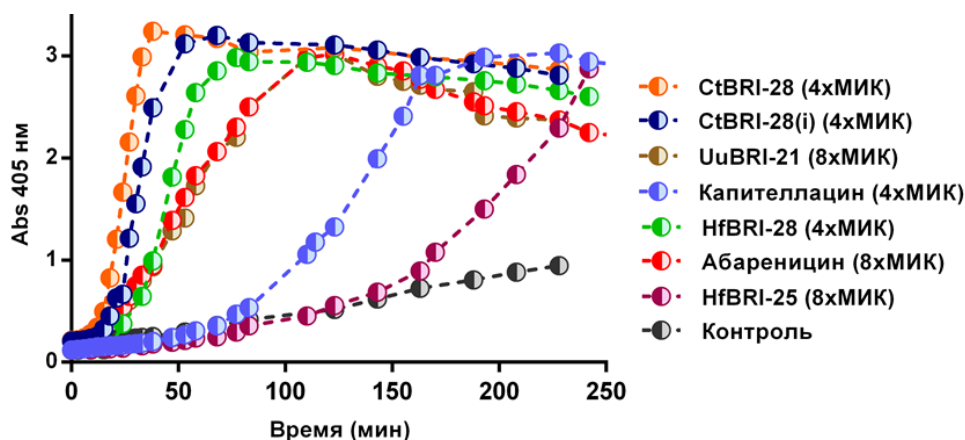


Рисунок 2. Изучение механизма действия обнаруженных АМП. Кинетика изменения проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p под действием пептидов (ONPG-тест)

Представители семейства β -шпилечных АМП также являются мембрано-активными соединениями, однако капителлацин и HfBRI-25 демонстрируют иную кинетику повреждения цитоплазматической мембраны. Электрохимические измерения в бислойных липидных мембранах (БЛМ), имитирующих мембрану *E. coli*, показали, что капителлацин вызывает лишь незначительное увеличение интегральной проводимости (до 2 нСм), в то время как тахиплезин-1 вызывает ее резкое повышение (до ~ 180 нСм), что сопровождается дестабилизацией мембраны (**Рисунок 3**). Эти данные свидетельствуют о различиях в механизме действия данных пептидов: капителлацин действует в соответствии с «ковровой» моделью, накапливаясь на поверхности мембраны, ослабляя взаимодействия внутри бислоя, что приводит к деформации последнего и последующему разрушению, тогда как тахиплезин-1 формирует поры, что соотносится с моделью «тороидальной поры». Кроме того, для

капителлацина и HfBRI-25 была показана низкая вероятность индукции стабильной резистентности *in vitro* у штамма *E. coli* MDR CI 1057, который характеризуется высокой частотой спонтанных мутаций. После 24 дней культивирования итоговые значения МИК пептидов увеличились всего в два раза. Это согласуется с гипотезой о том, что развитие резистентности к АМП, действующим на мембрану, маловероятно, поскольку для этого требуются значительные изменения в структуре и электрофизиологических свойствах клеточной мембраны, хотя не исключена вероятность того, что HfBRI-25 и капителлацин могут связываться с какими-либо мишенями, локализованными как на бактериальных мембранах, так и внутри клетки. Их низкая способность индуцировать стабильную резистентность в сочетании с медленной кинетикой нарушения целостности цитоплазматической мембраны указывает, скорее, на преобладание мембранотропного механизма действия. Принимая во внимание сходство механизмов действия капителлацина и HfBRI-25, можно предположить, что HfBRI-25 также обладает селективным мембранотропным эффектом в отношении *E. coli*, соответствующим «ковровой» модели.

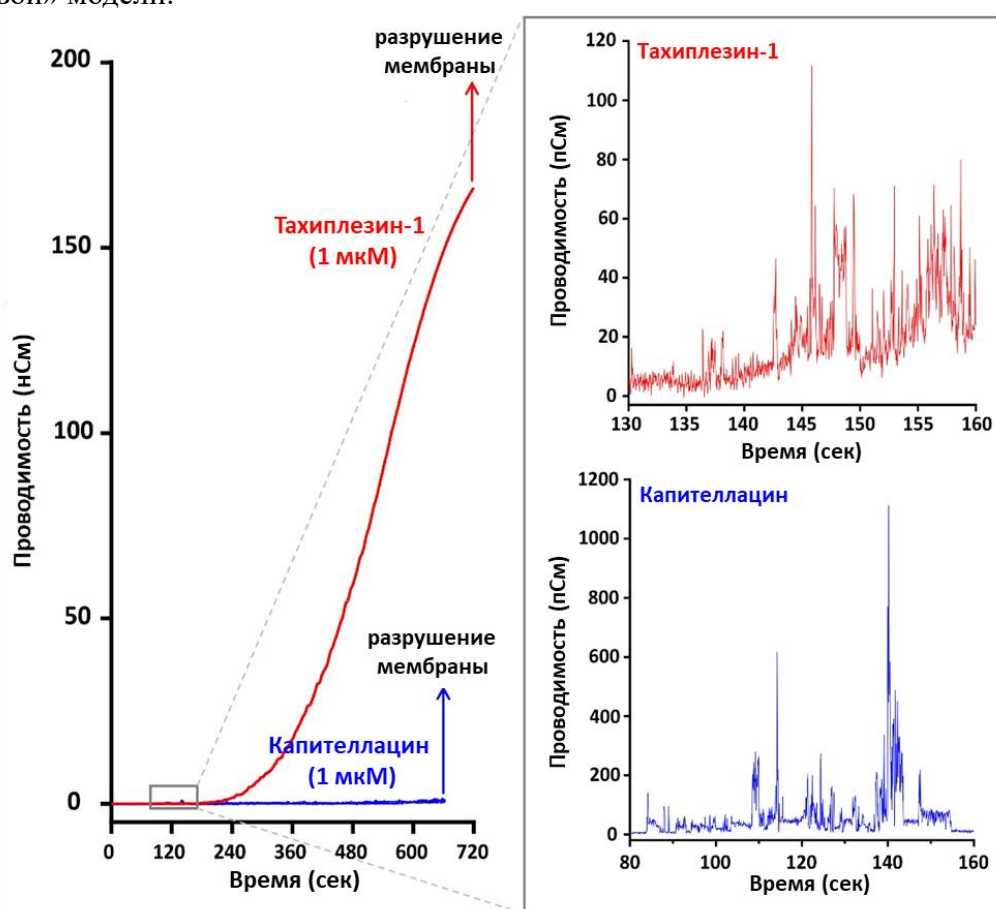


Рисунок 3. Изменения проводимости БЛМ [PE (фосфатидилэтаноламин), PG (фосфатидилглицерин), CL (кардиолипин) в соотношении 67:23,2:9,8 вес. %], вызванные добавлением тахиплезина-1 и капителлацина. Увеличенные записи одиночных колебаний проводимости, индуцированных пептидами, представлены на правой панели

Для изучения механизма действия AmBRI-44a, не связанного с нарушением целостности мембран грамположительных бактерий, был проведен эксперимент по селекции резистентных штаммов чувствительных к нему бактерий *B. licheniformis* B-511 (**Рисунок 4А**). После 30 пассажей был получен штамм с пониженной чувствительностью к пептиду (в 8 раз). Полногеномное секвенирование данного штамма с выравниванием на геном *B. licheniformis* B-511 выявило мутацию (R217S) в

цитоплазматическом домене НАМР гистидин-киназы WalK – ключевого белка двухкомпонентной системы WalK/WalR, регулирующей метаболизм клеточной стенки грамположительных бактерий. Маловероятно, что AmBRI-44a напрямую взаимодействует с WalK, так как молекулярная масса пептида превышает 5 кДа, что делает невозможным его проникновение через клеточную мембрану без ее повреждения. Однако, учитывая субмикромольное значение МИК пептида в отношении *B. licheniformis*, можно предположить, что его антибактериальное действие связано с взаимодействием с компонентами клеточной стенки, биосинтез которых регулируется белком WalK. Известно, что мутации в НАМР-доме белка WalK у *S. aureus* ассоциированы со снижением чувствительности к ванкомицину. В связи с этим, мы исследовали кросс-резистентность отобранного штамма *B. licheniformis* к антибиотикам, преимущественно действующим на грамположительные бактерии, а также к мембранолитическим АМП (Рисунок 4Б). Как и ожидалось, перекрёстная устойчивость (снижение МИК в 4 раза) была выявлена только к ванкомицину и низину, механизм действия которых основан на связывании с липидом II. Селективность пептида в отношении бактерий родов *Bacillus* и *Mycobacterium* может быть обусловлена особенностями структуры липида II, в частности заменой третьего аминокислотного остатка пентапептида на мезодиаминопимелиновую кислоту (мезо-ДАПК) вместо L-лизина, характерного для большинства грамположительных бактерий. Таким образом, выявленная мутация в НАМР-доме, связанная со снижением чувствительности к AmBRI-44a, ванкомицину и низину указывает на предположительный механизм действия пептида, заключающийся в ингибировании биосинтеза клеточной стенки.

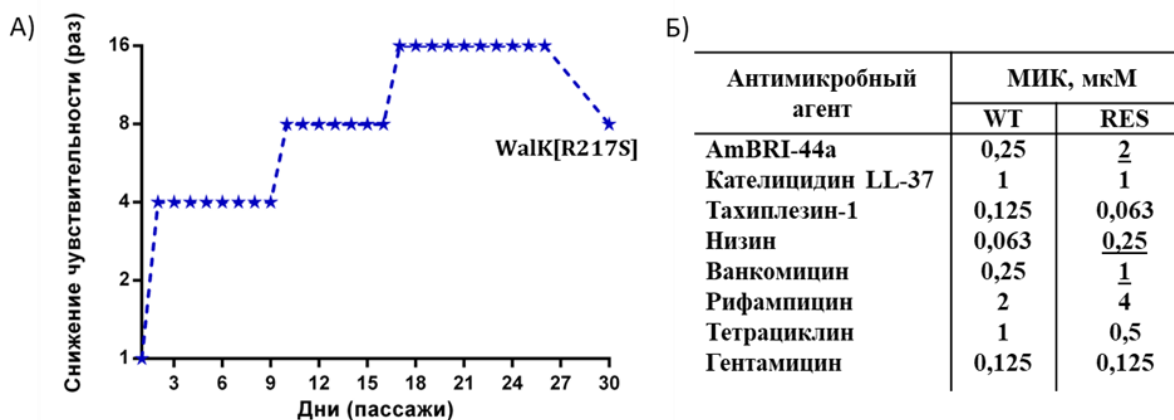


Рисунок 4. Изучение механизма действия пептида AmBRI-44a. А) Индукция резистентности бактерий *B. licheniformis* B-511 к пептиду AmBRI-44a. Б) Анализ перекрестной резистентности отобранного штамма *B. licheniformis* B-511 к конвенциональным антибиотикам и различным АМП

Рациональный дизайн BRICHOS-ассоциированных АМП

β -шпилечные АМП могут рассматриваться в качестве матриц для рационального дизайна пептидных антибиотиков благодаря их сравнительно высокой устойчивости к протеазам и быстрому бактерицидному эффекту. В ходе скрининга биологической активности обнаруженных АМП были отобраны β -шпилечные пептиды капителлацин и абареницин для рационального дизайна их аналогов. Для нетоксичного капителлацина была получена панель вариантов, которые сочетают структурные элементы природного пептида и высокоактивного АМП тахиплезина-1, с целью повышения его антибактериальной активности. В ходе поиска аналогов абареницина, обладающих сниженной цитотоксичностью, было проведено сканирование области β -поворота аланином и аргинином (Рисунок 5). Аналоги пептидов были получены

биотехнологическим путем в бактериальной системе экспрессии согласно описанной выше методике.

Капителлацин	-SPRV C IRV C RNGV C YRR C WG	Абареницин	GY C FTAC C YLRNGVRI C YRR C GN
CT2	R SPRV C IRV C RNGV C YRR C WG	Ap1	GY C FTAC A LRNGVRI C YRR C GN
CT3	-SPRV C IRV C RNGV C YRR C W-	Ap2	GY C FTAC R LRNGVRI C YRR C GN
CT4	---RV C IRV C RNGV C YRR C W-	Ap3	GY C FTAC Y ARNGVRI C YRR C GN
CT5	--- KW CIRV C RNGV C YRR C R-	Ap4	GY C FTAC Y RNGVRI C YRR C GN
CT6	---RV C F RV C RNGV C YRR C W-	Ap5	GY C FTAC C YLRNG A RI C YRR C GN
CT7	---RV C IRV C Y RGV C YRR C W-	Ap6	GY C FTAC C YLRNG R RI C YRR C GN
Тахиплезин-1	--- KW C FRV C C YRGI C YRR C R-	Ap7	GY C FTAC C YARNGV R A C YRR C GN
		Ap8	GY C FTAC C YARNGV R R C YRR C GN
		Ap9	GY C FTAC A RNGVRI C YRR C GN
		Ap10	GY C FTAC Y RNG A RI C YRR C GN
		Ap11	GY C FTAC A RNG A RI C YRR C GN
		AA139	G F C W Y V C A RRNGAR V CYRR C GN

Рисунок 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей капителлацина, абареницина, их модифицированных аналогов и известных АМП – тахиплезина-1 и АА139. Аминокислотные замены в структуре аналогов абареницина выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием. Жёлтым цветом обозначены остатки цистеина, которые образуют 2 дисульфидные связи в каждом АМП.

Для оптимизации свойств капителлацина были применены следующие подходы: а) изменение длины пептида (СТ2-СТ4); б) создание химерных вариантов пептида с использованием функционально значимых фрагментов тахиплезина-1, включая концевые (K1R, V2W, W17R), центральные (I4F) и β-поворотные (R8Y, N9R) участки; данные аналоги были обозначены как СТ5, СТ6 и СТ7, соответственно. В результате анализа биологической активности полученных соединений для ряда аналогов (СТ2, СТ4 и СТ6) было показано незначительное увеличение активности в отношении ключевых граммотрицательных патогенов группы ESKAPEE (**Рисунок 6**). В среднем, значения МИК удалось снизить в два раза, сохранив при этом селективность действия природного варианта. Аналог СТ7 продемонстрировал выраженное цитотоксическое действие на клетки млекопитающих, сопоставимое с тахиплезином-1, вызывая 50% лизис эритроцитов при концентрации 128 мкМ. Известно, что точечная замена аминокислот в области β-изгиба тахиплезина-1, например Y8S снижает его способность нарушать целостность мембран как бактериальных, так и эукариотических клеток. Это позволяет предположить, что относительно высокая гидрофильность участка β-изгиба капителлацина (R8, N9) определяет его низкую мембранотропную активность по сравнению с тахиплезином-1, в частности, низкое сродство к мембранам эритроцитов.

Пептид	Кап.	СТ2	СТ3	СТ4	СТ5	СТ6	СТ7	Тах.-1
СТ3	1	0,46	1,09	0,65	1	0,55	0,55	0,16
* Токсичность в отношении эукариотических клеток при 128 мкМ (%)								
* 0-10 10-20 20-30 30-40 40-50 50-60 60-70 70-80 80-90 90-100								
Эритроциты								
Характеристика рекомбинантных АМП								
Индекс GRAVY	-0,215	-0,419	-0,205	-0,388	-0,565	-0,188	0,041	-0,518
Выход (мг/мл)	6,1	5,5	5,1	5,2	5,1	6,4	4,6	7,2

Рисунок 6. Среднее геометрическое значений (СТЗ) МИК в отношении различных штаммов граммотрицательных бактерий и другие характеристики модифицированных аналогов капителлацина. Индекс гидрофобности Кайта-Дулитла (GRAVY) был рассчитан на портале ExPASy с помощью инструмента ProtParam

