

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный Научный Центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Сафронова Виктория Николаевна

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

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук
Овчинникова Татьяна Владимировна

Москва – 2026

Оглавление

Введение	5
1. Обзор литературы.....	12
1.1. История открытия, происхождение и эволюция антимикробных пептидов ..	12
1.2. Структурная классификация АМП	18
1.3. Механизмы действия и биологические функции АМП	21
1.4. Особенности биосинтеза АМП у животных	29
1.4.1. Семейство BRICHOS-ассоциированных белков	33
1.5. Перспективы применения АМП в медицине	44
1.5.1. Проблемы разработки препаратов на основе АМП для клинического применения.....	49
2. Материалы и методы.....	52
2.1. Оборудование	52
2.2. Реактивы и расходные материалы.....	52
2.3. Поиск АМП в транскриптомах полихет	53
2.4. Создание генно-инженерных конструкций, кодирующих АМП	54
2.5. Трансформация методом теплового шока	54
2.6. ПЦР-анализ клонов	55
2.7. Гетерологическая экспрессия и очистка АМП в составе гибридных белков ..	55
2.8. Анализ вторичной структуры АМП методом спектроскопии кругового дихроизма.....	57
2.9. Анализ замыкания дисульфидных связей	57
2.10. Определение антимикробной активности АМП.....	57
2.11. Исследование гемолитической и цитотоксической активности АМП.....	59
2.12. Оценка проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий	60
2.13. Получение и анализ бактериальных штаммов со сниженной чувствительностью к АМП	61
2.14. Оценка стабильности АМП в сыворотке крови.....	62
2.15. Оценка ингибирования формирования биопленок под действием АМП	62
2.16. Оценка действия АМП на предварительно сформированные биопленки	63
2.17. Электрохимические измерения на бислойных липидных мембранах.....	63
2.18. Определение скорости роста бактериальных культур	64

2.19. Сборка и получение комплекса LptD/LptE.....	64
2.20. SDS-PAGE и вестерн-блот анализ.....	68
2.21. Оценка связывания белковых молекул методом микротермофореза.....	69
2.22. Оценка деполяризации цитоплазматической мембраны	69
2.23. Исследования на животных	70
3. Результаты и обсуждение	71
3.1. Поиск новых BRICHOS-ассоциированных АМП.....	72
3.2. Получение новых АМП.....	75
3.3. Исследование биологической активности новых АМП.....	77
3.4. Изучение механизма действия обнаруженных АМП.....	88
3.5. Рациональный дизайн BRICHOS-ассоциированных β -шпигачных АМП.....	93
3.6. Изучение свойств модифицированных аналогов BRICHOS-ассоциированных АМП	99
3.6.1. Исследование протеолитической стабильности АМП	107
3.6.2. Антибиопленочная активность АМП	110
3.7. Исследование BRICHOS-ассоциированных АМП на животных моделях....	113
3.8. Исследование механизма действия Ar9 как наиболее перспективного отобранного АМП	119
4. Заключение.....	134
5. Выводы	136
6. Список литературы.....	138

Список сокращений

АМП – антимикробные пептиды;
ЛПС – липополисахариды;
МИК – минимальная ингибирующая концентрация;
ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
РС – фосфатидилхолин;
РГ – фосфатидилглицерин;
Патогены группы ESKAPEE – *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter. spp* и *E. coli*;
РЕ – фосфатидилэтаноламин;
СL – кардиолипин;
PS – фосфатидилсерин;
РАМР – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны;
РРР – паттерн-распознающие рецепторы;
IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
ТМ – трансмембранный регион;
SP – сигнальный пептид;
ONPG – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид;
LDAO – N-оксид лаурилдиметиламин;
OG – н-октил-бета-D-глюкопиранозид;
ОФ-ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматографии с обращенной фазой;
SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS;
ФБС – фетальная бычья сыворотка;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
CLD – кателин-подобный домен;
КД – спектроскопия кругового дихроизма;
БЛМ – бислойные липидные мембраны;
BME – β -меркаптоэтанол;
PI – пропидий йодид;
CV – кристаллический фиолетовый.

Введение

Актуальность темы исследования

Открытие пенициллина в 1928 году и последующее его внедрение в клиническую практику стало отправной точкой в развитии системного подхода к лечению бактериальных инфекционных заболеваний и положило начало «золотому веку» антибиотиков. Однако, применение многих из них в последнее время стало малоэффективным ввиду стремительного распространения резистентных штаммов бактерий [1]. Проблема антибиотикорезистентности усугубляется не только нерациональным использованием антибиотиков, но и относительно небольшим числом разработок новых антибактериальных средств [2]. В поисках решения возникшей проблемы новые противоинфекционные лекарственные средства создаются на основе уже открытых антибиотиков с помощью методов медицинской химии. Модификация структур известных препаратов стала преобладающей стратегией в создании новых антибактериальных агентов. Тем не менее, такой подход оказался лишь паллиативным решением, не обеспечивающим долгосрочную эффективность в условиях стремительного распространения устойчивых штаммов бактерий. Согласно данным за 2019 год, в США ежегодно регистрируется более 2,8 миллионов случаев инфекций, вызванных резистентными штаммами бактерий, из которых около 35 тыс. заканчиваются летальным исходом [3]. Это согласуется с анализом данных для 204 стран, опубликованным в журнале *The Lancet* в 2022 году, который показывает, что в настоящее время антибиотикорезистентность является одной из ведущих причин смертности, особенно в странах Африки и Южной Азии. В 2019 году антибиотикорезистентные бактериальные инфекции стали причиной смерти 1,27 миллиона человек, а еще 4,95 миллиона скончались от ассоциированных инфекций с участием нескольких различных возбудителей [4]. Доминирующими возбудителями бактериальных резистентных инфекций признаны *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, и *Pseudomonas aeruginosa*.

Согласно отчёту ВОЗ, опубликованному в июне 2024 года, за период с июля 2017 по декабрь 2023 года было одобрено 13 новых антибиотиков, 11 из которых являются производными известных классов, в отношении которых у бактерий уже

сформировались механизмы развития резистентности [5]. При этом ни один из новых препаратов не обладал принципиально новым механизмом действия и не был направлен на неизвестную ранее мишень, что указывает на научную и технологическую сложность разработки новых эффективных и безопасных антибактериальных агентов. Кроме того, практически ко всем новым соединениям появляется кросс-резистентность к существующим препаратам, за исключением лефамулина и комбинации ваборбактама с меропенемом, характеристики которых пока остаются противоречивыми.

На сегодняшний день полимиксины (полимиксин В и колистин) остаются одним из немногих классов антибиотиков, сохраняющих эффективность против мультирезистентных грамотрицательных бактерий. Однако, из-за выраженной нефро- и нейротоксичности их, как правило, применяют преимущественно в качестве терапии последней линии при инфекциях, угрожающих жизни. Несмотря на высокую активность полимиксинов против большинства грамотрицательных бактерий, некоторые виды, например, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Burkholderia spp* и *Serratia spp.*, обладают природной устойчивостью к ним ввиду конститутивного синтеза трансфераз, таких как EptA (PmrC), EptC, и ArnT. Эти ферменты катализируют реакцию модификации мишени действия полимиксинов – липида А, входящего в состав липополисахаридов (ЛПС) внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Модификация осуществляется путем присоединения к липиду А фосфоэтаноламина или 4-амино-дезоксi-L-арабинозы, что приводит к снижению общего отрицательного заряда ЛПС и уменьшению связывания с катионными полимиксинами. Кроме того, у ряда бактерий развились механизмы защиты, также направленные на уменьшение сродства полимиксинов к липиду А за счет аналогичных модификаций, которые контролируются двухкомпонентными системами PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB, а также на уровне экспрессии генов рядом регуляторных элементов, включая опероны *arnBCADTEF-pmrE* (известный как *pmrHFIJKLM-ugd*) и *pmrCAB*, и гены *crrAB* и *mgrB*. В последнее десятилетие у различных видов грамотрицательных бактерий были выявлены плазмидные гены, кодирующие фосфоэтаноламинтрансферазы (*mcr-1* – *mcr-10*), горизонтальный перенос которых значительно ускорил распространение резистентности к полимиксинам. Эти ферменты катализируют присоединение фосфоэтаноламина к

липиду А в позициях 1' и 4'. Стоит отметить, что *A. baumannii* может приобретать высокую устойчивость к полимиксинам за счет спонтанных мутаций в генах *lpxA*, *lpxC* и *lpxD*, участвующих в биосинтезе липида А, что приводит к полной утрате ЛПС. Незначительное снижение чувствительности к полимиксинам также может быть связано с: (i) повышенной продукцией анионных капсульных полисахаридов, например, у *K. Pneumoniae*; (ii) экспрессией эффлюксных систем, таких как MtrCDE у *N. meningitidis* и AcrAB и KpnEF у *K. Pneumoniae*; (iii) сверхэкспрессией белка внешней мембраны OprH, например, у *P. aeruginosa* [6–9]. В совокупности, эти данные свидетельствуют о глобальной проблеме распространения резистентности к полимиксинам среди грамотрицательных бактерий, что подчеркивает острую необходимость разработки новых антибактериальных агентов, обладающих высокой селективностью в отношении этих патогенов и улучшенным профилем безопасности.

Одним из перспективных подходов к преодолению проблемы антибиотикорезистентности является поиск и внедрение новых классов антибактериальных средств, демонстрирующих принципиально новые механизмы действия на клетки патогенов. Антимикробные пептиды (АМП) являются жизненно важными молекулярными факторами системы врождённого иммунитета, обеспечивающими защиту живых организмов от бактериальных, вирусных и грибковых инфекций [10]. Природное разнообразие биологических источников АМП охватывает весь спектр организмов – от прокариот до человека. У беспозвоночных животных защита от патогенов реализуется только врождённым иммунитетом, который связан с продукцией АМП в их клетках и тканях.

Особый интерес представляют полихеты – эволюционно древняя и сравнительно малоизученная с точки зрения разнообразия синтезируемых биологически активных молекул группа морских беспозвоночных животных, обитающая в условиях высокой микробной нагрузки (10^5 – 10^7 клеток/мл) и повышенной солёности воды, которая часто снижает активность многих природных АМП [11]. Поскольку полихеты не имеют экзоскелета или раковины, их покровы остаются уязвимыми к внешним воздействиям, что, вероятно, способствовало формированию эффективной системы иммунитета, основанной в том числе на секреции АМП эпидермальными клетками. Эти пептиды не только ингибируют рост

патогенных микроорганизмов, но и поддерживают баланс симбиотической микрофлоры. Проведенные нами исследования показывают, что для АМП полихет характерен биосинтез в составе белков-предшественников, содержащих консервативный BRICHOS-домен. Поиск АМП на основе данных о консервативных последовательностях в белках-предшественниках является перспективным подходом к обнаружению принципиально новых структурных семейств, представители которых могут обладать уникальной структурой и механизмом действия.

Цели и задачи работы

Целью данной 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 – Ap9 – был детально изучен механизм антибактериального действия, а также проведен анализ вероятности возникновения бактериальной резистентности и выявлены потенциальные пути

защиты клетки-мишени. В целом, Ap9 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).

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. – T. 50. – №. 3. – C. 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. – T. 14. – №. 3. – C. 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. – T. 21. – №. 12. – C. 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. – T. 49. – №. 3. – C. 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. – T. 20. – №. 8. – C. 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. – T. 20. – №. 3. – C. 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. – T. 18. №. 12. – C. 620. doi: 10.3390/md18120620.

1. Обзор литературы

1.1. История открытия, происхождение и эволюция антимикробных пептидов

Врожденный иммунитет представляет собой универсальную систему защиты организма от патогенов и играет ключевую роль в активации и регуляции адаптивного иммунного ответа. Изучение механизмов регуляции врожденного иммунитета у позвоночных и беспозвоночных животных позволяет глубже понять эволюцию их иммунных систем, а также обнаруживать новые биологически активные молекулы с терапевтическим потенциалом.

В начале 1960-х годов в связи с ростом числа мультирезистентных патогенных штаммов микроорганизмов и снижением эффективности используемых антибиотиков возрос интерес к природным соединениям, обладающим антимикробной активностью и участвующим в иммунной защите организма-продуцента. Именно этот период в ряде источников рассматривается как отправная точка в изучении АМП [12]. В 1962 году из кожи желтобрюхой жабы *Bombina variegata* впервые был выделен и описан АМП бомбинин – антимикробное соединение с гемолитической активностью [13]. Однако, только в 1987 году, после открытия Майклом Заслоффом и его коллегами магейнинов из зернистых кожных желез африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* АМП привлекли к себе внимание научного сообщества. С этого момента началось активное изучение АМП из кожи амфибий [14].

В начале 1970-х годов микробиолог Ханс Боман задался вопросом, каким образом организмы способны противостоять инфекциям, если скорость размножения бактерий значительно превышает темпы формирования иммунного ответа. Особый интерес при этом представляли насекомые, гемолимфа которых не содержит лимфоцитов и других клеток, участвующих в адаптивном иммунном ответе. Изучая механизмы иммунной защиты плодовой мухи *Drosophila melanogaster*, Боман с коллегами обнаружили индуцибельную бактерицидную активность гемолимфы, однако выделить активные компоненты им не удалось [15]. В связи с этим в качестве модели они выбрали гигантского шелкопряда *Hyalophora cecropia*, из каждой особи которого можно было получить до 1 мл гемолимфы. В ней

выявили три антимикробных вещества: лизоцим, ранее описанный Александром Флемингом, а также два термо- и кислотоустойчивых катионных пептида Р9А и Р9В с молекулярной массой около 4 кДа [16]. Впоследствии эти α -спиральные пептиды были названы цекропинами, открытие которых положило начало всестороннему исследованию АМП.

Некоторые источники связывают открытие АМП эукариот с ранними исследованиями защитных систем растений. Еще в 1896 году было обнаружено, что пшеничная мука содержит вещество, подавляющее рост хлебопекарных дрожжей. Однако только в 1942 году из эндосперма пшеницы *Triticum aestivum* был выделен пептид, ингибирующий рост фитопатогенных бактерий *Pseudomonas solanacearum* и *Xanthomonas campestris*. В середине 1970-х годов данное соединение получило название пуротионин. Позднее его отнесли к семейству тионинов – классу АМП, широко распространенных среди растений [17].

В конце 1970-х – начале 1980-х годов несколько исследовательских групп сообщили об открытии ряда АМП, выделенных из лейкоцитов кроликов и человека. Эти соединения, получившие название α -дефенсины, стали одними из первых известных АМП, стабилизированных внутримолекулярными дисульфидными связями. Спустя несколько лет были идентифицированы β -дефенсины, выделенные из гранулоцитов крупного рогатого скота, а также θ -дефенсины из лейкоцитов макаки-резус (*Macaca mulatta*) [18]. Дальнейшие исследования привели к открытию кателицидинов – семейства АМП, синтезируемых в виде неактивных белков-предшественников [19].

Интересным наблюдением, приведенным в ранних исследованиях АМП, является то, что их минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в условиях *in vitro* зачастую значительно превышали физиологический уровень в организме. Это может быть связано с тем, что в очагах воспаления АМП способны накапливаться в высоких локальных концентрациях, достаточных для подавления роста патогенов, а также действовать синергически с другими АМП и компонентами иммунной системы. В последние десятилетия было показано наличие синергических эффектов для различных АМП, например, для магейнина и PGLa из *Xenopus laevis*, а также LL-37 и индолицидина, продуцируемых разными видами млекопитающих [20].

После открытия магейнинов было установлено, что кожный секрет различных видов лягушек содержит широкий спектр АМП, количество которых варьируется от 10 до 20, а также другие биологически активные соединения, такие как нейропептиды и феромоны. В одном из ранних исследований был проведен анализ филогенетических связей между АМП, обнаруженными у представителей семейства квакш из Южной Америки, Австралии и семейства настоящих лягушек из Азии, Северной Америки и Европы. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков-предшественников АМП каеринов, относящихся к семейству препродермасептинов, показал высокую степень консервативности N-концевых препропоследовательностей и значительное разнообразие С-концевых доменов, ответственных за антибактериальную активность. Анализ филограмм позволил выделить три отдельных кластера генов препродермасептинов и подтвердить их происхождение от общего предкового локуса, подвергнувшегося последующим раундам дупликации и дивергенции. Филогенетический анализ и историческая биогеография семейства лягушек указывают на древнее происхождение генов препродермасептинов, которые, вероятно возникли до отделения Индийского субконтинента и Южной Америки от Африки. Предполагается, что возраст этих генов превышает 150 млн лет. Дополнительные исследования показали, что высокая частота мутаций в области белка-предшественника АМП привела к гипервариабельности С-концевого домена, что объясняет разнообразие пептидов у этих видов лягушек [21,22]. Полученные данные свидетельствуют о том, что широкий спектр АМП, продуцируемых семействами квакш, настоящими лягушками и другими группами лягушек, представляет собой пример успешной эволюции молекулярных факторов и механизмов врожденного иммунитета, способствующих поддержанию стабильности кожной микробиоты хозяина и ограничивающих формирование устойчивости у микроорганизмов [23].

В отличие от вышеупомянутых пептидов, продуцируемых организмами одного таксономического порядка, дефенсины имеют широкое распространение среди эукариот [24–26]. Дефенсины обнаружены у большинства многоклеточных организмов, включая растения, грибы, насекомых, моллюсков, паукообразных, млекопитающих и людей. В процессе эволюции дефенсины претерпели значительные изменения и приобрели новые функции в различных таксономических

группах. Сходство их аминокислотных последовательностей, пространственных структур и механизмов действия позволило предположить, что все дефенсины различных организмов имеют общее эволюционное происхождение [27,28]. Например, растительные дефенсины демонстрируют структурное сходство с аналогичными пептидами у насекомых, в то время как дефенсины, обнаруженные у грибов – с пептидами, выделенными из беспозвоночных. Обнаружение дефенсинов у ранних эукариот позволило предположить существование предкового гена, возникшего задолго до появления грибов и насекомых [29]. Одним из подтверждений этой гипотезы стало обнаружение у представителей различных филогенетических групп консервативного структурного γ -мотива ($GXCX_{3-9}C$, где X является любой аминокислотой) в аминокислотных последовательностях, стабилизированных дисульфидными связями АМП, включая дефенсины [30,31]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что дефенсины млекопитающих, растений, грибов и беспозвоночных могли произойти от общего предшественника, который существовал более 2,6 млрд лет назад [32].

Эволюционные связи между дефенсинами позвоночных и беспозвоночных остаются недостаточно изученными. Тем не менее, на основании анализа их аминокислотных последовательностей и пространственных структур предполагается, что β -дефенсины позвоночных могут быть эволюционно связаны с «большими» дефенсинами, встречающимися исключительно у беспозвоночных. «Большие» дефенсины представляют собой эволюционно консервативное семейство АМП, впервые описанное у ракообразных и впоследствии обнаруженное также у моллюсков и ланцетников (амфиоксов). Они обладают амфифильными свойствами и имеют гидрофобную N-концевую область, активную против грамположительных бактерий, а также гидрофильный C-концевой регион, эффективный в отношении грамотрицательных [33,34]. C-Концевая часть формирует трёхцепочечный β -лист, стабилизированный тремя дисульфидными связями, и демонстрирует структурное сходство с β -дефенсинами млекопитающих, которые также проявляют активность в отношении грамотрицательных бактерий. Это свидетельствует о возможной эволюционной связи между двумя типами дефенсинов, которая, предположительно, могла возникнуть в результате перестановки экзонов [35]. Важно отметить, что оба конца аминокислотных последовательностей «больших» дефенсинов необходимы

для проявления их антибактериальной активности. Удаление N-концевой области приводит к утрате активности C-концевого фрагмента в отношении грамположительных бактерий. В свою очередь, α -дефенсины были обнаружены у ограниченного числа видов, включая человека и лошадей. У представителей других крупных млекопитающих, например, таких как крупный рогатый скот и собаки, гены α -дефенсинов отсутствуют. Причины такой избирательности остаются невыясненными, однако предполагается, что эти АМП возникли после расхождения класса млекопитающих на различные подклассы, инфраклассы и отряды [36]. На основании пространственной близости генов α - и β -дефенсинов на хромосоме, а также их структурного и функционального сходства, предполагается, что α -дефенсины появились в результате дупликации генов β -дефенсинов и последующего позитивного отбора [37]. Первоначально их происхождение относили ко времени до расхождения плацентарных и сумчатых млекопитающих (~130 млн лет назад), однако обнаружение α -дефенсинов у утконоса позволило уточнить дату их появления ~210 млн лет назад, до разделения однопроходных и териев [38,39]. Кроме того, предполагается, что мутации в генах α -дефенсинов привели к формированию генов θ -дефенсинов, которые экспрессируются исключительно у макаков-резусов и бабуинов [25]. У человека и его ближайших эволюционно родственных биологических видов, включая шимпанзе и горилл, гены θ -дефенсинов представлены в виде псевдогенов, которые транскрибируются, но не транслируются из-за наличия стоп-кодона, вызывающего преждевременную терминацию биосинтеза [40]. Эти псевдогены, по-видимому, возникли более 30 млн лет назад в ходе эволюции [41]. Таким образом, дефенсины являются ключевыми компонентами врожденного иммунитета, эволюция которых привела к значительному расширению спектра антимикробной активности [42].

АМП имеют древнее эволюционное происхождение, и естественный отбор сыграл ключевую роль в формировании их структурного и функционального разнообразия [43]. Эволюция АМП и развитие механизмов устойчивости микроорганизмов поддерживает динамическое равновесие между организмом-хозяином и патогеном, способствуя формированию репертуара соединений с высокой специфичностью. Например, растения и люди чувствительны к различным патогенам, что связано с появлением дефенсинов с определенными свойствами. У

растений, часто подверженных грибковым инфекциям, защитные молекулы ориентированы на борьбу с грибами, в то время как у людей, более уязвимых к бактериальным инфекциям, формируется защита в виде антибактериальных дефенсинов [44]. Положительный отбор способствует сохранению дублицированных генов, которые подвергаются эволюционным изменениям для выполнения новых или более специализированных функций. Например, некоторые растительные дефенсины не обладают противогрибковой активностью, но ингибируют фермент α -амилазу, встречающийся в кишечнике насекомых. Предполагается, что ингибирование активности α -амилазы делает растения трудноперевариваемыми, что способствует их защите от насекомых [45]. У некоторых позвоночных животных β -дефенсины, возникшие в результате дубликации генов, подверглись функциональной дивергенции. У утконоса, одного из немногих ядовитых млекопитающих, эти пептиды стали компонентами яда [46]. Аналогичные пептиды, происходящие от β -дефенсинов, были обнаружены у некоторых ядовитых змей и ящериц, что свидетельствует о конвергентной эволюции токсических функций у неродственных видов. Также у утконоса гены β -дефенсинов экспрессируются не только в ядовитых бедренных железах, но и в других тканях, что указывает на их возможное участие в иных биологических процессах [47]. Следует отметить, что у ряда позвоночных животных β -дефенсины утратили антимикробную активность, что отражает их эволюционное функциональное разнообразие [48].

Таким образом, АМП, обладающие различными биологическими функциями, представляют собой соединения с уникальными свойствами, которые не только способствуют более глубокому пониманию механизмов эволюции и адаптации организмов к различным патогенным микроорганизмам, но и служат перспективной основой для разработки новых терапевтических средств.

1.2. Структурная классификация АМП

Для изучения пространственной организации и механизма действия АМП применяются различные экспериментальные методы, такие как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия. В дополнение к этим методам также применяются вычислительные подходы, например, молекулярное моделирование и докинг, используемые для более детального анализа взаимодействия пептидов с биологическими мишенями [49].

АМП можно классифицировать по принадлежности к организму, спектру биологической активности, однако чаще всего применяют подход, учитывающий их вторичную и третичную структуры. В соответствии с пространственной организацией пептидов выделяют четыре основных класса: 1) АМП, приобретающие преимущественно α -спиральную структуру (**Рисунок 1А**); 2) АМП, содержащие β -слои (**Рисунок 1Б**); 3) АМП со смешанной структурой, включающей элементы как α -спиралей, так и β -тяжей (**Рисунок 1В**); 4) неструктурированные АМП, обогащенные определенными аминокислотными остатками, например, остатками Gly, Pro, His, Trp, Arg (**Рисунок 1Г**).

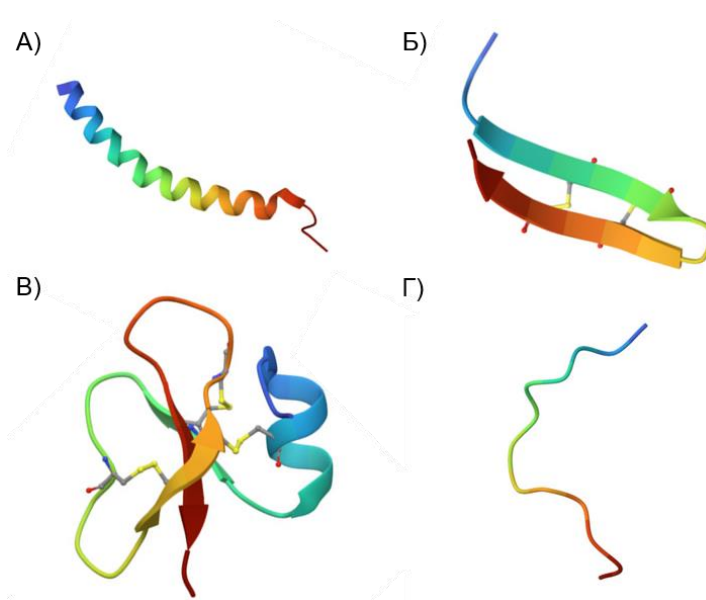


Рисунок 1. Структурное разнообразие АМП. А) α -Спиральный LL-37 человека (PDB 2K6O). Б) β -Шпильчатый протегрин-1 свиньи (PDB 1PG1). В) β -Дефенсин-2 человека с $\alpha\beta$ -структурным мотивом (PDB 1FD3). Г) Неструктурированный индолицидин быка (PDB 1G89).

Большинство α -спиральных АМП приобретают упорядоченную структуру только при взаимодействии с мембранами или средами, имитирующими их свойства. Например, к числу наиболее изученных представителей этого класса относятся кателицидин человека LL-37, магейнины из кожи лягушки *Xenopus laevis*, а также мелиттин – основной компонент яда медоносной пчелы *Apis mellifera* [50,51]. Ключевым фактором мембранной активности α -спиральных АМП является их амфифильность, способствующая нарушению целостности мембраны за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий [52]. Эти пептиды, как правило, принимают конформацию α -спирали с расстоянием между аминокислотами около 0,15 нм и углом поворота примерно 100°, что имеет решающее значение для их взаимодействия с мембранами [53]. Нарушение этой структуры, например в результате замены ключевых аминокислот, приводит к значительному снижению антибактериальной активности пептидов.

Вторая группа включает пептиды, содержащие β -листы, стабилизированные дисульфидными связями, обеспечивающими поддержание пространственной структуры и сохранение антимикробной активности АМП [54]. Дополнительная стабильность структур также может обеспечиваться солевыми мостиками и циклизацией по типу «голова-к-хвосту». В отличие от α -спиральных АМП, претерпевающих конформационные изменения при взаимодействии с мембранами, β -шпильчатые пептиды сохраняют стабильность в мембранном окружении [55]. К этой группе относятся β -шпильчатые пептиды, например, протегрины, а также циклические пептиды (θ -дефенсины). β -Шпильчатые пептиды состоят из антипараллельных β -цепей, связанных дисульфидными мостиками [56]. К числу наиболее известных представителей этой группы относятся тахиплезин-1, полифемузин-1, гомезин, протегрины и ареницины. Дефенсины, обладающие широким спектром активности в отношении бактерий, грибов и вирусов, представляют собой одно из наиболее изученных семейств АМП. Для α -дефенсинов характерно образование дисульфидных связей между остатками Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 и Cys3-Cys5, в то время как в β -дефенсидах они формируются между Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 и Cys3-Cys6. Для θ -дефенсинов характерен циклический пептидный остов, стабилизированный перекрёстными дисульфидными связями, образующими структуру, известную как «цистеиновая лестница» [57]. Циклические

пептиды обладают повышенной стабильностью, что способствует их более эффективному связыванию с мишенями за счёт увеличенной площади взаимодействия и ограниченной конформационной подвижности [58]. Например, дисульфидные связи и циклическая структура человеческого θ -дефензина-1 (ретроциклина-1) способствуют его высокой аффинности к рецепторам CD4, галактозилцерамиду и гликопротеину gp120, что препятствует проникновению ВИЧ-1 в клетки [59].

Третья группа представлена АМП с $\alpha\beta$ -структурным мотивом ($CS\alpha\beta$), стабилизированным тремя или четырьмя дисульфидными связями. Этот мотив был впервые обнаружен в антибактериальных дефенсинах насекомых и нейротоксинах скорпионов и включает α -спираль и β -лист, состоящий из двух или трех антипараллельных β -цепей [60,61]. Дефенсины, содержащие $CS\alpha\beta$ -мотив, также выявлены у растений и проявляют противогрибковую активность [62]. В этих амфипатических структурах положительно заряженные остатки, как правило, располагаются в α -спиралях, тогда как β -слой в основном состоит из гидрофобных аминокислот [63]. Одним из примеров АМП с такой структурой является плектазин, выделенный из сапрофитного гриба *Pseudoplectania nigrella* [64]. В отличие от пептидов, действующих на мембраны патогенов, плектазин избирательно связывается с липидом II, ингибируя синтез клеточной стенки бактерий [65].

Большинство АМП находятся в неструктурированном состоянии в водном растворе, однако способны приобретать определённую пространственную структуру в зависимости от условий окружающей среды. Например, катионный амфипатический пептид GL13K в водном растворе неупорядочен, но при взаимодействии с цвиттерионными мембранами на основе мицелл фосфатидилхолина (PC) принимает α -спиральную структуру, а в присутствии анионных мембран, содержащих фосфатидилглицерин (PG), приобретает конформацию β -слоя [66]. Многие АМП с неупорядоченной структурой принадлежат к семейству кателицидинов. Например, индолицидин, содержащий большое количество остатков триптофана и выделенный из нейтрофилов быка [67,68].

1.3. Механизмы действия и биологические функции АМП

Несмотря на активное изучение свойств АМП, их пространственная структура и механизм действия были определены лишь для сравнительно небольшой части из них. На сегодняшний день большинство известных АМП представляют собой катионные пептиды, как правило, имеющие длину от 10 до 50 аминокислотных остатков и обладающие амфифильными свойствами. Их антибактериальное действие реализуется, в основном, путём нарушения целостности цитоплазматической мембраны клетки-мишени. В зависимости от характера взаимодействия АМП с мембранами выделяют три основные модели механизмов их действия: «бочка из клёпок» (barrel-stave), тороидальная пора (toroidal pore) и ковровая модель (carpet model), **Рисунок 2** [69–71]. Также рассматривается модель агрегатного канала (aggregate model), при которой АМП спонтанно образуют неупорядоченные агрегаты на поверхности мембраны патогена. Эти структуры дестабилизируют бислой, способствуя образованию каналов в мембране, через которые происходит утечка содержимого цитоплазмы и, в конечном итоге, нарушается целостность клетки [72].

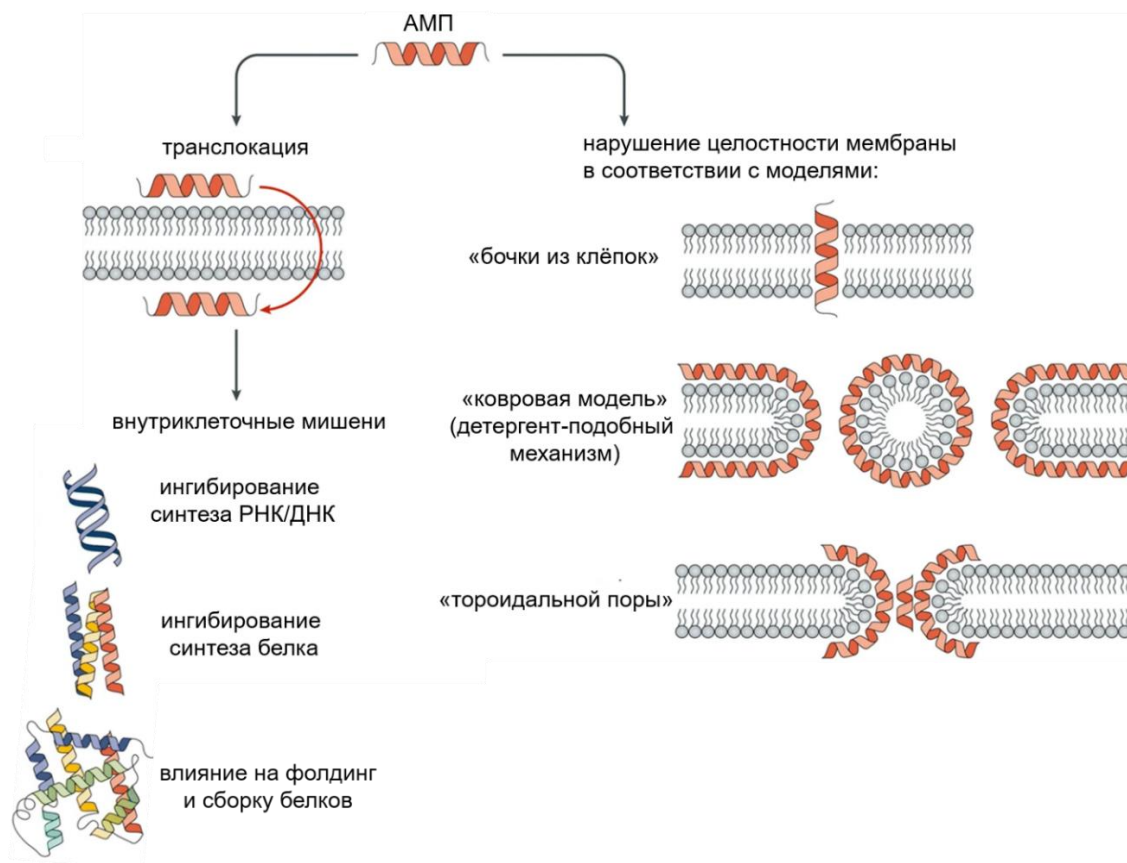


Рисунок 2. Модели механизмов антибактериального действия АМП.

Согласно модели «бочки из клёпок» АМП нарушают целостность мембраны бактерий, образуя трансмембранные поры. На первом этапе катионные пептиды связываются с отрицательно заряженными липидами внешней мембраны за счёт электростатических взаимодействий. По мере увеличения локальной концентрации пептидов они меняют свою ориентацию и погружаются перпендикулярно в липидный бислой. Это приводит к формированию олигомерных пор, внутренняя часть которых представлена гидрофильными аминокислотными остатками, а внешняя – гидрофобными, взаимодействующими с липидными хвостами. Такая организация пор приводит к утечке ионов и воды, что вызывает осмотический дисбаланс, потерю энергии и, в конечном итоге, приводит к гибели клетки. Единственным известным пептидом, механизм действия которого согласуется с данной моделью остается аламетицин [73]. Предполагалось, что магейнин-2 также действует по этому принципу, однако позже было показано, что он формирует тороидальные поры в мембране, как будет описано далее [74].

Характерной особенностью модели «тороидальной поры» является то, что АМП после связывания с мембраной погружаются в липидный бислой, вызывая перераспределение полярных головок липидов и локальное искривление бислоя, что приводит к образованию временных пор. В отличие от трансмембранных каналов, состоящих только из пептидов, тороидальные поры представляют собой менее стабильные динамические структуры, в формировании которых участвуют фосфолипидные головки. Образование и устойчивость таких пор зависит от электростатических и гидрофобных взаимодействий, а при критическом накоплении АМП мембрана теряет структурную целостность, что приводит к её разрушению и гибели клетки. Данный механизм реализуется у таких АМП, как магейнин-2, протегрины, мелиттин и лактицин Q [75,76].

В соответствии с моделью «коврового механизма» АМП равномерно распределяются по поверхности мембраны без формирования структурированных пор. При достижении критической концентрации (пептидный «ковёр») изменяется текучесть липидного бислоя, что приводит к потере его целостности, разрыву мембраны и образованию липид-пептидных мицелл, что аналогично действию детергентов. Такой механизм действия реализуется у АМП, таких как цекропины, кателицидин LL-37, индолицидин и другие пептиды со слабо выраженными

амфифильными и гидрофобными свойствами, ограничивающими их способность глубоко проникать в мембрану [77].

Стоит отметить, что для АМП характерна относительно низкая вероятность развития резистентности к ним. Однако, за длительное время эволюции бактерии смогли выработать защитные механизмы, снижающие эффективность этих пептидов [78,79]. Развитие резистентности к АМП может происходить несколькими путями: изменением физико-химических свойств мембран, секрецией протеаз, повышением активности эффлюксных систем, включением экзогенных молекул в мембрану, метаболическими изменениями, усилением экспрессии факторов вирулентности и образованием биоплёнок [80–83]. При этом одним из первых этапов, обеспечивающих снижение чувствительности к АМП, является изменение структуры и электрофизиологических параметров бактериальных мембран. Такая модификация без потери функциональных особенностей мембран достаточно маловероятна, поэтому данный механизм устойчивости не является критическим для АМП и приводит к незначительному или умеренному уровню резистентности, в том числе, и ввиду наличия нескольких мишеней действия АМП [84,85]. Кроме того, неспецифический механизм и быстрота действия АМП также затрудняют развитие резистентности, поскольку бактерии не всегда успевают сформировать эффективные защитные механизмы [78,86,87].

Появляется все больше данных о существовании внутриклеточных мишеней действия АМП [88]. Несмотря на то, что механизмы транслокации пептидов через цитоплазматическую мембрану без ее разрушения остаются малоизученными, известно, что некоторые АМП способны преодолевать данный барьер различными путями. Среди них выделяют транспорт через мембранные белки-переносчики и прямое проникновение, характерное для индолицидина и буфорина 2. Однако, для последнего также сообщается о возможном формировании короткоживущих тороидальных пор, не нарушающих целостность мембраны и не приводящих к утечке содержимого клетки [89]. Одним из хорошо изученных примеров являются пролин-богатые АМП, которые проникают в цитоплазму бактерий с помощью ABC-транспортера SbmA, распространенного среди *Enterobacteriaceae*, а также при участии VacA, обнаруженного у *Mycobacterium*, *Brucella abortus* и *Sinorhizobium meliloti*. В транспорте некоторых пептидов, помимо SbmA, участвуют также

транспортеры MdtM/YjiL, обеспечивающие транслокацию Tur1A, Bac7 и онкоцина, тогда как транспорт арасина осуществляется с участием YgdD [90,91]. После проникновения через цитоплазматическую мембрану АМП взаимодействуют с молекулярными мишенями, такими как нуклеиновые кислоты, субъединицы рибосом и белки-шапероны. Кроме того, пептиды могут нарушать важные клеточные процессы, включая метаболизм белков, деление клетки и синтез клеточной стенки [92]. Так, индолицидин связывается с дуплексом ДНК с помощью центрального мотива PWWP, что приводит к ингибированию репликации и транскрипции ДНК патогена [93]. Буфорин 2 проникает в липидные везикулы *in vitro*, не нарушая их целостность, после чего связывается с ДНК и РНК [94]. Помимо связывания с нуклеиновыми кислотами некоторые АМП способны взаимодействовать с субъединицами рибосом бактерий, что приводит к ингибированию биосинтеза белка. Например, пролин-богатые АМП действуют в соответствии с двумя основными механизмами: 1) блокирование пептидилтрансферазного центра, что препятствует первой стадии элонгации трансляции (характерно для Bac7, Onc112, Tur1A); 2) ингибирование терминации трансляции за счет связывания с фактором терминации RF1, что свойственно апидацину 1b и Api137 [95]. Наряду с этим, АМП могут ингибировать активность бактериальных внутриклеточных ферментов. Например, индолицидин помимо прямого связывания с ДНК инактивирует ДНК-топоизомеразу I, что нарушает процесс релаксации ДНК [96]. Микроцин J25 (MccJ25) связывается со вторичным каналом РНК-полимеразы, блокируя фолдинг триггерного элемента и перекрывая поступление субстратов, что приводит к ингибированию активности фермента и, как следствие, к подавлению роста бактерий [97]. В работе [98] показано, что LL-37 ингибирует активность пальмитоилтрансферазы PagP, участвующей в поддержании барьерных свойств внешней мембраны грамотрицательных бактерий посредством ацилирования липида А.

АМП могут нарушать корректный фолдинг и сборку белков, а также вмешиваться в ключевые клеточные процессы. Например, дрозозин и апидацин связываются с белком теплового шока DnaK, ингибируя его АТФазную активность и препятствуя фолдингу шаперон-ассоциированных белков [99,100]. Помимо этого, некоторые пептиды способны влиять на процесс клеточного деления. Так, темпорин

L ингибирует как ГТФазную активность, так и полимеризацию гомолога тубулина FtsZ, участвующего в ключевом этапе формирования Z-кольца на ранней стадии клеточного деления *E. coli* [101,102]. Еще один механизм регуляции деления клеток реализуется через двухкомпонентную систему PhoP/PhoQ. Показано, что в сублетальных концентрациях пептид C18G нарушает процесс клеточного деления *E. coli* через активацию трансмембранного сенсора PhoQ, что приводит к повышенной экспрессии белка QueE, который связывается с дивисомой и блокирует септацию [103].

Подобно классическим антибиотикам, например, ванкомицину, АМП могут ингибировать процесс синтеза клеточной стенки бактерий. Липид II, являющийся консервативным элементом клеточной стенки бактерий, представляет собой предшественник пептидогликана и служит мишенью действия как гликопептидов, так и АМП [104]. Например, низин, пептид из семейства бактериоцинов, подавляет рост грамположительных бактерий посредством связывания с пиррофосфатным фрагментом липида II с последующим формированием поры в мембраны [105]. Подобный механизм действия также характерен для некоторых представителей семейства дефенсинов [106].

Грамотрицательные бактерии представляют собой более сложные мишени для терапии ввиду наличия дополнительной наружной мембраны, ограничивающей проникновение многих антибиотиков [107]. При этом АМП демонстрируют высокую активность в отношении грамотрицательных патогенов группы ESKAPEE (*E. faecium*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter. spp* и *E. coli*), которые обуславливают множественную лекарственную устойчивость и ответственны за большинство внутрибольничных и опасных для жизни инфекций [108]. Одним из факторов, затрудняющих лечение инфекционных заболеваний, вызванных бактериями данной группы, является их способность формировать биоплёнки как на биотических, так и на абиотических поверхностях. Биоплёнки представляют собой сообщество микробных клеток, окруженных самопроизводимым внеклеточным полимерным матриксом, который защищает их от неблагоприятных условий и воздействий. АМП действуют не только на планктонные культуры бактерий, но и способны подавлять процесс формирования биоплёнок и уничтожать бактерии внутри них [109,110]. Предположительно, АМП

реализуют свои функции с помощью различных молекулярных механизмов: 1. Влияние на трансмембранный потенциал клеток патогенов внутри биоплёнок. АМП семейства бактериоцинов, таких как низин А и лактицин Q, формируют стабильные поры в мембране клеток *S. aureus* внутри биоплёнок, что приводит к утечке ионов, потере мембранного потенциала и, как следствие, к гибели клеток [111]. 2. Нарушение системы межклеточной коммуникации (кворум-сенсинга). Так, LL-37 может стимулировать «подёргивание» – форму подвижности, регулируемую пилиями IV типа, и влиять на две основные системы кворум-сенсинга Las и Rhl, подавляя ключевые гены [112]. 3. Деградация внеклеточного полимерного матрикса. Гепсидин 20 в концентрациях, не превышающих МИК, способен изменять структуру биоплёнок *S. epidermidis* и снижать их массу [113]. 4. Ингибирование строгого ответа бактериальной клетки на стресс, опосредованного синтезом сигнальных нуклеотидов (алармонов) гуанозинтетрафосфата (ppGpp) и гуанозинпентафосфата (pppGpp) в условиях аминокислотного голодания, дефицита жирных кислот и других стрессовых факторов [114]. В результате происходит нарушение транскрипции, перестройка метаболизма и замедление роста бактерий. Например, пептид 1018 связывает сигнальные молекулы ppGpp, так и pppGpp, что не только ингибирует образование биоплёнок, но и способствует гибели клеток внутри них [115].

Селективность действия АМП обусловлена значительными различиями в биохимическом составе и электрофизиологических характеристиках мембран эукариотических и бактериальных клеток. У грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, наружная мембрана содержит отрицательно заряженные ЛПС, тогда как ее внутренний слой преимущественно состоит из цвиттер-ионного фосфатидилэтаноламина (PE, 70-80%) и анионных липидов PG (20-25%) и кардиолипина (CL, ~ 5%), что обеспечивает отрицательный поверхностный заряд [116,117]. У грамположительных бактерий, не имеющих наружной мембраны, отрицательный заряд поверхности формируют тейхоевые и липотейхоевые кислоты клеточной стенки. Для мембран эукариот характерна выраженная асимметрия распределения фосфолипидов, поддерживаемая флиппазами, флоппазами и скрамблазами; наружный слой преимущественно представлен нейтральными фосфолипидами PC и сфингомиелином, тогда как отрицательно заряженные

липиды, такие как фосфатидилсерин (PS), локализованы во внутреннем слое [118,119]. В результате, внешняя поверхность мембран клеток млекопитающих имеет более нейтральный заряд и менее восприимчива к действию АМП. Дополнительную устойчивость обеспечивает холестерин, который снижает текучесть и проницаемость липидного бислоя эукариотических мембран. Кроме того, различия в трансмембранном потенциале способствуют селективности: для бактерий он составляет от -130 до -150 мВ, а у клеток млекопитающих – от -90 до -110 мВ [120–122].

Помимо прямого действия на микроорганизмы, АМП функционируют как ключевые факторы врождённой иммунной системы и способны не только стимулировать иммунный ответ, но и предотвращать неконтролируемое воспаление [123]. Механизмы регуляции системы врождённого иммунитета инициируются при распознавании высококонсервативных структур – патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) соответствующими паттерн-распознающими рецепторами (PRR). Среди PAMP наиболее известны ЛПС грамотрицательных бактерий и тейхоевые/липотейхоевые кислоты, связанные с пептидогликаном и входящие в состав мембраны грамположительных бактерий [124]. При этом, ЛПС стимулирует провоспалительный ответ более выражено, чем компоненты мембраны грамположительных бактерий, и является наиболее распространенным бактериальным медиатором при сепсисе и септическом шоке [125]. ЛПС состоит из трех основных компонентов: 1) липида А, выполняющего роль гидрофобного якоря, включающего глюкозамин, фосфатные группы и остатки жирных кислот; 2) полисахаридного ядра, содержащего остатки гептозы и 3-дезоксид-маннооктулозоновой кислоты; 3) О-антигенной (О-специфической) полисахаридной цепи, обеспечивающей серологическую вариабельность бактерий [126]. Известно, что липид А – наиболее иммуногенная и консервативная часть ЛПС, распознавание которой эволюционно закрепилось в иммунной системе, а его взаимодействие с рецепторным комплексом CD14/TLR4/MD2 инициирует сигнальный каскад, приводящий к экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов [127,128]. Возможное участие АМП в регуляции иммунного ответа объясняется их влиянием на различные звенья иммунной системы, включая активацию макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток и систему комплемента, а также на продукцию

цитокинов и хемокинов [129]. В частности, ареницин-1 в зависимости от концентрации способен модулировать *in vitro* активность системы комплемента: при 3,5 – 14,5 мкМ происходит его активация, тогда как при 29 – 58 мкМ пептид проявляет ингибирующие свойства [130]. Некоторые АМП человека, включая α - и β -дефенсины, способны привлекать лейкоциты к месту инфекции или воспаления [131]. Кателицидин человека LL-37 подавляет пироптоз макрофагов, индуцированный ЛПС (РАМР) и АТФ (молекулярный фактор, ассоциированный с повреждением), что приводит к снижению секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , и уменьшению воспалительной реакции. Кроме того, LL-37 стимулирует нейтрофилы к выделению антимикробных микровезикул (экзосом), которые способствуют улучшению состояния при сепсисе [132]. Наряду с иммуномодулирующей активностью, АМП способны нейтрализовать эндотоксины, предотвращая развитие сепсиса [133–135]. АМП посредством электростатических взаимодействий и гидрофобных контактов взаимодействуют с ЛПС, что способствует его нейтрализации и снижению высвобождения провоспалительных медиаторов [136]. Например, темпорины, обнаруженные в кожном секрете лягушек, подавляют эндотоксический эффект ЛПС, о чем свидетельствует снижение уровня секреции фактора некроза опухоли TNF- α – основного медиатора эндотоксемии [137]. Предполагается, что чем выше соотношение гидрофобных и положительно заряженных аминокислот в структуре АМП, тем сильнее их способность связываться с ЛПС. В исследовании [138] показано, что замена глутаминовой кислоты на лизин в N-концевой части темпорина L снижает его агрегацию в воде и усиливает олигомеризацию при взаимодействии с ЛПС. Это способствует их более сильному связыванию, что, в свою очередь, повышает способность пептида нейтрализовать провоспалительный ответ, индуцированный ЛПС, в условиях *in vivo*.

Таким образом, АМП воздействуют как на мембраны патогенов, так и на их внутриклеточные мишени. Способность этих пептидов эффективно уничтожать микроорганизмы внутри биоплёнок, ингибировать ключевые клеточные процессы бактерий и модулировать иммунный ответ, в том числе снижать воспаление, делает их многообещающими кандидатными соединениями для разработки антимикробных агентов нового поколения и создания препаратов для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными патогенами.

1.4. Особенности биосинтеза АМП у животных

АМП представляют собой генетически кодируемые молекулы, синтезируемые на рибосомах, что принципиально отличает их от большинства классических низкомолекулярных антибиотиков. Их биосинтез регулируется на уровне экспрессии генов в тканях и клетках организма и включает образование белков-предшественников, последующий протеолитический процессинг, возможные посттрансляционные модификации [139].

Биосинтез представителей семейства дефенсинов начинается с образования препродефенсина, в состав которого входят сигнальный пептид, пропептидный участок и последовательность зрелого пептида. Предполагается, что пропептидный участок способствует поддержанию оптимального заряда продефенсина, тем самым снижая потенциальную токсичность дефенсина в отношении эукариотических клеток [140]. Следует отметить, что дальнейшее превращение продефенсина в зрелый дефенсин зависит как от принадлежности пептида к определенному подсемейству, так и от типа клеток, в которых данный пептид синтезируется. Так, гены миелоидных α -дефенсинов HNP1, HNP2, HNP3, HNP4 экспрессируются преимущественно в нейтрофилах, а также в некоторых лимфоцитах и НК-клетках. При этом зрелые пептиды хранятся в азурофильных гранулах [141,142]. После слияния гранул с фагосомой дефенсины высвобождаются в непосредственной близости от патогена, и, благодаря своей амфифильной природе, быстро взаимодействуют с микробной мембраной [25]. В то же время, для кишечных α -дефенсинов HD5 и HD6 характерен иной путь созревания: их предшественники синтезируются в основном клетками Панета и накапливаются в секреторных гранулах в виде пропептидов, после чего подвергаются протеолитическому расщеплению при участии трипсина [143]. В отличие от α -дефенсинов, β -дефенсины, как правило, секретируются во внеклеточную среду непосредственно в зрелой форме, где реализуют свое как антибактериальное, так и иммуномодулирующее действие [144]. Для большинства β -дефенсинов характерна индуцируемая экспрессия их генов, однако отдельные представители данного подсемейства синтезируются конститутивно. Так, ген *DEFB1*, кодирующий hBD-1, экспрессируется в эпителиальных клетках и рассматривается как пример гена β -дефенсина с конститутивным характером экспрессии. При этом показано, что

поддержание базального уровня транскрипции данного гена в кишечном эпителии зависит от фактора HIF-1 α [145]. Синтез β -дефенсинов нередко носит тканеспецифический характер, что отражает их специализированные функции. Показано, что ген *DEFB126* экспрессируется в эпителии придатка яичка у макаки, тогда как кодируемый им пептид связывается с поверхностью сперматозоидов и способствует их защите от иммунного распознавания в половых путях самки [146].

Для кателицидинов, другого широко распространенного семейства АМП у позвоночных животных, также характерна общая организация белков-предшественников. Представители этого семейства синтезируются в виде препропептидов, включающих N-концевой сигнальный пептид, консервативный пропептидный участок (кателин-подобный домен, CLD) длиной около 100 а.о. и переменный C-концевой участок, кодирующий зрелый пептид [19]. