

На правах рукописи

Болосов Илья Александрович

**ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И СОВМЕСТНОГО
ДЕЙСТВИЯ КАТЕЛИЦИДИНОВ КИТОПАРНОКОПЫТНЫХ**

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 «25» 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.

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 и 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

Одной из значимых проблем современной медицины является рост числа инфекционных заболеваний, имеющих резистентность к одной или нескольким ключевым группам антибактериальных препаратов. После появления колистин-устойчивых патогенов, в клинической практике не осталось антибиотиков, эффективных против любых резистентных бактериальных штаммов. Зарегистрированы случаи появления штаммов, проявляющих устойчивость одновременно ко всем ключевым группам антибиотических агентов. Особенно часто резистентность к антибактериальным препаратам опосредована так называемыми внутрибольничными инфекциями (ВБИ).

Особенно остро проблема сопутствующих ВБИ проявляется во время массовых эпидемий, значительно повышающих нагрузку на стационары в системе здравоохранения. Наиболее высока доля заражений ВБИ в тех случаях, когда требуются интубации и инвазивная вентиляция легких. Было показано, что при лечении тяжелых респираторных заболеваний, таких как грипп или коронавирусная инфекция COVID-19, доля пациентов с сопутствующими бактериальными инфекциями значительно возрастает – с 3-8% зараженных на момент поступления в стационар до 18-33% к моменту попадания в отделение интенсивной терапии. При этом более 50% смертельных случаев при терапии вирусных респираторных заболеваний связаны с заражением ВБИ. Одним из актуальных направлений в борьбе с сопутствующими бактериальными инфекциями является поиск принципиально новых антимикробных агентов широкого спектра действий. Среди кандидатов особого внимания заслуживают препараты, полученные на основе антимикробных пептидов (АМП) – пептидных факторов системы врожденного иммунитета различных организмов. Препараты на основе АМП имеют ряд преимуществ относительно классических антибиотиков. Ключевым преимуществом АМП считается способность эффективно уничтожать резистентные к классическим антибиотикам бактериальные штаммы, а также низкий риск формирования устойчивости к данной группе соединений. На текущий момент в мире несколько десятков различных препаратов на основе АМП находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований.

Особый интерес представляет способность некоторых АМП взаимно усиливать активность друг друга при совместном действии на бактериальные патогены. Такие соединения, действуя в синергизме, способны не только быстро и эффективно уничтожить патогены, но и препятствовать формированию резистентности в тех случаях, когда это возможно при применении индивидуальных соединений. Потенциальным источником коктейлей АМП, способных действовать в синергизме, являются организмы, одновременно экспрессирующие защитные пептиды, относящиеся к различным структурным классам. Среди млекопитающих такими организмами являются многие представители отряда китопарнокопытных (лат. Cetartiodactyla). Продуцируемые китопарнокопытными АМП относятся к семейству кателицидинов. Все кателицидины имеют общий тип структуры белка-предшественника, включающего белок-носитель, содержащий консервативный кателиновый домен, сайт расщепления эластазой и вариативную последовательность, кодирующую зрелый пептид. Зрелые кателицидины могут относиться к различным структурным классам, таким как α -спиральные, β -шпильчатые, пролин-богатые и другие АМП. Поскольку арсенал защитных пептидов у многих видов животных включает в себя сразу несколько структурно различных кателицидинов, в ряде случаев коэкспрессируемых клетками иммунной системы, было высказано предположение, что данные пептиды могут действовать в синергизме. Изучение природных коктейлей АМП может дать ценную информацию о механизмах их антибактериального действия, что поможет осуществить рациональный дизайн новых антимикробных препаратов на их основе.

Степень разработанности области исследования

Антимикробные пептиды считаются перспективными соединениями, которые в будущем могут послужить альтернативой классическим антибиотикам. По этой причине изучение биологических особенностей отдельных известных АМП часто становится темой исследований научных групп по всему миру. Ранее нами были проведены структурно функциональные исследования β -спиральных АМП беспозвоночных животных – ареницина и тахиплезина. Разработанные нами подходы послужили основой для структурно-функциональных исследований в рамках настоящей работы. Первые АМП, относящиеся к семейству кателицидинов, были обнаружены задолго до того, как их начали объединять в единую группу на основе общего структурного типа белка-предшественника. В настоящий момент некоторые индивидуальные представители кателицидинов являются популярными объектами исследований. Модифицированный вариант протегрина, названный исеганан, прошел III фазу клинических испытаний. Человеческий α -спиральный кателицидин LL-37 широко исследован не только как прямой противомикробный агент, но и с точки зрения его иммуномодулирующих свойств. Настоящая работа расширяет представление о кателицидинах за счет исследования совместных эффектов коэкспрессирующихся АМП, а также демонстрирует, что эффективным методом снижения токсичности протегрин-подобных АМП является ослабление их способности к неспецифической олигомеризации.

Цели и задачи работы

Целью данной работы было определить основные механизмы совместного действия пептидов китопарнокопытных при их одновременном применении, а также добиться снижения токсичности исследуемых пептидов в отношении нормальных клеток человека. Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить структурное и функциональное разнообразие кателицидинов китопарнокопытных. Разработать схему получения и выделить рекомбинантные аналоги кателицидинов козы *Capra hircus*, кашалота *Physeter catodon* и свиньи *Sus scrofa*, а также их модифицированные варианты.

2. Провести структурно-функциональное исследование пролин-богатого кателицидина mini-ChVac7.5Na, способного ингибировать бактериальный биосинтез белка, а также изучить биологическую активность его модифицированных вариантов.

3. Исследовать природное многообразие додекапептидов китопарнокопытных. Изучить структурную организацию кателицидина ChDode козы *Capra hircus* и его биологическую активность.

4. Изучить механизмы совместного действия коэкспрессирующихся кателицидинов из лейкоцитов козы *Capra hircus* в отношении бактериальных клеток. Провести оценку возможности их совместного применения для терапии бактериальных инфекций.

5. Исследовать природное многообразие протегринов китопарнокопытных. Провести структурно-функциональное исследование аналогов протегрина свиньи *Sus scrofa* с целью создания на его основе нового антимикробного агента.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения настоящей работы были получены рекомбинантные аналоги ряда кателицидинов млекопитающих семейства китопарнокопытных. Разработана биотехнологическая система получения кателицидинов с использованием гетерологичной экспрессии в бактериальной системе. Изучена биологическая активность полученных кателицидинов.

Показана способность α -спирального кателицидина козы *Capra hircus* ChMAP-28 эффективно нарушать целостность внешней и цитоплазматической мембран грамотрицательных бактерий. Установлена способность кателицидина козы *Capra hircus*

mini-ChVac7.5N α и его укороченного аналога ингибировать работу бактериальной рибосомы, а также показана роль С-концевого участка пептида в его проникновении в клетку через бактериальную мембрану. Впервые получен ряд модифицированных аналогов mini-ChVac7.5N α и изучена их активность в отношении бактериальных клеток. Доказана ключевая роль бактериального транспортера SbmA в проникновении пролин-богатых пептидов в клетки грамотрицательных бактерий.

Изучено природное разнообразие и биологическая активность кателицидиновых додекапептидов китопарнокопытных. Показано, что додекапептид козы ChDode образует антипараллельный димер. Впервые обнаружен и изучен ортолог додекапептида ChDode – кателицидин PcDode из кашалота *Physeter catodon*. Установлено, что структура пептида PcDode состоит из двух додекапептидных блоков и замыкается в β -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями. Показано, что механизм действия ChDode обусловлен его действием на мембрану бактериальных клеток.

Впервые изучено совместное действие кателицидинов различных структурных классов в отношении бактериальных клеток. Выявлены выраженные синергические эффекты в пептидных парах ChDode + ChMAP-28 и mini-ChVac7.5N α + ChMAP-28.

Разработан протокол тестирования динамики формирования резистентности бактериальных штаммов в отношении АМП. Изучена способность к формированию резистентности бактериальными штаммами в присутствии субингибирующих концентраций индивидуальных кателицидинов и их смесей. Охарактеризованы отдельные мутации *E. coli*, приводящие к формированию резистентности к пролин-богатым кателицидинам.

Методом сайт-направленного мутагенеза получен ряд аналогов β -шпильчатого кателицидина свиньи *Sus scrofa* (протегрин), обладающих более высоким терапевтическим индексом по сравнению с природным пептидом за счет снижения их цитотоксичности при сохранении противобактериальной активности. Для лучшего из полученных аналогов значение терапевтического индекса было выше в 30 раз по сравнению с природным протегрином. Эффективность данного аналога была подтверждена *in vivo* на модели мышей, зараженных летальной инфекцией *E. coli* ATCC 25922.

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

Практическая значимость данной работы заключается в подтверждении того, что использование коктейлей антимикробных агентов представляет одно из наиболее перспективных направлений в терапии инфекционных заболеваний, поскольку это позволяет, с одной стороны, свести к минимуму токсические эффекты отдельных АМП за счет снижения эффективной дозы, а с другой, противодействовать формированию резистентности в отношении отдельных компонентов коктейля. Полученные данные позволяют по-новому оценить перспективы использования пептидных препаратов, способных действовать в синергизме с собственными молекулярными факторами иммунной системы человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Бактериальный транспортер SbmA играет ключевую роль в процессе проникновения пролин-богатых АМП в грамотрицательные бактерии. Определяющую роль в способности к проникновению через бактериальную мембрану пролин-богатых Vac7-подобных АМП играет С-концевой участок пептида.
2. Среди представителей китопарнокопытных широко распространены β -структурные кателицидины. Протегрин-подобные β -шпильки встречаются исключительно среди представителей подотряда свинообразных (лат. Suina), в то время как у других представителей отряда Cetartiodactyla β -структурные кателицидины представлены

гомодимерными додекапептидами. В геноме кашалота *Physeter catodon* обнаружен уникальный β -спилечный кателицидин, структура которого состоит из двух додекапептидных цепей.

3. Совместно экспрессирующиеся в клетках китопарнокопытных кателицидины действуют в синергизме в отношении бактериальных клеток. Механизм синергизма отличается для разных пар кателицидинов. Совместное применение кателицидинов препятствует формированию бактериальной резистентности к отдельным компонентам коктейля.

4. Протегрин свиньи *Sus scrofa* является перспективным скаффолдом для создания на его основе менее токсичных аналогов в качестве потенциальных препаратов для системной антибактериальной терапии. Получен аналог, терапевтический индекс которого в 30 раз выше, чем у природного протегрина. Эффективность аналога подтверждена *in vivo* на модели мышины септицемии.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов исследований подтверждена современными биоинформатическими и экспериментальными подходами, а также воспроизводимостью, статистической обработкой и согласованностью данных, полученных различными методами, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию, времяпролетную масс-спектрометрию МАЛДИ, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, спектроскопию кругового дихроизма, Фурье ИК-спектроскопию, проточную цитометрию, а также другими методами качественного и количественного анализа.

Основные результаты работы докладывались на международных и российских научных конференциях, в том числе на Европейском симпозиуме, посвященном антимикробным веществам и устойчивости к ним (CESAR 2015), международных зимних молодежных научных школах "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", V съезде биохимиков России, III международной конференции «Антимикробные пептиды как прототипы новых антибиотиков».

Личный вклад автора

Планирование диссертационной работы, формулировка темы и целей исследования, постановка задач 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 122 страницах, содержит 24 рисунка и 8 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов и библиографического списка, включающего 234 наименования.

Содержание работы

Объекты исследования

Одним из возможных подходов к решению проблемы антибиотикорезистентности является поиск соединений с принципиально новым механизмом антимикробного действия. Потенциальным источником таких соединений является пул антимикробных пептидов – молекулярных факторов системы врожденного иммунитета. Одной из наиболее интересных групп АМП, выделяющейся особенностями биосинтеза, являются кателицидины. Кателицидины – это большая структурно гетерогенная группа АМП, играющая важную роль во врожденном иммунном ответе позвоночных животных. Данное семейство пептидов характеризуется общей структурой белка-предшественника, включающего сигнальный участок, консервативный кателин-подобный домен и переменный С-концевой участок, из которого в ходе процессинга формируется зрелый АМП. Гены, кодирующие кателицидины были обнаружены у подавляющего числа позвоночных животных. При этом для некоторых видов характерно наличие всего лишь одного гена кателицидина (например, человеческий LL-37 или мышинный CRAMP), в то время как другие организмы могут экспрессировать сразу несколько различных кателицидинов. Одними из наиболее богатых с точки зрения разнообразия кателицидинов являются виды млекопитающих из отряда китопарнокопытных (лат. Cetartiodactyla), включая подотряды мозолоногих (Tylopoda), жвачных (Ruminantia), свинообразных (Suina) и бегемотообразных или китоанкодонт (Cetancodonta). Характерной чертой представителей отряда китопарнокопытных является одновременная экспрессия нескольких структурно различных кателицидинов. Было высказано предположение, что такие пептиды могут взаимно усиливать эффективность друг друга при одновременном воздействии на бактериальные клетки, т.е. проявлять синергизм. В качестве основного модельного объекта работы была выбрана домашняя коза *Capra hircus*. Выбор данного вида был обусловлен доступностью биологического материала, а также наличием в публичных репозиториях многочисленных геномных проектов и транскриптомных данных, полученных из различных тканей. Так же, как и в случае других парнокопытных, в организме козы экспрессируется несколько кателицидинов, зрелые формы которых относятся к различным структурным классам. Для части из них ранее было показано наличие зрелой матричной РНК в лейкоцитарных клетках. Наибольший уровень экспрессии был показан для генов кателицидина-1 (другие названия: бактенецин-1, додекапептид), кателицидина-3 (другое название: бактенецин 7,5) и кателицидина-6 (другое название: MAP-28).

Ранее нами совместно с коллегами из Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург) из лейкоцитов домашней козы были выделены два новых АМП, названных мини-бактенецинами и обозначенных как mini-ChVac7.5N α и mini-ChVac7.5N β . Эти пептиды являются N-концевыми фрагментами (22 и 21 а.о., соответственно) гипотетического пептида бактенецина ChVac7.5, также классифицируемого как кателицидин-3. Считается, что мини-бактенецины, являясь пролин-богатыми АМП, в качестве мишени в первую очередь воздействуют на внутриклеточные структуры, такие как рибосома 70S и/или белок теплового шока DnaK. Ранее было показано, что для кателицидина-3 из быка *Bos taurus* (другое название Vac7) минимально активным фрагментом, проявляющим способность подавлять биосинтез белка *in vitro*, является N-концевой участок пептида 1-16, поэтому для исследования функциональной активности были выбраны два пептида – полноразмерный mini-ChVac7.5N α , имеющий молекулярную массу 2,9 кДа и включающий 22 аминокислотных остатка, и его укороченный аналог mini-ChVac7.5N α (1-16), имеющий молекулярную массу 2,1 кДа (**Рисунок 1А**). Использование двух вариантов исследуемого АМП с различной длиной аминокислотной последовательности позволяет выявить биологическую роль фрагмента PRPRPR, локализованного на С-концевом участке пептида mini-ChVac7.5N α . Кроме того, в ходе

работы было проведено структурно функциональное исследование пептида mini-ChVac7.5N α и получен ряд его аналогов с различными аминокислотными заменами.

Наряду с mini-ChVac7.5N α был исследован ранее не изученный козий миелоидный АМП кателицидин-6, названный нами ChMAP-28 (**Рисунок 1Б**). Первичная структура пептида была предсказана путём анализа депонированной в GenBank последовательности мРНК (AJ243126.1), кодирующей соответствующий белок-предшественник. Данный кателицидин имеет относительно высокий уровень гомологии с альфа-спиральным кателицидином быка *B. taurus* VMAP-27. ChMAP-28 имеет молекулярную массу 3,34 кДа и содержит 11 основных аминокислотных остатков (Arg, Lys, His).

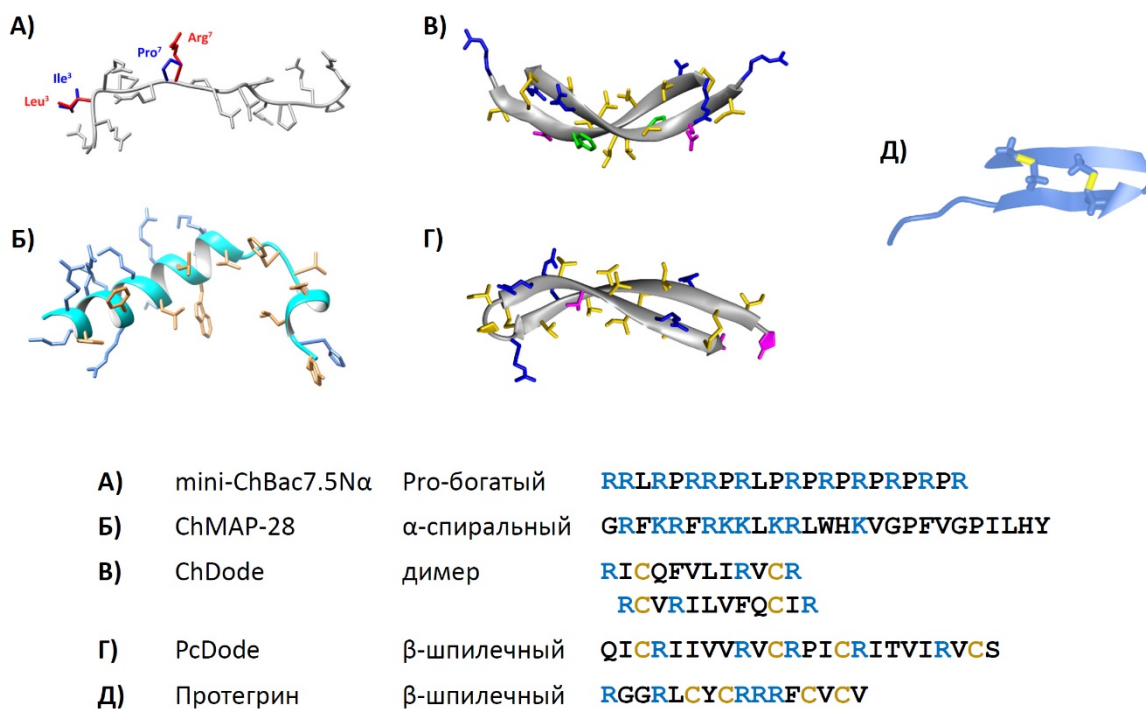


Рисунок 1. Исследуемые объекты. А) Пространственная структура фрагмента mini-ChVac7.5N α (1–16), смоделированная на основе кристаллической структуры Vac7(1–16). Б) Модельная пространственная структура ChMAP-28. В) Структура димера ChDode, построенная на основе данных ЯМР-спектроскопии. Г) Структура PcDode, полученная на основе данных ЯМР-спектроскопии. Д) Структура протегрина-2, установленная методом ЯМР-спектроскопии.

Еще один пептид, исследованный в рамках данной работы, – кателицидин-1 или додекапептид козы *Capra hircus*, обозначенный как ChDode. Его наиболее близким структурным гомологом является кателицидин-1, выделенный из быка *B. taurus*, также известный как бактенецин-1. Первичная структура ChDode была предсказана путём анализа депонированной в GenBank последовательности мРНК (XM_018038479.1). ChDode состоит из 12 аминокислотных остатков и имеет в своем составе два остатка цистеина (**Рисунок 1В**). Для его гомолога, бактенецина-1 быка, было показано как формирование циклического мономера, так и образование параллельных и антипараллельных димеров. Поэтому одной из задач исследования было определение пространственной структуры козьего додекапептида. В процессе поиска гомологичных соединений у других китопарнокопытных, в геноме кашалота *Physeter catodon* был обнаружен уникальный ортолог кателицидина-1, обозначенный как PcDode. Позднее предполагаемая последовательность белка-предшественника данного пептида была автоматически аннотирована алгоритмами GenBank (XM_007124827.2). Пептид PcDode включает в себя 24 аминокислотных остатка, в том числе 4 остатка цистеина (**Рисунок**

1Г). Аминокислотная последовательность PcDode состоит из двух додекапептидных участков. Наличие остатка пролина в месте соединения этих двух участков дает основание полагать, что структурно PcDode представляет из себя β -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями. Этот же факт свидетельствует в пользу того, что зрелые додекапептиды могут формировать антипараллельные димеры.

Наибольший интерес с точки зрения использования АМП в качестве препаратов для системного применения представляют β -шпильчатые пептиды. За счет своей жесткой структуры они обладают более высокой устойчивостью к деградации протеолитическими ферментами и способностью сравнительно долго циркулировать в кровотоке. Среди кателицидинов наиболее изученным β -шпильчатым АМП является протегрин, выделенный из лейкоцитов свиньи *Sus scrofa* (Рисунок 1Д). Протегрин обладает широким спектром антимикробного действия, однако для него также характерна высокая цитотоксичность в отношении нормальных клеток человека. Было высказано предположение, что цитотоксичность протегрина может быть следствием его способности к неспецифическому формированию олигомерных структур. С целью уменьшения цитотоксичности протегрина в ходе работы было проведено его структурно-функциональное исследование и получен ряд модифицированных вариантов с более высоким терапевтическим индексом.

Все изученные в рамках настоящей работы АМП не имеют иных посттрансляционных модификаций, кроме образования дисульфидных связей, а также формирования N-концевой пироглутаминовой кислоты (5-оксопролина) у пептида PcDode, поэтому для их получения была выбрана бактериальная система экспрессии на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3). Нуклеотидные конструкции, кодирующие исследуемые пептиды, получали генно-инженерным способом при помощи сборки из праймеров или путем сайт-направленного мутагенеза ранее полученных конструкций. Собранные нуклеотидные последовательности клонировали в плазмиды семейства pET под контролем промотора T7. Экспрессию белков-предшественников проводили методом автоиндукции лактозой или с добавлением изопропил- β -D-1-тиогактопиранозида (IPTG). Исследуемые АМП получали в виде слитого белка с модифицированным (M37L) тиоредоксином в качестве белка-носителя. С целью облегчения процесса очистки пептидов к последовательности белка-носителя был добавлен аффинный октагистидиновый участок. Гибридный белок расщепляли бромцианом по введенному в его аминокислотную последовательность остатку метионина. Выделение и очистка исследуемых АМП включала стадии получения клеточного осадка методом центрифугирования, обработку суспензии клеток методом ультразвукового лизиса или с использованием гомогенизатора высокого давления, получения осветленного лизата методом высокоскоростного центрифугирования, а также стадии первичной очистки с использованием аффинной хроматографии на Ni^{2+} -сефарозе и финальной очистки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазовых колонках C18. Гомогенность полученных пептидов контролировали методами аналитической ВЭЖХ и времяпролетной масс-спектрометрии МАЛДИ.

Структурно-функциональное исследование mini-ChBac7.5N α

Ранее нами совместно с коллегами из Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург) из лейкоцитов домашней козы *Capra hircus* были выделены два пептида с молекулярными массами 2895,5 Да и 2739,3 Да, обладающие выраженной антимикробной активностью и представляющие собой N-концевые фрагменты (1–22 и 1–21) пролин-богатого пептида бактенецина 7.5 козы *Capra hircus*. Пептиды были названы мини-бактенецинами (mini-ChBac7.5N α и mini-ChBac7.5N β , соответственно). Несмотря на высокую степень гомологии с N-концевым фрагментом известного пролин-богатого АМП Bac7, минибактенецин mini-ChBac7.5N α обладает рядом существенных структурных отличий, которые могут влиять на механизм его взаимодействия с рибосомой. Целью

данной части работы было проведение структурно-функционального исследования минибактенецина козы mini-ChBac7.5N α и поиск в его структуре ключевых аминокислотных остатков для проявления антимикробной активности. Полученные результаты могут быть использованы для создания терапевтически ценных аналогов данного пептида. В рамках данного исследования также был получен ряд модифицированных вариантов исследуемого АМП (Рисунок 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Bac7(1-22)	R	R	I	R	P	R	P	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	F	P	R	
mini-ChBac7.5 α	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini-ChBac7.5N α (1-16)	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	-	-	-	-	-	-	
mini-PF	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	F	P	R	
mini-PL	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	L	P	R	P	R	
mini-PW	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	W	P	W	P	R	
mini-(PW)3	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[+R]	R	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[+A]	A	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[R1A]	A	R	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[R2A]	R	A	L	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[L3A]	R	R	A	R	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[R4A]	R	R	L	A	P	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[P5A]	R	R	L	R	A	R	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[R6A]	R	R	L	R	P	A	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[R7A]	R	R	L	R	P	R	A	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	
mini[P8A]	-	R	R	L	R	P	R	R	A	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
mini[VDK]	-	-	-	-	V	D	K	R	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
Онкоцин	-	-	-	-	V	D	K	P	P	Y	L	P	R	P	R	P	R	R	I	Y	N	R	

Рисунок 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых вариантов минибактенецина mini-ChBac7.5N α и известных пролин-богатых АМП. Консервативная консенсусная последовательность, обеспечивающая эффективное связывание онкоцин-подобных пролин-богатых АМП в рибосомном тоннеле, выделена пунктирной линией.

В ходе исследования mini-ChBac7.5N α ранее был получен его укороченный аналог (1-16), соответствующий минимальному фрагменту пептида Bac7, способному согласно литературным данным проявлять антимикробную активность и ингибировать биосинтез белка. Тестирование активности mini-ChBac7.5N α и mini-ChBac7.5N α (1-16) на панели бактериальных штаммов показало высокую чувствительность данных пептидов к ионной силе среды. (Таблица 1). Укороченный аналог mini-ChBac7.5N α (1-16) оказался менее активным и более чувствительным к присутствию соли в среде по сравнению с mini-ChBac7.5N α дикого типа. Интересно, что антибактериальная активность данных пептидов была примерно равной при тестировании в бессолевой среде в отношении культур *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae*. В отличие от других протестированных штаммов (грамположительные бактерии и *P. aeruginosa*), эти бактерии имеют транспортную систему ABC, включающую мембранный белок SbmA. Данный транспортер, а также липопротеин YaiW, как было ранее показано, могут быть использованы пролин-богатыми пептидами для проникновения в клетку. Полученные нами результаты показали, что присутствие С-концевого фрагмента PRPRPR не влияет на эффективность транслокации пептида через мембрану с помощью транспортера SbmA в бессолевой среде, но может играть ключевую роль при действии против бактерий с дефицитом SbmA. Вместе с тем, было показано, что α -спиральный кателицидин ChMAP-28 менее чувствителен к высокой ионной силе по сравнению с минибактенецинами.

Таблица 1. Антимикробная активность кателицидинов в среде Мюллера-Хинтона в отсутствие или с добавлением соли в физиологической концентрации.

Штамм	sbmA/ yaiW	Минимальная ингибирующая концентрация* (мкМ)					
		ChMAP-28		mini-ChBac7.5N α		mini-ChBac7.5N α (1–16)	
		Без NaCl	0,9% NaCl	Без NaCl	0,9% NaCl	Без NaCl	0,9% NaCl
<i>M. luteus</i> B-1314	-/-	0,25	0,5	0,125	0,5	1	8
<i>B. subtilis</i> B-886	-/-	0,25	1	0,25	4	1	>32
<i>E. faecalis</i> 29212	-/-	4	>8	>32	>32	>32	>32
<i>S. aureus</i> 29213	-/-	1	2	8	>32	>32	>32
<i>S. aureus</i> 209P	-/-	0,06	0,5	2	16	8	>32
<i>E. coli</i> C600	+/+	0,06	0,125	2	4	2	16
<i>E. coli</i> ML35p	+/+	0,06	0,06	0,5	4	0,5	8
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-/-	0,25	1	2	>32	16	>32
<i>A. baumannii</i> 2675	+/-	0,03	0,25	2	>32	4	>32
<i>K. pneumoniae</i> 287	+/+	0,125	0,5	4	16	4	>32
<i>E. cloacae</i> 4172	+/+	0,125	0,25	1	4	1	>32

* медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах

Для всех полученных модифицированных вариантов минибактенецина была определена биологическая активность в отношении нескольких бактериальных штаммов *E. coli* (Таблица 2), включая штаммы с нокаутным фенотипом по трансмембранным белкам-транспортерам OmpF и SbmA, поскольку ранее было показано, что мутации в данных белках могут быть причиной развития устойчивости к пролин-богатым АМП.

Ингибирование бактериальной трансляции подтверждали с использованием бесклеточной системы, синтезирующей репортерный белок EGFP. Способность минибактенецина и его укороченного аналога (1-16) ингибировать биосинтез белка сравнили с таковой для конвенциональных антибиотиков, а также других антимикробных пептидов – ChMAP-28 и β -шпиличного АМП тахиплезина (Рисунок 3А). Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для mini-ChBac7.5N α составило 1 мМ, что сопоставимо с таковым для антибиотиков-ингибиторов бактериальной трансляции – стрептомицина и эритромицина. Кроме того, значения IC₅₀ для mini-ChBac7.5N α соответствовали опубликованным ранее значениям IC₅₀ его гомологов – фрагментов Bac7, а также хорошо коррелируют с ранее определенными значениями МИК в отношении *E. coli* в бессолевой среде. Фрагмент mini-ChBac7.5N α (1–16) сохраняет способность ингибировать биосинтез белка, однако действует в два раза менее эффективно, чем mini-ChBac7.5N α дикого типа, что хорошо согласуется с общим снижением его антимикробной активности по сравнению с полноразмерным пептидом (Таблица 2). Способность модифицированных вариантов минибактенецина подавлять синтез белка сравнивали с ингибирующей активностью природного mini-ChBac7.5N α и фрагмента Bac7(1-22) с использованием той же системы (Рисунок 3Б).

Таблица 2. Сравнение антибактериальной активности минибактенецина и его модифицированных вариантов.

Пептид	МИК* (мкМ)			
	Штамм			
	<i>E. coli</i> MDR1057	<i>E. coli</i> BW25113	<i>E. coli</i> BW25113 <i>ΔsbmA</i>	<i>E. coli</i> BW25113 <i>ΔompF</i>
mini-ChBac7.5Nα	8	8	32	16
mini-PF	4	4	32	8
mini-PL	4	4	32	16
mini-PW	4	2	32	8
mini[+R]	8	8	64	32
mini[+A]	8	8	64	32
mini[R1A]	8	8	32	16
mini[R2A]	16	8	64	32
mini[L3A]	8	8	32	32
mini[R4A]	16	16	64	32
mini[P5A]	8	8	32	16
mini[R6A]	16	16	64	32
mini[R7A]	4	8	32	8
mini[P8A]	64	64	128	256
mini[VDK]	64	32	128	128

* медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах

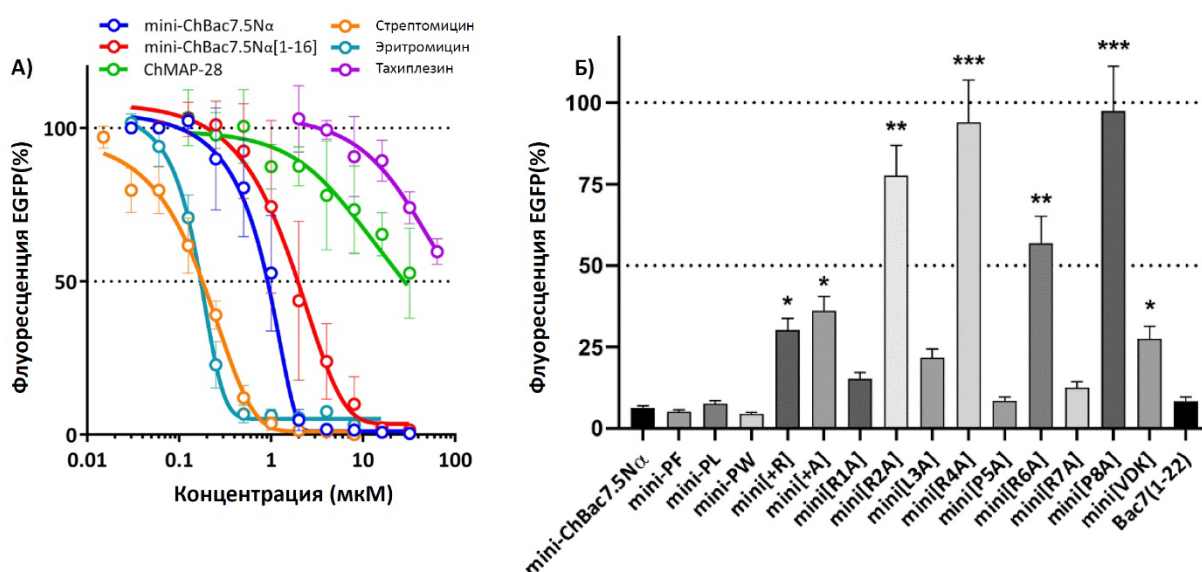


Рисунок 3. А) Влияние ChMAP-28, полноразмерного mini-ChBac7.5Nα и его укороченного аналога (1-16), тахиплезина-1 и классических антибиотиков в различных концентрациях на флуоресценцию, возникающую в результате синтеза EGFP *in vitro* в бесклеточной системе с использованием экстракта клеток *E. coli* BL21 (DE3) Star. Б) Оценка ингибирования модифицированными аналогами mini-ChBac7.5Nα процесса трансляции у бактерий *E. coli* с использованием репортерного флуоресцентного белка EGFP.

Все исследованные модифицированные аналоги минибактенецина mini-ChBac7.5Nα, за исключением аналогов mini-[P8A] и mini-[VDK], показали близкие значения МИК в отношении природного штамма *E. coli* BW25113. Для большей части аналогов также

показано снижение активности в отношении штамма *E. coli* $\Delta ompF$. Для всех протестированных аналогов наблюдается значительное снижение активности в отношении штамма *E. coli* $\Delta sbmA$, что свидетельствует о высокой значимости транспортера SbmA для транслокации аналогов минибактенецина через внутреннюю мембрану *E. coli*. Результаты исследования ингибирования процесса трансляции показывают (**Рисунок 3Б**), что замена остатков аргинина на аланин во всех случаях, за исключением варианта mini[R7A], негативно сказывается на способности аналогов минибактенецина ингибировать биосинтез белка. Однако, сопутствующее увеличение гидрофобности аналогов минибактенецина может объяснить менее выраженное снижение активности в отношении клеток *E. coli* (**Таблица 2**). Косвенно это подтверждается тем фактом, что аналог mini[R7A], для которого не наблюдается подавление способности к ингибированию биосинтеза белка, проявляет несколько более высокую активность в отношении штамма с делецией гена *ompF*, по всей видимости, за счет более эффективного проникновения через внешнюю мембрану *E. coli*.

Исследование другого ингибитора бактериальной трансляции – пролин-богатого кателицидина из альпаки *Vicugna pacos*, названного нами VicBac, показало, что N-концевой участок данного пептида играет ключевую роль в процессе ингибирования рибосомы, а C-концевой гидрофобный участок отвечает за способность пептида к проникновению в клетку. Полноразмерный VicBac проявляет высокую биологическую активность, не зависящую от присутствия в среде солей, а также от наличия SbmA транспортера. В то же время, его укороченные аналоги (**Рисунок 4**) сохраняют способность к ингибированию трансляции вплоть до уменьшения размера пептида до 16 первых аминокислотных остатков. Однако, антимикробная активность укороченных пептидов резко снижается в присутствии солей в физиологической концентрации. Кроме того, активность укороченных аналогов зависит от наличия основных транспортерных белков SbmA и Ompf (**Таблица 3**), что дополнительно подтверждено в рамках эксперимента по индукции бактериальной резистентности к аналогам VicBac: в отношении всех укороченных аналогов наблюдалось быстрое развитие резистентности по механизму инактивации или модификации SbmA транспортера.

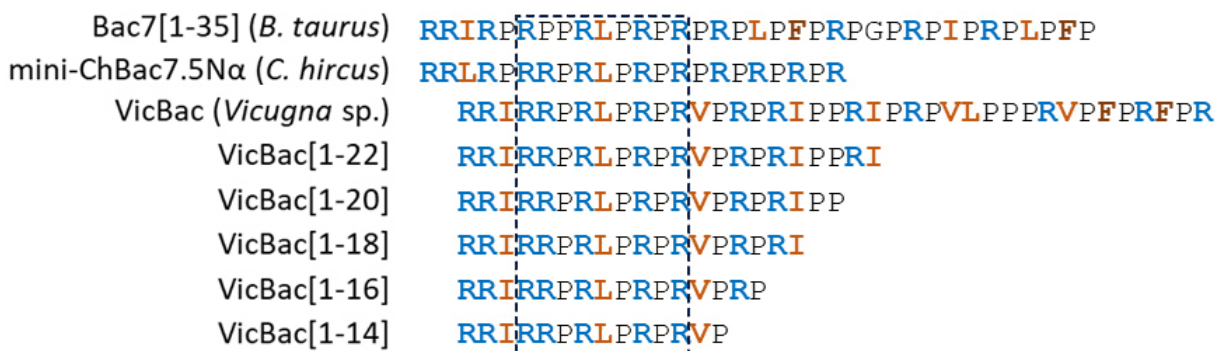


Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей VicBac, его укороченных аналогов и других известных пролин-богатых кателицидинов. Консенсусная последовательность, необходимая для ингибирования синтеза белка пролин-богатыми АМП, выделена пунктирной рамкой.

Таблица 3. Антибактериальная активность VicBac[1-39] дикого типа и его укороченных вариантов в среде Мюллера-Хинтона в отсутствие или с добавлением 0,9% NaCl.

Штамм <i>E. coli</i>	0,9% NaCl	МИК (мкМ)					
		Аналоги VicBac					
		[1-14]	[1-16]	[1-18]	[1-20]	[1-22]	[1-39]

ATCC25922	+	32	4	2	8	1	1
	-	>64	32	2	4	0,5	0,5
BW25113	+	64	8	4	8	2	1
	-	>64	64	4	4	1	1
$\Delta sbmA$	+	64	8	4	8	4	2
	-	>64	>64	>64	>64	16	2
$\Delta ompF$	+	64	8	8	16	2	1
	-	>64	64	16	64	8	1

С целью изучения способности аналогов минибактенецина с дополнительными гидрофобными остатками вызывать формирование резистентности была проведена оценка динамики развития резистентности штамма *E. coli* MDR1057 к аналогу природного mini-ChVac7.5N α , а также к его аналогам с повышенной гидрофобностью (mini-PF, mini-PL, mini-PW). Для всех аналогов минибактенецина было показано быстрое формирование устойчивости штамма *E. coli* MDR1057 в течение 7 дней. Отобранные клоны, сохраняющие уровень резистентности в течение 7 последовательных пересевов без добавления пептида, были исследованы методом ПЦР-амплификации и последующего секвенирования гена *SbmA* с целью выяснения механизма развития резистентности. В результате секвенирования штаммов *E. coli*, устойчивых к гидрофобным аналогам mini-PF и mini-PW, были обнаружены мутации в гене *sbmA*, вызывающие нарушение его функциональной активности, что согласуется с ранее полученными данными для других пролин- богатых АМП. Полученный результат является подтверждением того, что белок *SbmA* служит ключевым транспортером коротких пролин-богатых АМП с различной структурой в присутствии солей в физиологической концентрации.

На следующем этапе нами был разработан аналог mini-(PW)3 с увеличенной гидрофобностью С-концевого участка за счет его удлинения и добавления трех остатков триптофана (**Рисунок 2**). Тестирование антимикробной активности данного аналога продемонстрировало его способность угнетать рост штаммов *E. coli* с инактивированным *SbmA* транспортером, резистентных к mini-ChVac7.5N α а также значительно повысило эффективность в отношении других бактериальных штаммов. Полученные данные свидетельствуют о том, что модификация С-концевого участка пролин-богатых бактенецин-подобных ингибиторов трансляции является перспективным направлением, позволяющим улучшить прямое антимикробное действие данных пептидов.

Изучение структуры и антимикробной активности додекапептидов.

Кателицидины-1 (также известные как бактенецины или додекапептиды) — небольшие антимикробные пептиды, впервые выделенные из нейтрофильных гранул представителей семейства полорогих (лат. Bovidae). Наиболее изученным представителем додекапептидов является бактенецин быка *Bos taurus*. Зрелый бактенецин состоит из 12 аминокислотных остатков и содержит два остатка цистеина в положениях 3 и 11. Считается, что бактенецин образует внутреннюю дисульфидную связь, приводящую к формированию 9-членного кольца. Однако в некоторых работах показано, что нативная форма пептида может представлять собой антипараллельный или параллельный β -структурный димер, где остатки цистеина образуют два межмолекулярных дисульфидных мостика.

В рамках работы была проанализирована естественная изменчивость генов кателицидинов-1 *CATHL1* у различных видов из отряда китопарнокопытных (лат. Cetartiodactyla) (**Рисунок 5А**) и изучена пространственная структура полученного рекомбинантного додекапептида козы *Capra hircus*, обозначенного как ChDode. Согласно данным, полученным методами спектроскопии кругового дихроизма (КД), инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИКФС) и ЯМР-спектроскопии, рекомбинантный ChDode в водной среде имеет структуру ковалентно сшитого антипараллельного β -структурного

гомодимера, содержащего 24 аминокислотных остатка и стабилизированного двумя межмолекулярными дисульфидными связями. В среде, имитирующей мембрану, ChDode подвергается дальнейшей олигомеризации с образованием плоского β -структурного тетрамера. Пространственная структура симметричного антипараллельного нековалентного тетрамера, сформированного из двух ковалентных димеров ChDode (**Рисунок 5Б**), была определена совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ГНЦ ИБХ РАН с помощью ЯМР-спектроскопии в мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ). Было показано, что наряду с протегринами, додекапептиды являются представителями β -структурных кателицидинов.

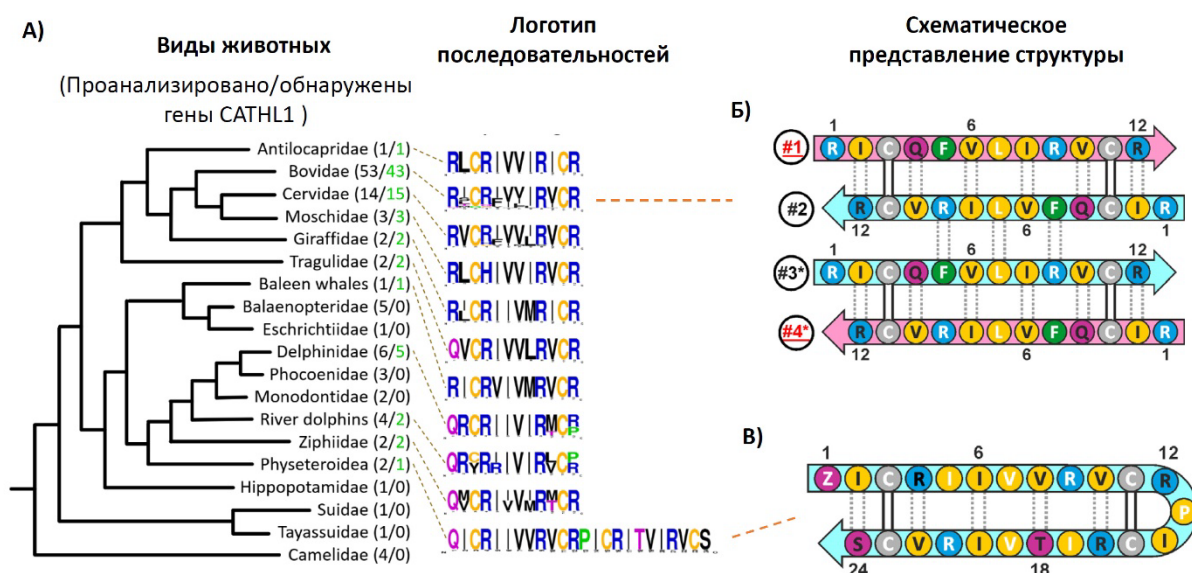


Рисунок 5. А) Представленность генов *CATHL1* в отряде Cetartiodactyla и график частоты встречаемости аминокислотных остатков (логотип последовательностей). Б) Антипараллельный нековалентный тетрамер из двух антипараллельных ковалентно сшитых гомодимеров ChDode, формирующийся в мицеллах ДФХ. Цепи тетрамера пронумерованы. В) Мономерный β -шпильчатый кателицидин-1 кашалота *Physeter catodon*, содержащий 24 аминокислотных остатка.

В ходе изучения естественной изменчивости генов *CATHL1* нами был обнаружен уникальный додекапептид кашалота *Physeter catodon*, обозначенный как PcDode. Аминокислотная последовательность PcDode содержит 24 остатка и представляет собой два додекапептидных блока. Вероятно, такая структура появилась в результате дупликации соответствующего участка гена. Согласно результатам ЯМР-анализа, PcDode принимает структуру β -шпильки, стабилизированную двумя внутримолекулярными дисульфидными связями между остатками цистеинов в положениях 3-23 и 11-15 (**Рисунок 5В**). Структурная организация PcDode является дополнительным подтверждением того, что природные додекапептиды могут формировать антипараллельные димеры.

Нами было показано, что ChDode обладает мембранотропной активностью (**Рисунок 6А**) и способен образовывать тороидальные поры при воздействии на модельную мембрану, содержащую анионные липиды. Предположительно, это является основным механизмом прямого антимикробного действия пептида. Вместе с этим, ChDode способен в некоторой степени ингибировать биосинтез белка, возможно, за счет ДНК-связывающей активности (**Рисунок 6Б**). Однако, ингибирование биосинтеза белка происходит в диапазоне концентраций, значительно превышающих значения МИК. Было показано, что ChDode обладает умеренной гемолитической активностью в отношении человеческих эритроцитов и при этом демонстрирует слабо выраженные цитотоксические эффекты в отношении нормальных клеток, что может быть объяснено высоким уровнем

связывания с белками сыворотки крови. Додекапептиды обладают сравнительно невысокой антимикробной активностью, значения МИК в отношении штамма *E. coli* ML35p составляют около 8–16 мкМ. Возможная биологическая роль додекапептидов была раскрыта в настоящей работе в рамках исследования совместного действия кателицидинов.

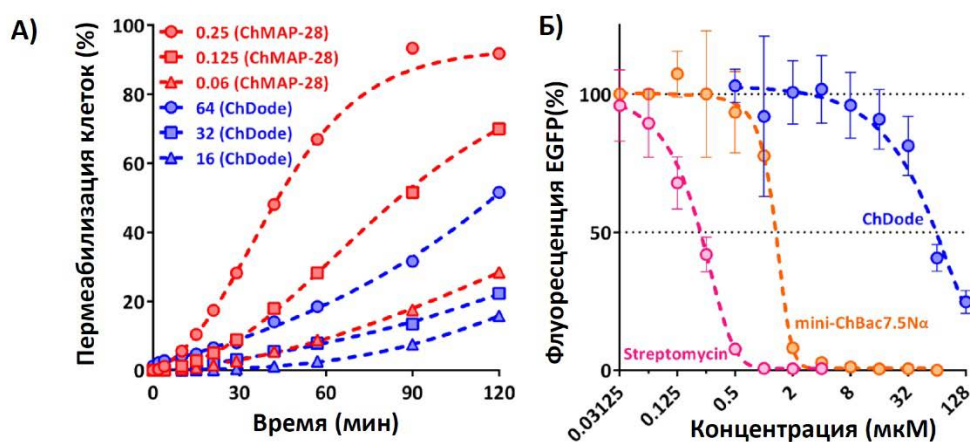


Рисунок 6. Биологическая активность кателицидинов. А) Изменение проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35p при действии додекапептида ChDode в сравнении с кателицидином ChMAP-28. Тестирование пермеабилзации клеток с использованием *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (ONPG). Б) Влияние кателицидинов и стрептомицина в различных концентрациях на флуоресценцию, возникающую в результате синтеза EGFP *in vitro* с использованием экстракта клеток *E. coli* BL21 (DE3) Star. Сравнение с пролин-богатым кателицидином mini-ChBac7.5Na.

Изучение совместного действия кателицидинов козы *Capra hircus*.

Для всех представителей отряда Cetartiodactyla характерной особенностью является наличие множественных генов кателицидинов. Часто в организме одного представителя китопарнокопытных могут экспрессироваться сразу несколько структурно различных кателицидинов. Так, в лимфоцитах козы *Capra hircus* ранее был обнаружен высокий уровень синтеза мРНК для трех кателицидинов – α -спирального ChMAP-28, пролин-богатого mini-ChBac7.5Na и β -структурного ChDode. Кателицидин ChMAP-28 обладает ярко выраженной мембранотропной активностью. Для ChDode также характерна активность в отношении бактериальных мембран, тогда как mini-ChBac7.5Na действует на внутриклеточные мишени. При этом способность mini-ChBac7.5Na к проникновению через мембрану зависит от ионной силы раствора и подавляется физиологическими концентрациями солей. Данные особенности исследуемых кателицидинов позволили предположить возможность синергического эффекта при их совместном применении в отношении бактериальных клеток. Исследование синергического действия пептидов изучали методом перекрестных двойных серийных разведений в жидкой среде (методом шахматной доски). Наличие синергического эффекта определяли, рассчитывая индекс ФИК = $\text{ФИК}_A + \text{ФИК}_B = [A]/\text{МИК}_A + [B]/\text{МИК}_B$, где МИК_A и МИК_B - значения МИК для тестируемых соединений при индивидуальном применении, а [A] и [B] - концентрации тестируемых соединений в лунке, определяемой как МИК при совместном применении. Значения индекса $\text{ФИК} < 0.5$ свидетельствуют о проявлении соединениями синергических эффектов. Нами было проведено изучение синергизма между АМП и классическими антибиотиками. Было показано, что существенный вклад в наблюдаемые значения МИК исследуемых пептидов вносят сорбция пептидов на пластике микропланшетов, на что может влиять состав культуральной среды и внесение второго антимикробного агента. Для получения более стабильных результатов при определении значений МИК в жидкой среде и изучения синергизма нами была разработана методика, включающая

приготовление растворов исследуемых пептидов с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Расчет индекса ФИК для пары mini-ChVac7.5N α + ChMAP-28 показал наличие ярко выраженного синергического эффекта (Таблица 4). Было показано, что присутствие NaCl в физиологической концентрации резко снижает проницаемость внешней мембраны грамотрицательных бактерий для mini-ChVac7.5N α , в то время как ChMAP-28 способен вызывать повышение проницаемости внешней мембраны, в том числе в присутствии NaCl. Таким образом, синергизм в паре mini-ChVac7.5N α + ChMAP-28 проявляется, в первую очередь, за счет увеличения проницаемости мембраны под действием ChMAP-28 в субингибирующих концентрациях, что приводит к более эффективному проникновению mini-ChVac7.5N α в клетку.

Таблица 4. Синергизм между парой кателицидинов ChMAP-28 и mini-ChVac7.5N α .

Штамм	ChMAP-28			mini-ChVac7.5N α			ФИК	Синерг.
	МИК _А	[А]	ФИК _А	МИК _Б	[Б]	ФИК _Б		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,06	0,015	0,25	8	1	0,125	0,375	Да
<i>E. coli</i> ML35p	0,06	0,008	0,125	4	1	0,25	0,375	Да
<i>E. coli</i> C600	0,125	0,015-0,03	0,125-0,25	4	1	0,25	0,375-0,5	Да
<i>E. coli</i> (XDR CI 1057)	0,125	0,008	0,063	8	2	0,25	0,313	Да
<i>E. coli</i> (CI 214)	0,06	0,015	0,25	>64	4	0,031	0,281	Да
<i>E. cloacae</i> (XDR CI 4172)	0,25	0,03	0,125	4	0,5	0,125	0,25	Да
<i>K. pneumoniae</i> (CI 287)	0,5	0,06	0,125	16	2	0,125	0,25	Да
<i>A. baumannii</i> (XDR CI 2675)	0,25	0,03	0,125	>32	0,5	0,008	0,133	Да
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,125	0,06	0,5	>32	8	0,125	0,625	Нет
<i>S. aureus</i> 209P	0,5	0,03	0,063	16	2	0,125	0,188	Да

Исследование синергизма между различными кателицидинами позволило пролить свет на возможную биологическую роль β -структурных додекапептидов. Нами было показано наличие выраженного синергического эффекта при совместном применении кателицидинов ChDode и ChMAP-28 в среде, содержащей NaCl в физиологической концентрации (Таблица 5). В присутствии ChDode в субингибирующих концентрациях, α -спиральный мембрано-активный ChMAP-28 демонстрирует 8-16-кратное увеличение антимикробного действия со снижением значения фракционной ингибирующей концентрации вплоть до наномолярного диапазона (8–16 нМ). Пара PcDode и ChMAP-28 продемонстрировала схожие, хотя и менее выраженные, синергические эффекты (0,25 < ФИК < 0,5). Эти данные свидетельствуют о том, что PcDode имеет сходный с ChDode механизм действия.

Таблица 5. Синергизм между парой кателицидинов ChMAP-28 и ChDode.

Штамм	ChDode			ChMAP-28			ФИК	Синерг.
	МИК _А	[А]	ФИК _А	МИК _Б	[Б]	ФИК _Б		
<i>E. coli</i> ML35p	16	0,5	0,031	0,06	0,008	0,125	0,156	Да
<i>S. aureus</i> 209P	>64	8	<0,125	0,5	0,03	0,063	<0,188	Да

Поскольку оба кателицидина – ChMAP-28 и ChDode – обладают мембранотропным механизмом действия, нами была исследована способность данных пептидов усиливать

активность друг друга в отношении бактериальных мембран. При совместном использовании данная пара кателицидинов демонстрирует усиление способности нарушать целостность как внешней (Рисунок 7А), так и цитоплазматической (Рисунок 7Б) мембран *E. coli*, значительно превосходящую таковую для индивидуальных пептидов. Примечательно, что ChDode в диапазоне концентраций 1–4 мкМ вызывает большее увеличение проницаемости внешней мембраны, чем демонстрируемое ChMAP-28 в концентрациях до 0,03 мкМ. В то же время, в отличие от ChMAP-28, ChDode не демонстрирует синергические эффекты в комбинации с mini-ChBac7.5Nα (значение индекса ФИК 1,0), что свидетельствует о различном механизме увеличения проницаемости мембраны, демонстрируемом данными кателицидинами. Одновременное использование коктейля из трех кателицидинов козы *Capra hircus* в отношении *E. coli* ML35р позволяет снизить фракционную ингибирующую концентрацию самого токсичного компонента смеси ChMAP-28 до 4 нМ. Значения фракционных ингибирующих концентраций как для ChDode, так и для mini-ChBac7.5Nα при этом составляют 1 мкМ. Дополнительно в рамках исследования по индукции резистентности к исследуемым кателицидинам нами было продемонстрировано, что при использовании синергической пары ChMAP-28 и mini-ChBac7.5Nα многократное последовательное пассажирование *E. coli* ML-35р не приводит к развитию резистентности, в то время как в случае индивидуального mini-ChBac7.5Nα наблюдается быстрое формирование устойчивости.

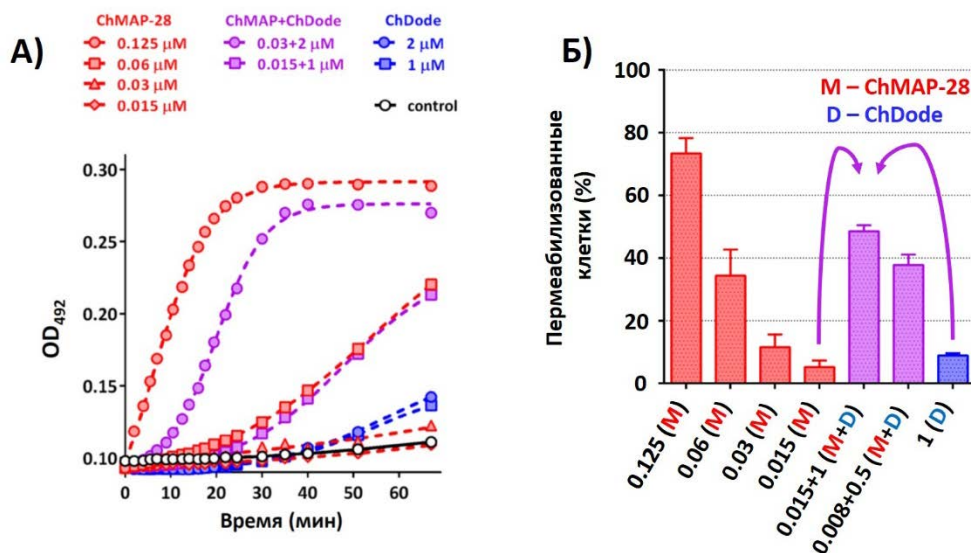


Рисунок 7. А) Изменение проницаемости внешней мембраны *E. coli* ML35р, измеренной с использованием хромогенного маркера – продукта гидролиза нитроцефина (OD₄₉₂). Сравнительный анализ проницаемости внешней мембраны клеток *E. coli* ML35р при их инкубации с индивидуальными кателицидинами ChMAP-28 и ChDode в различных концентрациях, а также с их комбинацией. Б) Тестирование проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML35р с использованием маркера – продукта гидролиза ONPG (OD₄₀₅).

Структурно-функциональное исследование протегрина.

Считается, что протегрины – единственная группа кателицидинов, зрелая форма которых формирует β-спилечный АМП. В настоящей работе мы показали, что додекапептиды также способны к формированию β-структур. Дополнительно был обнаружен и охарактеризован уникальный β-спилечный додекапептид PcDode. Тем не менее, в отличие от протегринов, додекапептиды не обладают высокой антимикробной активностью при индивидуальном использовании. Поэтому в рамках работы по созданию нового антимикробного агента на основе АМП был осуществлен рациональный дизайн аналогов протегрина свиньи *Sus scrofa* (PG-1) с целью снижения его цитотоксических свойств. Механизм прямого антимикробного действия протегринов основан на

образовании димеров из мономерных шпилек в липидном бислое, дальнейшую самоассоциацию димеров в октамерные β -бочонки или тетрамерные дуги и, наконец, образование пор, приводящее к неконтролируемому трансмембранному транспорту ионов и низкомолекулярных метаболитов. В высокой концентрации протегрин приводит к разрушению мембраны по детергент-подобному механизму.

В рамках настоящей работы был проведен поиск генов протегринов среди представителей отряда китопарнокопытных на основе депонированных в Genbank геномных проектов 120 видов. Нами было установлено, что структурные гомологи протегрина встречаются исключительно у представителей семейства Suidae. Анализ геномных и транскриптомных баз данных с использованием алгоритмов BLAST позволил обнаружить 7 новых гомологов протегринов, однако анализ семейства показал, что природный PG-1 имеет высокую степень сходства с консенсусной последовательностью. Поэтому было принято решение провести рациональный дизайн модифицированных вариантов протегрина-1.

Ранее мы провели структурно-функциональные исследования для улучшения терапевтических свойств ряда β -шпилечных АМП, таких как ареницин-1. Нами было показано, что образование олигомерных структур предопределяет активность ареницина против эукариотических клеток и способствует проявлению его цитотоксичности. В этой работе была использована стратегия рационального дизайна, основанная на наших предыдущих исследованиях β -шпилечных АМП, целью которых было стремление снизить общую гидрофобность, способность к олигомеризации и тенденцию к агрегации, сохраняя при этом структуру β -шпилеки. Нами был получен ряд аналогов природного протегрина PG-1 с заменами гидрофобных остатков на аргинин, а именно: [V14R], [V16R], [Y7R] и [L5R]. Схема эксперимента и список полученных аналогов представлены на **Рисунке 8А,Б**.

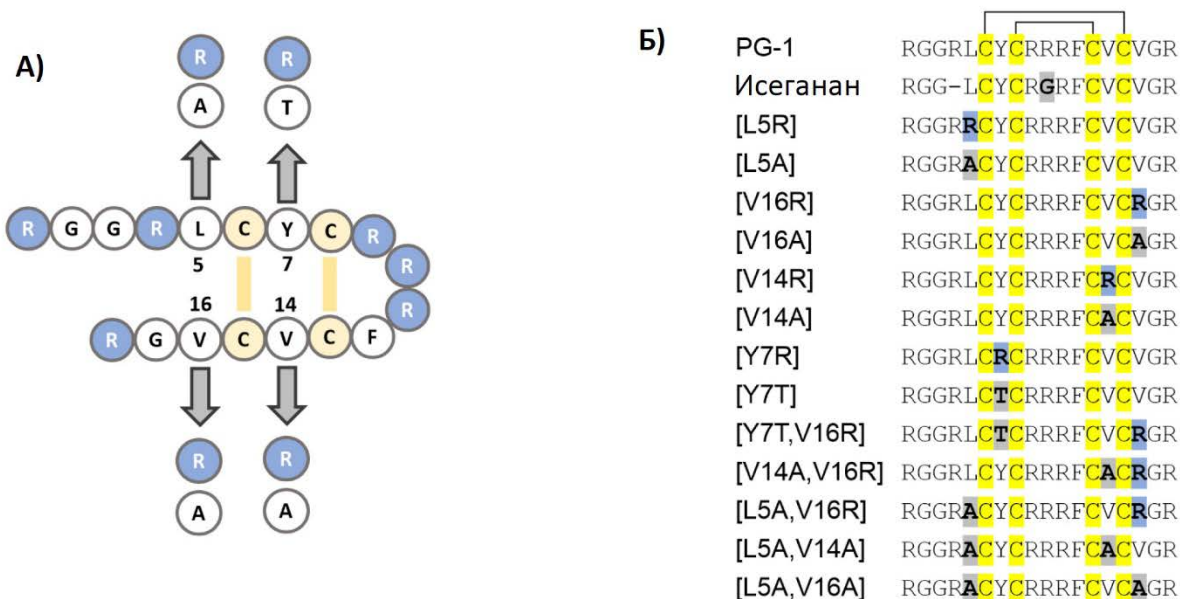


Рисунок 8. Аминокислотные замены в структуре протегрина PG-1 (А) и список полученных модифицированных вариантов (Б).

Для более мягкого снижения гидрофобности был получен ряд вариантов путем замены лейцина и валина на менее гидрофобный аланин, а именно: [L5A], [V14A] и [V16A]. Кроме того, был разработан аналог с заменой [Y7T] для снижения гидрофобности боковой цепи с сохранением гидроксильной группы в ее структуре. После тестирования антимикробной активности модифицированных аналогов с единственной аминокислотной заменой был также получен набор пептидов с двумя замещенными аминокислотными остатками (**Рисунок 8Б**). В качестве пептида сравнения нами был использован Исеганан, также известный как IB-367, – укороченный аналог протегрина, который прошел III фазу

клинических испытаний в качестве антибиотика наружного применения. Для всех полученных аналогов конечный выход чистого пептида составил от 4,0 до 7,2 мг на 1 л бактериальной культуры. Терапевтический потенциал полученных аналогов протегрина оценивали по селективности их действия в отношении бактериальных клеток по сравнению с клетками человека — эритроцитами и кератиноцитами HaCaT. Антимикробную активность аналогов определяли в отношении панели грамотрицательных и грамположительных бактерий методом двукратных серийных разведений (**Таблица 6**). Важно отметить наблюдаемую разницу в активности аналогов с аминокислотными заменами V14R и V16R

Таблица 6. Антимикробная активность протегрина и его аналогов.

Пептид	МИК*, мкМ									
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ML35p	<i>E. coli</i> BW 25113	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>S. aureus</i> 209P	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>M. luteus</i> B-1314
PG-1	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,25	1	0,5	1	0,25
Исеганан	0,5	0,5	0,5	8	4	0,5	4	2	4	0,5
[L5R]	1	0,5	0,25	1	1	0,5	8	4	4	1
[L5A]	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,25	1	1	1	0,5
[V16R]	0,5	0,25	0,25	1	0,5	0,125	4	4	4	1
[V16A]	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	0,125	1	1	1	0,5
[V14R]	4	4	2	32	>32	2	32	32	32	2
[V14A]	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,125	1	1	1	0,5
[Y7R]	0,5	0,5	0,5	8	4	0,5	8	16	16	2
[Y7T]	1	0,5	0,5	2	2	0,5	8	16	16	4
[Y7T,V16R]	8	4	8	>32	>32	4	>32	>32	>32	4
[V14A,V16R]	2	1	2	8	4	0,5	32	32	32	4
[L5A,V16R]	2	1	2	8	4	0,5	32	32	32	4
[L5A,V14A]	0,5	0,5	0,5	1	1	0,25	8	4	>32	4
[L5A,V16A]	0,5	0,5	0,5	1	1	0,25	8	4	>32	4

* медианное значение, полученное в трех независимых экспериментах

Для того, чтобы исследовать влияние введенных аминокислотных замен на взаимодействие пептидов с эукариотической мембраной, был проведен гемолитический тест в отношении эритроцитов человека (**Рисунок 9А**). Все модифицированные аналоги проявили сниженную активность по сравнению с PG-1 и Исегананом. Данные о гемолитической активности модифицированных аналогов были сопоставлены с данными измерения жизнеспособности клеток HaCaT после 24 ч инкубации с пептидами с помощью МТТ-теста (**Рисунки 9Б,В**). Нами была обнаружена высокая корреляция между снижением уровня гемолитической активности и повышением выживаемости тестовой культуры. В обоих исследованиях аналог [V14R] оказался менее активным по сравнению с [V16R].

Для оценки возможного терапевтического окна для исследуемых аналогов был проведен расчет терапевтического индекса (ТИ) (**Таблица 7**). Значение ТИ рассчитывали как соотношение значений минимальной гемолитической концентрации (МГК) и среднего геометрического МИК пептида (МИК(СГ)) в отношении всех исследованных штаммов. При этом МГК определяли как концентрацию пептида, вызывающую 2% гемолиза свежих человеческих эритроцитов. Если в концентрации 64 мкМ уровень гемолиза составлял менее 2%, для расчетов использовали значение 128 мкМ. Аналогично, использовали

значение 64 мкМ для расчета значения МИК(СГ) в случае, если в концентрации 32 мкМ МИК не достигался. По результатам расчета аналог [V16R] продемонстрировал самый высокий ТИ: он был значительно менее токсичен в отношении нормальных клеток, чем природный пептид, сохраняя практически тот же уровень антимикробной активности.

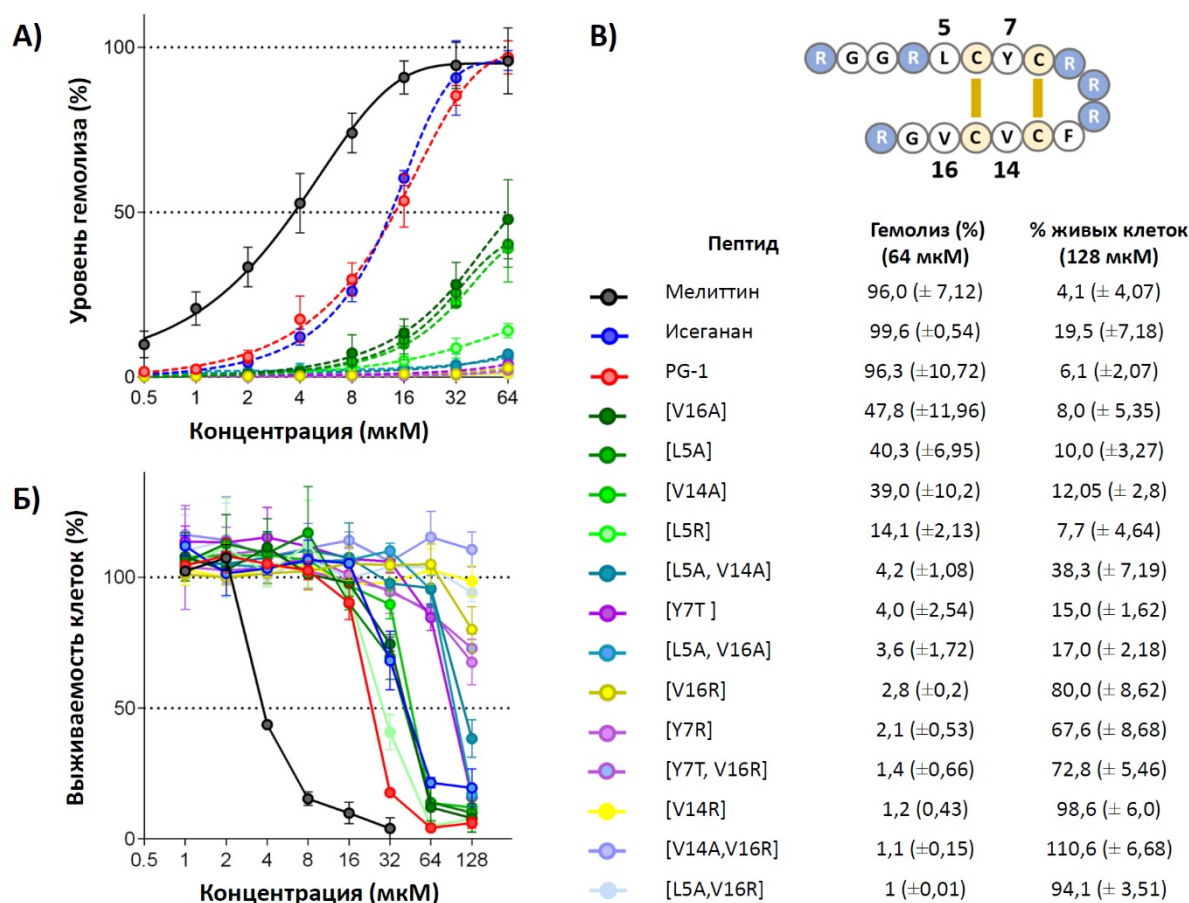


Рисунок 9. А) Гемолитическая активность пептидов после 1,5 ч инкубации. Анализ разрушения эритроцитов и высвобождения гемоглобина. Б) Цитотоксичность в отношении линии клеток HaCaT кератиноцитов человека после 18 ч инкубации (МТТ-тест). В) Значения гемолитической активности пептидов и выживаемости клеток HaCaT (МТТ-тест).

Таблица 7. Биологическая активность аналогов протегрина и их терапевтические индексы

	МГК	МИК(СГ)	ТИ*
PG-1	0,7	0,4	1,8
Исеганан	1	1,4	0,7
[L5R]	4,1	1,2	3,3
[L5A]	4,1	0,4	9,4
[V16R]	49,2	0,8	60,6
[V16A]	4,3	0,4	10,6
[V14R]	>64	9,8	13,0
[V14A]	5,5	0,4	13,5
[Y7R]	61,4	2,5	24,9
[Y7T]	33,5	4,4	7,6
[Y7T, V16R]	>64	21,1	6,1
[V14A, V16R]	>64	4,9	26,0
[L5A, V16R]	>64	4,9	26,0
[L5A, V14A]	18,8	4,5	4,2

[L5A,V16A]	11,9	4,5	2,7
------------	------	-----	-----

* Наибольшие значения ТИ указывают на более высокую селективность пептида.

Дальнейшее изучение механизма действия проводили для природного пептида PG-1 и двух аналогов - [V16R], продемонстрировавшего наибольшую селективность действия, и [V14R], активность которого оказалась в значительной степени снижена. В первую очередь, нами была исследована способность аналогов нарушать целостность мембран *E. coli* ML35p с использованием хромогенного субстрата ONPG (**Рисунок 10**). PG-1 продемонстрировал выраженный мембранолитический эффект в диапазоне концентраций, соответствующих его значениям МИК (**Рисунок 10А**), что хорошо согласуется с литературными данными об основном механизме действия этого пептида. Для аналога [V16R] наблюдаемый эффект отличался от такового у PG-1. Хотя значение МИК PG-1 и его аналога [V16R] в отношении *E. coli* ML35p были равными для обоих пептидов (0,25 мкМ), аналог [V16R] в этой концентрации почти не оказывал влияния на проникновение ONPG внутрь клетки (**Рисунок 10Б**). Это указывает на изменение механизма действия модифицированного пептида. Мы предполагаем, что указанная аминокислотная замена может препятствовать олигомеризации пептида, оказывая влияние на его взаимодействие с липидным бислоем. Эффекты, наблюдаемые для аналога [V14R], оказались еще более выраженными – пептид продемонстрировал крайне медленную кинетику разрушения мембраны (**Рисунок 10В**). По-видимому, из-за более центрального положения остатка V14 введение положительного заряда приводит к сильному электростатическому отталкиванию и предотвращает образование димеров, что значительно снижает активность данного варианта в отношении биологических мембран любого состава.

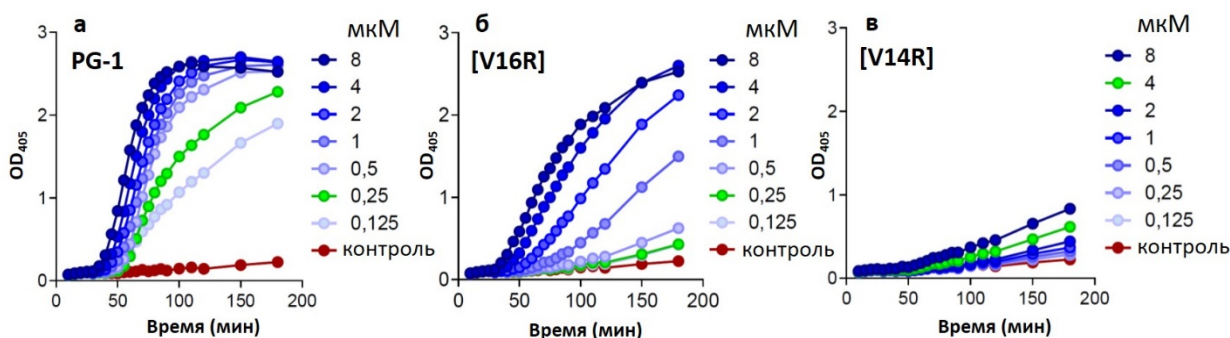


Рисунок 10. Влияние PG-1 и его аналогов в различных концентрациях на проницаемость мембран *E. coli* ML35p (анализ ONPG). Концентрация, соответствующая значению МИК в отношении *E. coli* ML35p, выделена зеленым цветом.

Способность PG-1 и аналога [V16R] к олигомеризации в различных средах оценивали с помощью спектроскопии КД и Фурье ИК. Спектры КД обоих пептидов в воде, этаноле и мицеллах ДФХ не имели существенных различий и свидетельствовали лишь о формировании выраженной β -структуры. Согласно данным Фурье ИК спектроскопии, оба пептида имеют достаточно схожую структуру в воде и этаноле, причем в этаноле можно предположить формирование пептидных димеров обоими аналогами. Сильное отличие в спектрах наблюдается только в присутствии мицелл ДФХ, имитирующих мембранное окружение. Здесь, по спектральным данным для PG-1 можно предположить образование октамерной структуры с компактной упаковкой тяжелей, подобно тому, как это было ранее показано Усачевым и соавт. (<https://doi.org/10.1007/s00249-016-1167-5>) для PG-5. Напротив, форма Фурье ИК спектра аналога [V16R] в мицеллах ДФХ остается подобной таковой в этаноле и больше соответствует димерной структуре. Это подтверждает предыдущее предположение о том, что введение дополнительного заряженного остатка аргинина в область одной из β -цепей PG-1 предотвращает плотную упаковку β -шпилек и их дальнейшую олигомеризацию.

Пептид [V16R], показавший самый высокий терапевтический индекс среди протестированных аналогов PG-1, был выбран в качестве кандидатного соединения для исследования на мышинной модели бактериальной инфекции. Для экспериментов на животных рекомбинантный пептид был получен в системе экспрессии ClearColi® BL21(DE3), не содержащей эндотоксинов. Дополнительно, для снижения неспецифической токсичности препарата, противоионы трифторацетата (TFA) были заменены хлорид-ионами. Эффективность пептида в модели мышинной септицемии была исследована совместно с ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. В исследовании были использованы группы по пять животных (**Рисунок 11**). В качестве положительного контроля был использован антибиотик ципрофлоксацин (10 мг/кг). Исследуемый пептид и контрольный антибиотик вводились двукратно в течение первого дня заражения. Для пептида была выбрана дозировка 5 мг/кг, поскольку отсутствуют данные о его *in vivo* токсичности. Внутривентральное инфицирование мышей BALB/c суспензией *E. coli* ATCC 25922 в присутствии муцина привело к гибели в течение двух дней четырех из пяти мышей, получавших контрольный раствор, и выживанию всех мышей, получавших ципрофлоксацин.

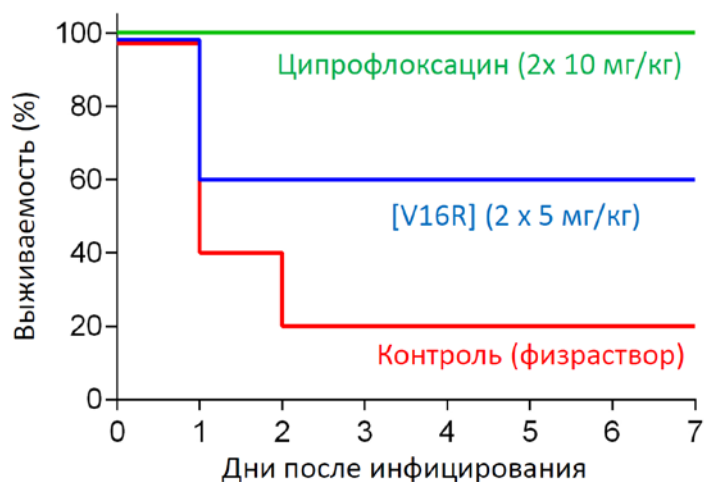


Рисунок 11. Исследование эффективности *in vivo* выбранного аналога протегрина-1 [V16R] в модели мышинной септицемии: показатели выживаемости мышей BALB/c (n = 5), внутривентрально инфицированных *E. coli* ATCC 25922 (10^6 бактерий в присутствии 2,5% муцина).

В модели мышинной септицемии была продемонстрирована терапевтическая эффективность, составляющая 60% (смерть двух из пяти мышей) после 7-дневного эксперимента, при двукратном введении аналога [V16R] в дозе 5 мг/кг. Для всех выживших животных после эвтаназии и контроля обсемененности селезенки колониеобразующие единицы *E. coli* обнаружены не были. Эти предварительные данные *in vivo* предполагают, что модифицированные аналоги β -шпилечных АМП являются перспективными кандидатами для создания антимикробных препаратов в отношении грамотрицательных бактерий. Пептид [V16R] является наиболее селективным аналогом с ТИ 60,2 (более чем в 30 раз выше, чем у природного PG-1), проявляет умеренную эффективность *in vivo* в качестве системного антибиотика и может рассматриваться как кандидатное соединение для дальнейшего проектирования лекарственного препарата.

Выводы

1. Разработаны биотехнологические способы получения ряда кателицидинов китопарнокопытных. Получены α -спиральный ChMAP-28, пролин-богатый mini-ChVac7.5N α и β -структурный гомодимер ChDode из лейкоцитов козы *Capra hircus*, а также β -шпилечные PcDode кашалота *Physeter catodon* и протегрин свиньи *Sus scrofa*. С целью изучения взаимосвязи структуры и биологических свойств АМП получены модифицированные варианты пептидов mini-ChVac7.5N α и протегрина, а также totally ^{15}N -меченые аналоги ChDode и PcDode.
2. Установлено, что бактериальный транспортер SbmA играет ключевую роль в процессе проникновения пролин-богатых АМП в грамотрицательные бактерии. Доказана определяющая роль С-концевого участка Vac7-подобных АМП, таких как VicVac альпаки *Vicugna pacos* и минибактенецин mini-ChVac7.5N α козы *Capra hircus*, в их способности к проникновению через бактериальную мембрану.
3. Показано, что β -структурные кателицидины широко представлены среди представителей отряда китопарнокопытных. Установлено, что пептид ChDode представляет собой β -структурный антипараллельный димер. Обнаружен и охарактеризован уникальный β -шпилечный додекапептид кашалота PcDode.
4. Изучено совместное действие пептидов, коэкспрессирующихся в лейкоцитах кателицидинов козы *Capra hircus*. Показано наличие выраженных синергических эффектов при совместном действии кателицидинов ChMAP-28 и mini-ChVac7.5N α , а также ChMAP-28 и ChDode. Установлено, что совместное применение первой пары АМП препятствует формированию бактериальной резистентности в отношении mini-ChVac7.5N α .
5. Изучено природное многообразие протегринов китопарнокопытных. Показано, что протегрины встречаются исключительно среди представителей подотряда свинообразных (лат. Suina). Проведено структурно-функциональное исследование протегрина свиньи *Sus scrofa* и получен ряд модифицированных вариантов протегрина с повышенной селективностью в отношении бактериальных клеток. Для лучшего из них значение терапевтического индекса более чем в 30 раз превосходит значение такового у природного протегрина. Антимикробная активность разработанного аналога протегрина подтверждена *in vivo* на модели мышины септицемии.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи:

1. **Bolosov I.A.**, Kalashnikov A.A., Pantelev P.V., Ovchinnikova T.V. Analysis of Synergistic Effects of Antimicrobial Peptide Arenicin-1 and Conventional Antibiotics. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2017, Vol. 162, No. 6, P. 765-768. DOI:10.1007/s10517-017-3708-z
2. Pantelev P.V., **Bolosov I.A.**, Kalashnikov A.A., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Emelianova A.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Combined Antibacterial Effects of Goat Cathelicidins With Different Mechanisms of Action. Frontiers in Microbiology, 2018, Vol. 9, P. 2983. DOI:10.3389/fmicb.2018.02983
3. **Bolosov I.A.**, Pantelev P.V., Sychev S.V., Sukhanov S.V., Mironov P.A., Myshkin M.Yu., Shenkarev Z.O., Ovchinnikova T.V. Dodecapeptide Cathelicidins of Cetartiodactyla: Structure, Mechanism of Antimicrobial Action, and Synergistic Interaction with Other Cathelicidins. Frontiers in Microbiology, 2021, Vol. 12, P. 725526. DOI:10.3389/fmicb.2021.725526
4. Pantelev, P. V., **Bolosov, I. A.**, Khokhlova, V. A., Dhanda, G., Balandin, S. V., Haldar, J., & Ovchinnikova, T. V. Analysis of Antibacterial Action of Mammalian Host-Defense

Cathelicidins and Induction of Resistance to Them in M β L-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2022, Vol. 172 No. 4, P. 447-452. DOI:10.1007/s10517-022-05411-8

5. Panteleev P.V., Safronova V.N., Kruglikov R.N., **Bolosov I.A.**, Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. A Novel Proline-Rich Cathelicidin from the *Alpaca vicugna* pacos with Potency to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria: Mechanism of Action and the Functional Role of the C-Terminal Region. Membranes, 2022, Vol. 12, No. 5, P. 515. DOI:10.3390/membranes12050515

6. **Bolosov I.A.**, Panteleev P.V., Balandin S.V., Shamova O.V., Ovchinnikova T.V. Structural and Functional Characteristics of the Proline-Rich Antimicrobial Peptide Minibactenecin from Leukocytes of Domestic Goat *Capra hircus*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2023, Vol. 174, No. 4, P. 440-445. DOI:10.1007/s10517-023-05725-1

7. **Bolosov I.A.**, Panteleev P.V., Sychev S.V., Khokhlova V.A., Safronova V.N., Toropygin I.Yu., Kombarova T.I., Korobova O.V., Pereskokova E.S., Borzilov A.I., Ovchinnikova T.V., Balandin S.V. Design of Protegrin-1 Analogs with Improved Antibacterial Selectivity. Pharmaceutics, 2023, Vol. 15, No. 8, P. 2047. DOI:10.3390/pharmaceutics15082047

Патенты:

1. Патент RU 2618850 от 11.05.2017. Плазмидный вектор pET-mChVac75Na, штамм бактерии *Escherichia coli* BL21(DE3)/ pET-mChVac75Na для экспрессии антимикробного пептида минибактенецина ChVac7.5Na и способ получения указанного пептида. Баландин С.В., **Болосов И.А.**, Пантелеев П.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Овчинникова Т.В.
2. Патент RU 2702661 от 09.10.2019. Пептид, проявляющий антибактериальные и противоопухолевые свойства, Пантелеев П.В., Емельянова А.А., **Болосов И.А.**, Баландин С.В., Шамова О.В., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В.
3. Патент RU 2778856 от 26.08.2022. Катионный пептид, проявляющий антибактериальные свойства, Пантелеев П.В., **Болосов И.А.**, Овчинникова Т.В.