Для оценки влияния отдельных гидрофобных аминокислотных остатков на селективность и активность абареницина против грамотрицательных бактерий были проведены их независимые замены в области β -поворота. Показано, что модификации природного пептида, включающие замены Y8R (Ap2) и I15R (Ap8), приводят к значительному снижению активности по сравнению с исходным вариантом (**Рисунок 7**). В то же время, замена L9R, с одной стороны, привела к получению самого активного аналога Ap4 (снижение МИК в 3,5 раза), а с другой – к проявлению повышенной токсичности. С целью улучшения селективности и сохранения антибактериальных свойств аналога Ap4 были получены соединения на его основе, содержащие дополнительные замены. В качестве таких замен были выбраны Y8A и/или V13A, поскольку для соответствующих аналогов Ap1 и Ap5 было показано сохранение активности пептида дикого типа при значительном снижении цитотоксических эффектов. Как результат, снижение гидрофобности в позициях 8 (аналог Ap9) и 13 (аналог Ap10) привело к уменьшению антибактериальной активности по сравнению с Ap4, однако оба аналога демонстрировали эффективность, превышающую таковую у природного абареницина. Аналог Ap11, содержащий две дополнительные аминокислотные замены (Y8A, V13A), показал ещё более выраженное снижение антибактериального действия по сравнению с Ap4. Важно отметить, что введение дополнительных модификаций в структуру аналога Ap4 привело к созданию соединений с пониженной токсичностью и сходным с природным абареницином антибактериальным профилем. Кроме того, большинство полученных аналогов абареницина, за исключением Ap3, Ap4 и Ap10, продемонстрировали сравнительно низкую цитотоксичность в отношении клеток млекопитающих в условиях *in vitro*, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатных соединений для дальнейшего исследования их эффективности *in vivo*.

Пептид	Абар.	Ap1	Ap2	Ap3	Ap4	Ap5	Ap6	Ap7	Ap8	Ap9	Ap10	Ap11	AA139
ГЗ*	0,45	0,55	1,41	0,2	0,13	0,48	0,86	0,74	4,41	0,26	0,31	0,71	0,48
* Токсичность в отношении эукариотических клеток при 128 мкМ (%)													
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100			
Эритроциты													
Характеристика рекомбинантных АМП													
Индекс GRAVY	-0,157	-0,010	-0,310	-0,252	-0,552	-0,271	-0,571	-0,381	-0,681	-0,405	-0,667	-0,519	-0,429
Выход (мг/мл)	5,1	5,9	6,2	5,1	8,4	4,4	7,2	8,2	11,2	5,8	8,2	4,9	7,2

Рисунок 7. Среднее геометрическое значений (СГЗ) МИК в отношении различных штаммов грамотрицательных бактерий и другие характеристики аналогов абареницина. Индекс гидрофобности Кайта-Дулитла (GRAVY) был рассчитан на портале ExPASy с помощью инструмента ProtParam

Таким образом, в результате рационального дизайна β -шпилечных АМП были получены соединения с высокой активностью против ключевых грамотрицательных патогенов группы ESKAPEE. В частности, разработан аналог капителлацина СТ2 с повышенной антибактериальной активностью при сохранении избирательности действия природного пептида, а также ряд низкотоксичных и высокоактивных аналогов абареницина. Однако активность СТ2 уступает ряду модифицированных аналогов абареницина. С учетом полученных данных для дальнейших исследований, включая *in vivo* эксперименты, были отобраны: 1) наименее гидрофобные аналоги абареницина Ap9 и Ap11 с улучшенными свойствами; 2) UuBRI-21 – пептид с наименьшей гомологией

среди известных представителей семейства ареницинов; 3) HfBRI-25 – уникальный β-спилечный АМП с асимметричным расположением остатков цистеина, отличающим его от других известных пептидов данного класса. Этот пептид характеризуется природной низкой токсичностью и высокой активностью против бактерий *E. coli*, включая устойчивые к антибиотикам штаммы, в том числе при высокой концентрации сыворотки.

Определение стабильности природных АМП в сыворотке крови

В подавляющем числе случаев природные АМП подвержены быстрой протеолитической деградации, что представляет одно из ключевых препятствий для перехода к этапу *in vivo* исследований. Стабильность пептидов абареницина, HfBRI-25 и UuBRI-21, а также потенциальные сайты их протеолитического расщепления оценивали путём инкубации в свежесыворотке крови человека в течение 24 ч. По истечении каждого временного интервала продукты протеолиза пептидов анализировали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ и последующей МАЛДИ масс-спектрометрии. В качестве контроля использовали α-спиральный АМП буфорин 2, время полураспада которого составляет менее 5 минут в аналогичных условиях (**Рисунок 8**). Ввиду высокой степени связывания UuBRI-21 с компонентами сыворотки анализ продуктов его протеолиза оказался затруднительным.

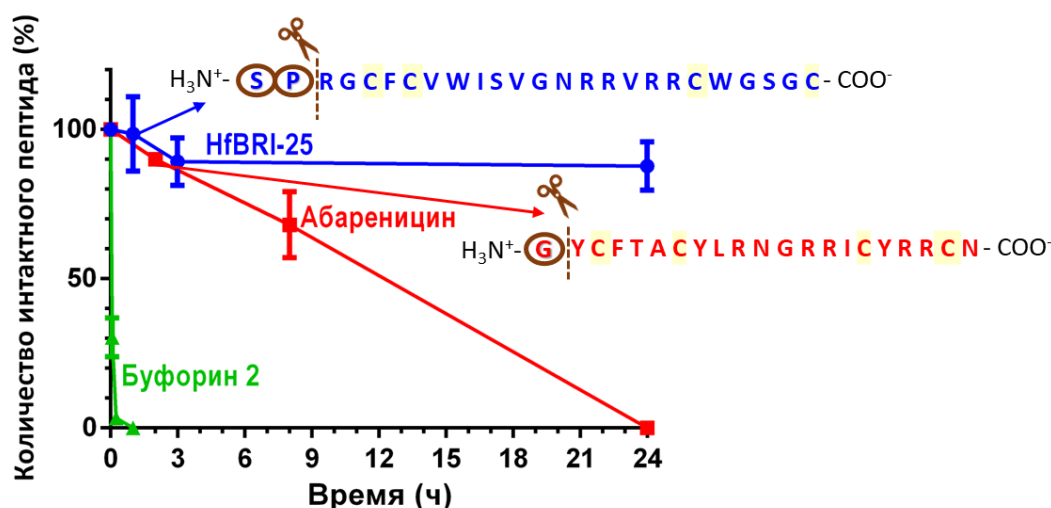


Рисунок 8. Стабильность АМП в сыворотке крови в течение 24 ч. Процентное содержание интактных пептидов в сыворотке крови. В случае с HfBRI-25 под интактным пептидом подразумевается неразделяемая на ОФ-ВЭЖХ смесь двух активных форм. Оценка количества интактных пептидов была произведена по площади соответствующих пиков на хроматограммах, полученных при разделении продуктов протеолиза с методом ОФ-ВЭЖХ и их детекции при 214 нм

В ходе эксперимента установлено, что более половины интактного HfBRI-25 превращается в сыворотке крови в укороченный вариант уже через 1 ч. Основным продуктом протеолитической деградации является пептид без N-концевого дипептида S-P. Продукт протеолиза HfBRI-25 был дополнительно очищен методом ОФ-ВЭЖХ, после чего проведена оценка его антибактериальной активности в отношении *E. coli*. Показано, что укороченный пептид обладает повышенной антибактериальной активностью против штаммов *E. coli* ML-35p или ATCC 25922 (МИК укороченного пептида HfBRI-25[3-25] – 0,5 мкМ; МИК интактного пептида HfBRI-25 – 1 мкМ). При этом более 80% обеих

активных форм сохраняли свою структурную целостность в сыворотке крови в течение 24 ч.

В отношении абареницина установлена высокая стабильность в первые 2 ч (более 90% молекул не подвергаются протеолизу). Однако впоследствии наблюдается отщепление N-концевого остатка глицина и накопление стабильной укороченной формы. Деградация пептида сопровождается снижением антибактериальной активности в 4 и 8 раз для штаммов *E. coli* ML-35p и *E. coli* ATCC 25922, соответственно. Эти данные подчеркивают важную роль N-концевого остатка глицина в проявлении высокой антибактериальной активности абареницина.

Таким образом, гидролиз HfBRI-25 и абареницина происходит за пределами дисульфидной связи, что может свидетельствовать о ключевом значении цистеинов в поддержании жесткости β -спилочной структуры и её устойчивости к действию сывороточных протеаз.

Эффективность АМП

Оценка *in vivo* активности гомологов ареницина-3 (Ap9, Ap11 и UuBRI-21) была проведена на мышинной модели летальной септицемии, вызванной вирулентным штаммом *E. coli* 3421 E/19 в сравнении с полимиксином В и референсным препаратом AA139. Согласно полученным данным Ap11 и UuBRI-21 не проявили антимикробного эффекта, тогда как пептид Ap9 обеспечивал 10^5 -кратное снижение обсеменённости крови и промывных вод брюшной полости, что сопоставимо с действием полимиксина В и AA139 (Рисунок 9).

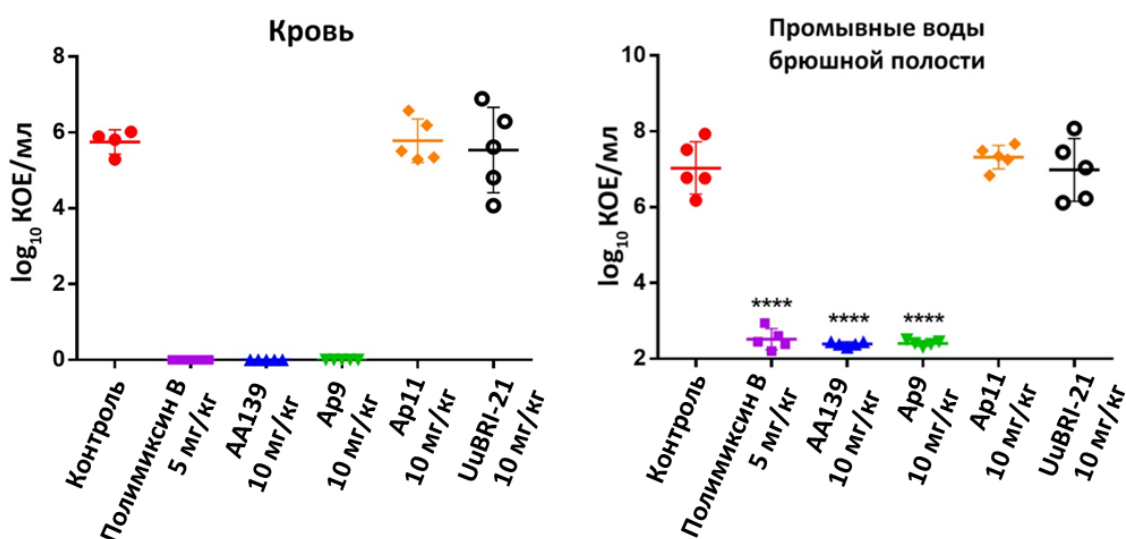


Рисунок 9. Эффективность противоионфекционного действия АМП на мышах (совместное исследование проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора). Среднее количество вирулентного штамма бактерии *E. coli* 3421 E/19 в крови и промывных водах брюшной полости мышей линии BALB/c (n=5 в каждой группе) в КОЕ/мл через 6 ч после заражения и 5 ч после однократного внутривенного введения АМП и полимиксина В.

Минимальная эффективная доза Ap9 против бактерий *E. coli* 3421E/19 составила 1 мг/кг (данные не приведены). Примечательно, что пептид Ap11, обладающий схожими структурными модификациями и *in vitro* активностью с AA139 и Ap9, оказался неэффективным на данной модели, что подчеркивает важность скрининга перспективных пептидных соединений на небольших группах животных перед проведением доклинических испытаний. Отсутствие активности UuBRI-21, вероятно,

обусловлено его значительной степенью инактивации в связи со склонностью взаимодействовать с компонентами сыворотки.

Оценка эффективности пептида HfBRI-25 *in vivo* была проведена на модели септицемии у мышей, вызванной заражением штаммом *E. coli* ATCC 25922, в сравнении с ципрофлоксацином и AA139 (Рисунок 10А). Введение данного пептида обеспечивало 100% выживаемость инфицированных животных, тогда как AA139 позволил достичь выживаемости на уровне 87,5%. Также с использованием данной модели был исследован пептид Ap9, который обеспечил 100% выживаемость. Полученные результаты подтверждают перспективность как природных, так и модифицированных β-спилечных АМП для терапии инфекций, вызванных грамотрицательными патогенами на примере *E. coli*.

С учетом растущей распространенности уропатогенных штаммов *E. coli*, в том числе несущих ген *mcr-1*, была исследована активность Ap9 против полимиксин-устойчивого штамма *E. coli* U10 из коллекции ГНЦ ПМБ. Двукратное введение Ap9 обеспечивало 100% выживаемость при дозах 10 и 5 мг/кг, а при 2,5 мг/кг защищало от гибели 80% животных (Рисунок 10Б). Как и ожидалось, полимиксин В оказывал менее выраженный лечебный эффект на данной модели: при 2,5 мг/кг выжили только 40% мышей.

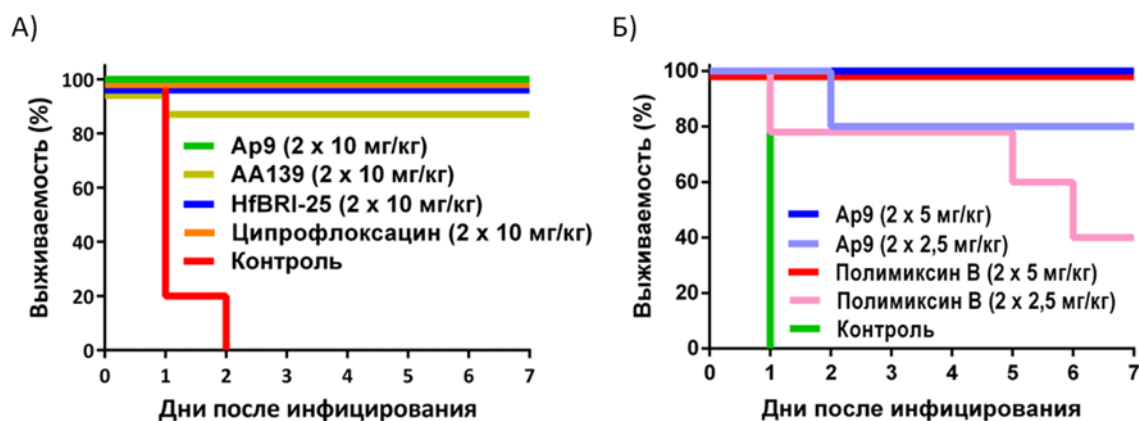


Рисунок 10. Эффективность противоионфекционного действия АМП на мышах (совместное исследование проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

А) Выживаемость мышей линии BALB/c (n=8) при лечении летальной инфекции, вызываемой *E. coli* ATCC 25922, при внутривенном введении АМП и ципрофлоксацина.

Б) Терапевтическое действие Ap9 и полимиксина В при лечении инфекции у мышей линии BALB/c (n=5), вызываемой летальной дозой уропатогенного полимиксин-устойчивого штамма *E. coli* U10 (*mcr-1*-опосредованная устойчивость)

Учитывая высокую *in vitro* активность Ap9 в отношении различных представителей ESKAPEE группы было принято решение оценить его эффективность в отношении бактерий *P. aeruginosa* PAO1. Было показано, что в условиях *in vitro* Ap9 более эффективно действует как на планктонную культуру этого штамма, так и на его зрелые биопленки по сравнению с полимиксином В (графические данные не приведены). Активность Ap9 *in vivo* была исследована на модели летальной септицемии, обусловленной внутрибрюшинным заражением культурой *P. aeruginosa*. Установлено, что выраженный терапевтический эффект наблюдался только при введении максимальной дозы Ap9 – 16 мг/кг (Рисунок 11А). Далее была проведена оценка выживаемости мышей на аналогичной модели синегнойной инфекции при лечении пептидом Ap9. Полученные результаты демонстрируют, что трёхкратное введение пептида по 15 мг/кг обеспечивало 100% выживаемость животных (Рисунок 11Б). При этом у мышей из экспериментальной группы после введения Ap9 не наблюдались

видимые признаки интоксикации. При исследовании острой токсичности Ар9 при внутривенном введении мышам ICR в дозе 15 мг/кг не было выявлено изменений в поведенческих реакциях, относительной массе органов, а также их внешних и гистологических изменений как в течение 24 ч, так и спустя две недели (исследование проведено в Лаборатории биологических испытаний (ЛБИ) ФИБХ РАН). Кроме того, двукратное введение Ар9 внутривенно беспородным мышам в дозе 20 мг/кг также не вызывало токсических эффектов.

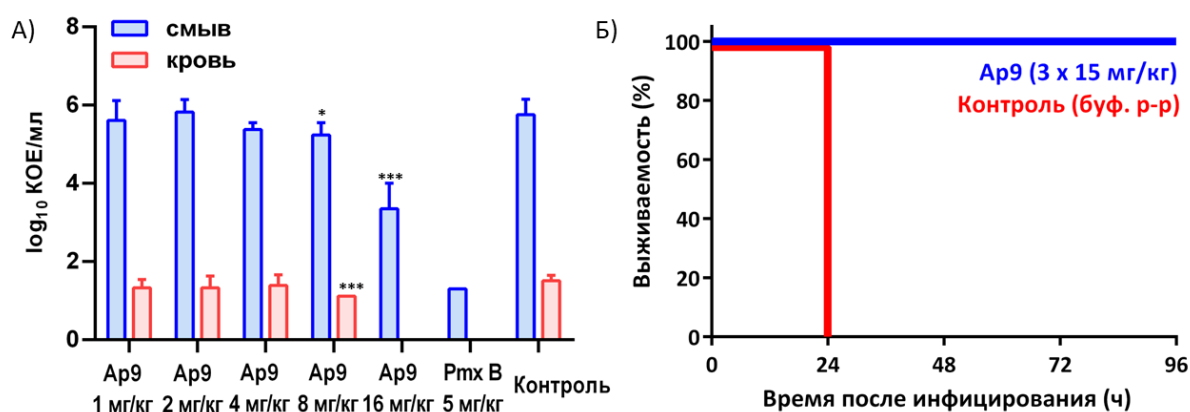


Рисунок 11. Изучение фармакокинетики Ар9 и его терапевтического потенциала при лечении инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. А) Эффективность *in vivo* Ар9 при лечении перитонита у мышей линии BALB/c (n=5) через 6 ч после внутривенного заражения штаммом *P. aeruginosa* PAO1. Б) Выживаемость мышей линии BALB/c (n=5) при лечении пептидом Ар9 летальной инфекции, вызываемой заражением штаммом *P. aeruginosa* PAO1.

Фармакокинетическое исследование Ар9 у крыс SD при внутримышечном введении в дозе 1 мг/кг показало, что период его полувыведения составил 115,4 мин, а площадь под кривой (AUC) – 180,4 мг·мин/л (данные не приведены), что соотносится с полученными данными в условиях *in vitro*. Таким образом, Ар9 демонстрирует высокую эффективность на экспериментальных моделях бактериальных инфекций и может представлять перспективную низкотоксичную альтернативу полимиксидам, относящимся к препаратам резервной линии.

Исследование механизма действия Ар9

Ар9, обладая повышенной селективностью, демонстрирует отличный от природного АМП абареницина механизм действия. Согласно результатам, полученным в ONPG-тесте на бактериях *E. coli*, Ар9 не проявляет выраженных детергент-подобных свойств при концентрациях до 1 мкМ (8×МИК), а нарушение целостности цитоплазматической мембраны бактерий наблюдается лишь при превышении этого порога (**Рисунок 12А**). Эти данные подтверждаются изображениями поверхности клеток *E. coli*, полученных методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (**Рисунок 12Б**).

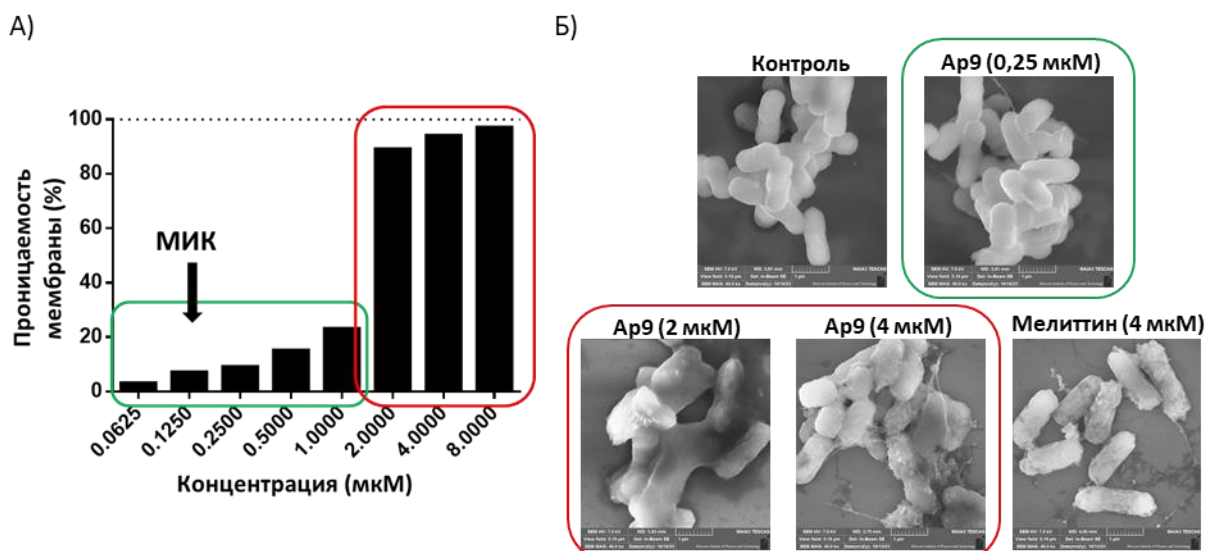


Рисунок 12. Изучение механизма действия Ar9. А) Анализ нарушения целостности цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35r под действием Ar9 (ONPG-тест) в течение 3 ч. 100% лизис обеспечивался действием мелиттина при концентрации 8 мкМ. Б) Изучение действия пептида Ar9 на клетки *E. coli* ML-35r методом сканирующей электронной микроскопии (исследование проведено совместно с Лабораторией биохимических исследований канцерогенеза ФБМФ МФТИ)

Кроме того, результаты экспериментов на бислойных липидных мембранах, моделирующих отрицательно заряженную мембрану *E. coli*, показывают, что при действии пептида Ar9 в концентрации 1 мкМ формируются поры с варьирующимся радиусом и временем жизни. Эти поры не являются долгоживущими и постепенно закрываются ввиду снижения дисбаланса латерального давления и натяжения в монослоях мембраны в процессе их формирования. Однако при увеличении концентрации пептида до 4 мкМ наблюдаются скачки проводимости мембраны, затем значение проводимости резко возрастает, что свидетельствует об интенсивном формировании пептид-липидных пор, что в конечном итоге приводит к разрушению липидного бислоя (**Рисунок 13А**).

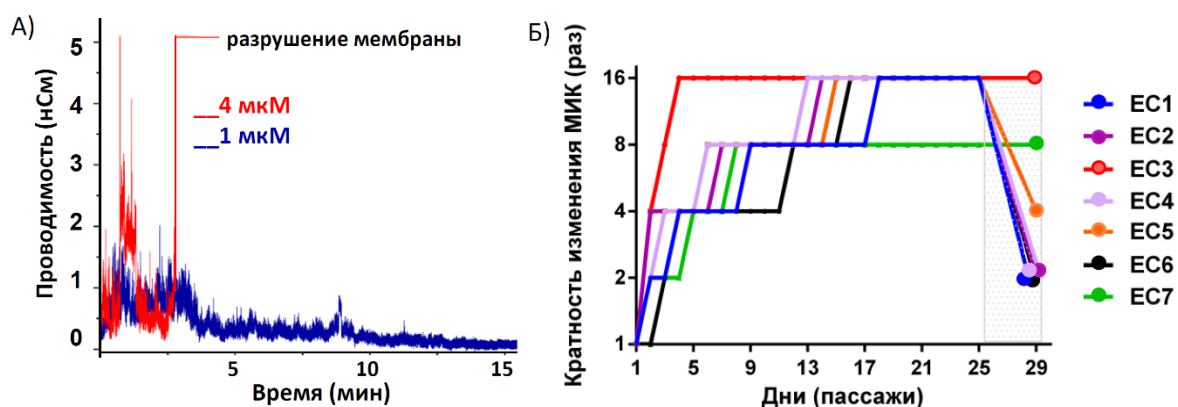


Рисунок 13. Изучение механизма действия Ar9. А) Измерение кинетики проводимости БЛМ [РС (фосфатидилхолин), PE (фосфатидилэтаноламин), PG (фосфатидилглицерин), кардиолипин (CL) в соотношении 35:35:20:10 мол. %] при действии пептида Ar9 в концентрациях 1 или 4 мкМ (эксперимент выполнен коллегами из Лаборатории биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН). Б) Индукция резистентности бактерий *E. coli* MDR CI 1057 к пептиду Ar9 (начальное значение МИК 0,125 мкМ, среда МН с добавлением 0,9% NaCl).

В совокупности, полученные данные указывают на вероятный мембранотропный механизм действия Ар9 в отношении грамотрицательных бактерий, связанный с деполаризацией мембраны без её полного разрушения и формирования стабильных пор при концентрациях пептида, близких к МИК. С целью более детального изучения механизма действия пептида Ар9 и анализа возможности развития бактериальной резистентности была проведена селекция устойчивых к пептиду клонов *E. coli* MDR CI 1057 в 7 независимых повторностях (**Рисунок 13Б**). В ходе эксперимента были отобраны 3 резистентных штамма, характеризующиеся сниженной чувствительностью к пептиду: ЕС3 (в 16 раз), ЕС5 (увеличение МИК в 2-4 раз) и ЕС7 (увеличение МИК в 8 раз). Мутации в геномах полученных резистентных штаммов были выявлены путём полногеномного секвенирования, результаты которого приведены на **Рисунке 14А**. Обнаружено, что штамм ЕС3 обладает сниженной скоростью роста и способностью формировать биопленки по сравнению с диким типом, а также повышенной чувствительностью к детергентам, желчным кислотам и рифампицину (**Рисунок 14Б, 14В, 14Г**), что в совокупности может свести к минимуму его жизнеспособность и вирулентность. У данного штамма был выявлен ряд мутаций в генах *serS*, *miaD*, *miaA*. Стоит отметить, что точечные мутации в гене *serS*, кодирующем серил-тРНК-лигазу, возникают в условиях длительного селекционного отбора, что снижает вероятность их ключевой роли в развитии резистентности к пептиду Ар9. Мутация, приводящая к инактивации гена, кодирующего белок MiaD, была обнаружена в штамме ЕС5 и, по-видимому, не оказывает значимого влияния на физиологию клеток, однако всё же снижает чувствительность штамма к пептиду Ар9 в 2-4 раза. В то же время известно, что обнаруженные делеции в первой спирали белка MiaA (N41, F42) приводят к избыточному накоплению фосфолипидов во внешнем слое наружной мембраны, что, вероятно, приводит к снижению эффективности взаимодействия Ар9 с поверхностью клетки. Кроме того, потенциальное снижение чувствительности грамотрицательных бактерий к пептиду Ар9 может быть связано с изменением процесса биогенеза внешней мембраны (штамм ЕС7), в частности, с мутацией в жизненно важном для бактерий трансмембранном белке LptD, осуществляющим заключительный этап переноса синтезированного липополисахарида (ЛПС) из периплазматического пространства к внешнему слою наружной мембраны. Данные по скринингу активности различных АМП выявили перекрестную резистентность штамма ЕС7 к β -шпилечному АМП танатину, для которого ранее была показана способность связываться с белками LptA и LptD, входящими в состав Lpt-комплекса. Благодаря своей локализации на внешней мембране грамотрицательных бактерий и доступности для взаимодействия с пептидом Ар9 белок LptD может рассматриваться в качестве потенциальной мишени его антибактериального действия.

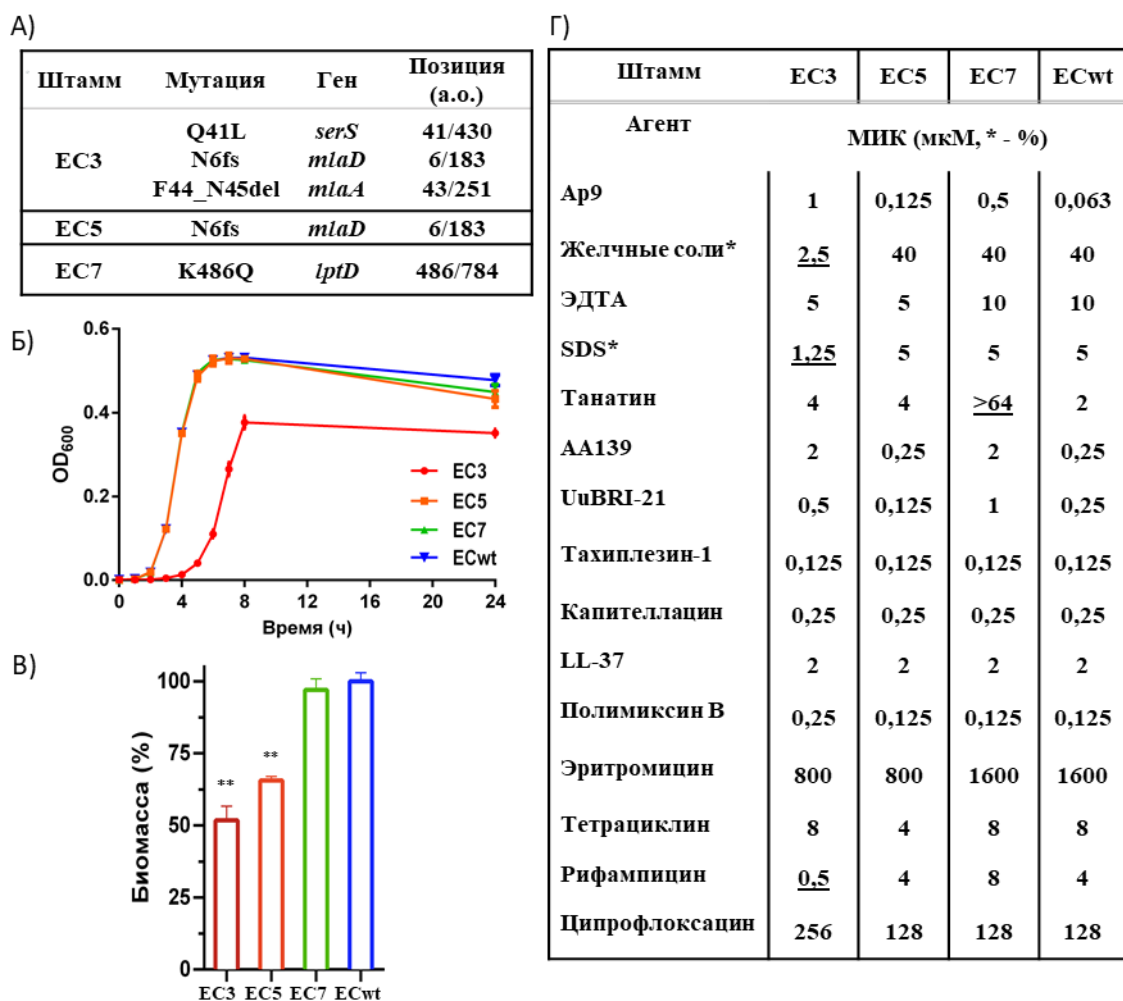


Рисунок 14. Анализ резистентных штаммов *E. coli* MDR CI 1057 к пептиду Ар9.

А) Выявленные мутации, ассоциированные с резистентностью отобранных штаммов. Б) Сравнительный анализ скорости роста резистентных штаммов. В) Оценка биомассы биопленок, формируемых резистентными штаммами (окрашивание 0,1% кристаллическим фиолетовым). Г) Изучение кросс-резистентности отобранных штаммов к различным АМП, антибиотикам и детергентам

Для проверки этой гипотезы было исследовано взаимодействие Ар9 с белком LptD методом микротермофореза, при котором одна из молекул должна содержать флуоресцентную метку. Учитывая, что точечные модификации могут существенно изменять структуру и биологические свойства АМП, флуоресцентное мечение пептида Ар9 могло бы повлиять на его взаимодействие с мишенью. В связи с этим было принято решение ввести флуоресцентную метку в белок LptD. Важно отметить, что его нативная конформация формируется исключительно при участии липопротеина LptE, который способствует образованию уникальной структуры «barrel and plug», необходимой для транспорта и встраивания ЛПС в наружный слой внешней мембраны. С учетом этого, была проведена коэкспрессия в клетках *E. coli* гена *lptD* и гена *lptE*, слитого с геном зеленого флуоресцентного белка (*sfGFP*) и His-меткой. Полученный комплекс выделяли из клеточного лизата с применением детергентов, разрушающих как внутреннюю, так и наружную мембрану, в том числе N-лаурилсаркозин натрия (SLS), оксид лаурилдиметиламина (LDAO) и октил-н-бета-D-глюкопиранозида (OG). Чистоту фракций на каждой стадии очистки анализировали методом вестерн-блоттинга (Рисунок 15А). Наличие комплекса LptD/LptE-GFP-His в элюате после металлохелатной

хроматографии было подтверждено методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) и масс-спектрометрией (**Рисунок 15Б**).

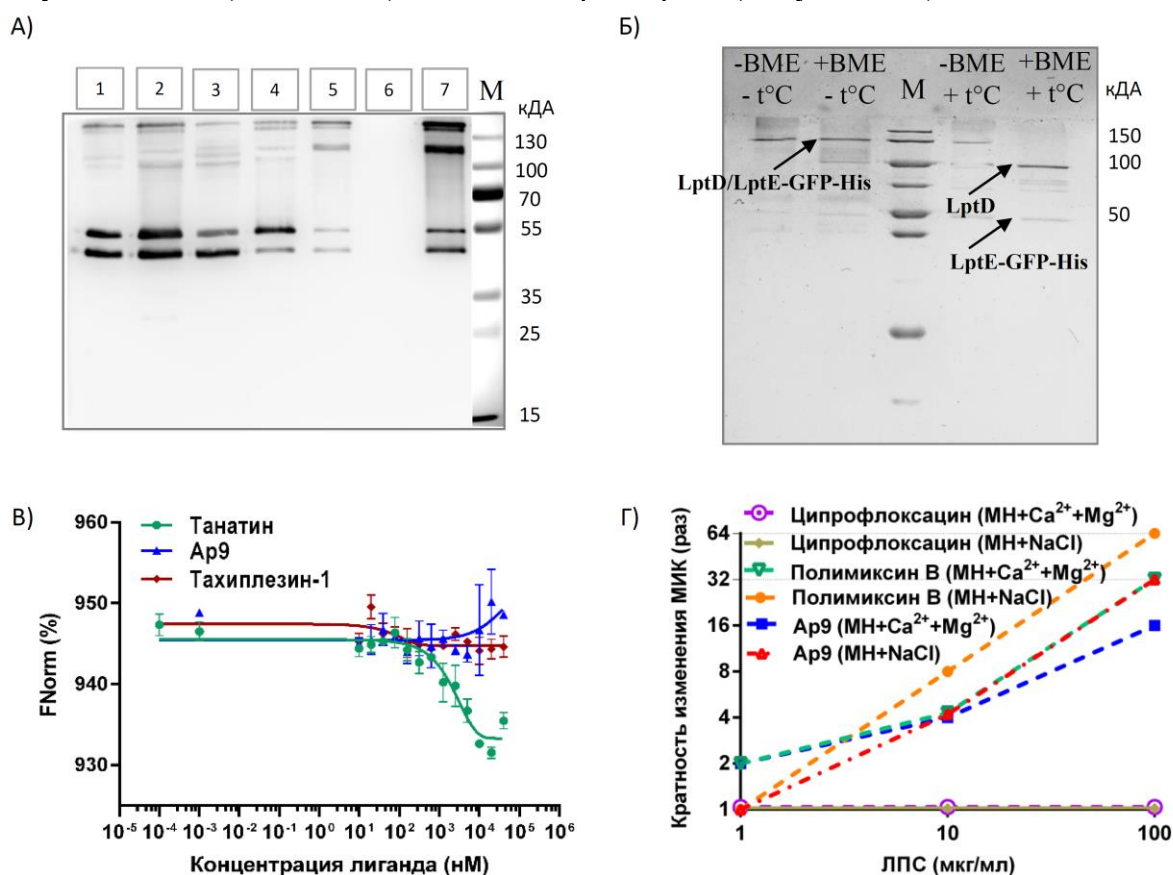


Рисунок 15. Изучение механизма действия Ap9. А) Вестерн-блот анализ фракций с использованием анти-His-tag антител: (1) клеточный лизат, (2) осадок после обработки SLS, (3) супернатант, (4) осадок, ресуспендированный в LDAO, (5) смесь, нанесённая на колонку, (6) проскок, (7) элюат. SDS-PAGE проводился без нагревания и в присутствии β-меркаптоэтанола, Б) SDS-PAGE очищенного комплекса (окрашивание с помощью Кумасси), проведенный в различных условиях: без нагрева, с нагреванием, а также в присутствии или в отсутствие восстанавливающего агента. В) Кривые зависимости "доза-ответ", отражающие аффинность взаимодействия между танатином, Ap9, тахиплезин-1 и комплексом LptD/LptE-GFP-His. Концентрации пептидов (лигандов) варьировались в диапазоне от 40 мкМ до 1 нМ, в то время как концентрация комплекса была постоянной и составляла 300 нМ. Г) Активность пептида Ap9, полимиксина В и ципрофлоксацина в присутствии ЛПС против *E. coli* ML-35r. Начальные значения МИК пептида Ap9 и полимиксина В составляют 0,125 мкМ, ципрофлоксацина – 0,063 мкМ

При количественном анализе связывания методом микротермофореза было показано, что пептид Ap9 не обладает сродством к полученному комплексу даже при концентрациях, существенно превышающих МИК (**Рисунок 15В**). В то же время, контрольный пептид сравнения танатин (МИК в отношении *E. coli* 2 мкМ) демонстрировал аффинность к комплексу LptD/LptE-GFP-His в микромолярном диапазоне ($K_d=1,893 \pm 0,753$ мкМ). На основе этих данных было высказано предположение, что мутация в белке LptD может влиять на активность пептида Ap9 путём изменения процесса биосинтеза ЛПС, а сам пептид взаимодействует непосредственно с ЛПС. Для подтверждения этого тезиса была изучена активность пептида в отношении *E. coli* ML-35r в присутствии ЛПС. Исследование проводилось в двух типах сред: одна содержала 0,9% NaCl, а другая – двухвалентные катионы,

способствующие формированию сильных латеральных взаимодействий между молекулами ЛПС, что повышает барьерные свойства наружной мембраны. В качестве положительного контроля использовали полимиксин В, для которого известно высокое сродство к ЛПС, а в качестве отрицательного – ципрофлоксацин, ингибирующий ДНК-гиразу / топоизомеразу. Результаты, представленные на **Рисунке 15Г**, показывают, что активность Ар9 и полимиксина В значительно снижается в обеих тестовых средах, что свидетельствует о высокой и сопоставимой способности этих соединений связываться с ЛПС. Таким образом, пептид Ар9 демонстрирует антибактериальное действие, схожее с полимиксином В, однако проявляет принципиально иной характер взаимодействия с ЛПС, что препятствует развитию кросс-резистентности.

Выводы

1. Анализ транскриптомов морских полихет показал, что BRICHOS-домен является универсальным фрагментом белков-предшественников защитных пептидов, среди которых обнаружены: а) β -шпилечные АМП, стабилизированные дисульфидными связями; б) α -спиральные АМП, в том числе содержащие «Rapa-box»; в) дефенсин-подобные АМП, стабилизированные 4 дисульфидными связями.
2. Разработан биотехнологический способ получения в бактериальных системах экспрессии рекомбинантных аналогов представителей обнаруженных семейств АМП.
3. Показано, что β -шпилечные АМП капителлацин и HfBRI-25 проявляют селективное мембранотропное действие в отношении *E. coli*, соответствующее «ковровой» модели. Все α -спиральные АМП демонстрируют высокую активность в отношении грамположительных бактерий, но при этом нарушают целостность мембран эукариотических клеток. Для дефенсин-подобного АМП AmBRI-44a получены данные, указывающие на вероятное ингибирование биосинтеза клеточной стенки грамположительных бактерий.
4. Установлено, что представители семейства β -шпилечных АМП, в частности, абареницин, наиболее активны в отношении ключевых патогенов ESKAPEE-группы, но при этом проявляют сравнительно высокую цитотоксичность. Получен ряд модифицированных аналогов на его основе, скрининг которых позволил выявить пептид Ар9, обладающий повышенным терапевтическим индексом по сравнению с природным пептидом. Показано, что механизм действия Ар9, вероятно, связан с высокой аффинностью к липополисахариду и образованием селективных пор. Пептид действует подобно полимиксину В, однако, по-видимому, имеет иные сайты связывания, что препятствует возникновению кросс-резистентности. Эксперименты по отбору бактерий, устойчивых к пептиду Ар9, показали низкую вероятность развития резистентности. Установлено, что потенциальное снижение чувствительности клеток может быть связано с достаточно редкими мутациями в эссенциальном компоненте Lpt-комплекса – белке LptD или делециями в компоненте Mla-комплекса – белке MlaA.
5. Эффективность антимикробного действия природных β -шпилечных АМП подтверждена на примере пептида HfBRI-25 на экспериментальной летальной модели мышей, зараженных *E. coli*. Терапевтическая эффективность пептида Ар9 показана на различных моделях бактериальных инфекций у мышей, инфицированных ESKAPEE-патогенами. Максимальная специфичность *in vivo* наблюдается при действии препарата на *E. coli* (минимальная эффективная доза – 1 мг/кг). Показано, что введение пептида Ар9 мышам, зараженным уропатогенным штаммом с *mcr-1*-опосредованной устойчивостью к полимиксинам, приводит к 100% выживаемости экспериментальных животных.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи:

1. **Safronova V. N.**, Panteleev P. V., Kruglikov R. N., Bolosov I. A., Finkina E. I., Ovchinnikova T. V. Novel BRICHOS-related Defensin-like Antimicrobial Peptide from the Marine Polychaeta *Arenicola marina* // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2024. – Т. 50. – №. 3. – С. 629-643. doi: 10.1134/S1068162024030087.
2. Mironov P. A., Paramonov A. S., Reznikova O. V., **Safronova V. N.**, Panteleev P. V., Bolosov I. A., Ovchinnikova T. V., Shenkarev Z. O. Dimerization of the β -Hairpin Membrane-Active Cationic Antimicrobial Peptide Capitellacin from Marine Polychaeta: An NMR Structural and Thermodynamic Study // Biomolecules. – 2024. – Т. 14. – №. 3. – С. 332. doi: 10.3390/biom14030332.
3. Panteleev P. V., **Safronova V. N.**, Duan S., Komlev A. S., Bolosov I. A., Kruglikov R. N., Kombarova T. I., Korobova O. V., Pereskokova E. S., Borzilov A. I., Dyachenko I. A., Shamova O. V., Huang Y., Shi, Q., Ovchinnikova T. V. Novel BRICHOS-Related Antimicrobial Peptides from the Marine Worm *Heteromastus filiformis*: Transcriptome Mining, Synthesis, Biological Activities, and Therapeutic Potential // Marine Drugs. – 2023. – Т. 21. – №. 12. – С. 639. doi: 10.3390/md21120639.
4. **Safronova V. N.**, Bolosov I. A., Panteleev P. V., Balandin S. V., Ovchinnikova T. V. Therapeutic Potential and Prospects of Application of Peptides in the Era of the Global Spread of Antibiotic Resistance // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2023. – Т. 49. – №. 3. – С. 435-447. doi: 10.1134/S1068162023030172.
5. **Safronova V. N.**, Bolosov I. A., Kruglikov R. N., Korobova O. V., Pereskokova E. S., Borzilov A. I., Panteleev P. V., Ovchinnikova, T. V. Novel β -Hairpin Peptide from Marine Polychaeta with a High Efficacy against Gram-Negative Pathogens // Marine Drugs. – 2022. – Т. 20. – №. 8. – С. 517. doi: 10.3390/md20080517.
6. **Safronova V. N.**, Panteleev P. V., Sukhanov S. V., Toropygin I. Y., Bolosov I. A., Ovchinnikova T. V. Mechanism of Action and Therapeutic Potential of the β -Hairpin Antimicrobial Peptide Capitellacin from the Marine Polychaeta *Capitella teleta* // Marine drugs. – 2022. – Т. 20. – №. 3. – С. 167. doi: 10.3390/md20030167.
7. Panteleev P. V., Tsarev A. V., **Safronova V. N.**, Reznikova O. V., Bolosov I. A., Sychev S. V., Shenkarev Z. O., Ovchinnikova T. V. Structure Elucidation and Functional Studies of a Novel β -Hairpin Antimicrobial Peptide from the Marine Polychaeta *Capitella teleta* // Marine drugs. – 2020. – Т. 18. №. 12. – С. 620. doi: 10.3390/md18120620.

Патент:

1. Бета-шпилечный пептид, обладающий антимикробной активностью в отношении бактерий с множественной лекарственной устойчивостью Пантелеев П. В., **Сафронова В. Н.**, Болосов И. А., Овчинникова Т. В. // Патент на изобретение № 2812977. Дата регистрации 06.02.2024 г.

Тезисы докладов:

1. **Safronova V. N.**, Panteleev P. V., Ovchinnikova T.V. Biodiversity and Therapeutic Potential of BRICHOS Domain-Related Antimicrobial Peptides from Marine Polychaeta // International Conference «Antimicrobial Peptides as Prototypes of Novel Antibiotics». СПб., 19-20 июля 2023. – С. 37-38.
2. **Сафронова В. Н.**, Пантелеев П. В., Овчинникова Т. В. Изучение биоразнообразия BRICHOS-ассоциированных антимикробных пептидов из морских полихет // XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». М., 8-11 февр. 2022 – С. 34.

3. **Сафронова В.Н.**, Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. Изучение аналогов BRICHOS-ассоциированного антимикробного пептида капителлаина из морской полихеты *Capitella teleta* // XXXIII Международная зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». М., 8-11 февр. 2021. – С. 36.
4. **Safronova V. N.**, Panteleev P. V., Bolosov I. A., Ovchinnikova T. V. Study of Biodiversity of β -Hairpin Antimicrobial Peptides from Marine Polychaeta // The 45th FEBS Congress “Molecules of life: Towards new horizons”. Ljubljana, Slovenia, 3-8 July 2021. – С. 313. doi: 10.1002/2211-5463.13205
5. **Сафронова В. Н.**, Пантелеев П. В. Овчинникова Т. В. Антибиоплёночная активность β -шпилечных антимикробных пептидов из морских полихет // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 26-29 окт. 2021. – С. 171-173 doi: 10.37747/2312-640X-2021-19-171-173.
6. **Сафронова В. Н.**, Кругликов Р. Н., Овчинникова Т. В., Пантелеев П. В. Новое семейство пролин-богатых антимикробных пептидов, ингибирующих трансляцию у бактерий // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 26-29 окт. 2021. – С. 173-174. doi:10.37747/2312-640X-2021-19-173-174.
7. **Сафронова В. Н.**, Пантелеев П. В., Болосов И. А., Сычев С. В., Овчинникова Т. В. Новые β -шпилечные антимикробные пептиды из морских полихет // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М., 28-30 окт. 2020. Сб. материалов, вып. 18, – С. 209-210. doi: 10.37747/2312-640X-2020-18-209-210.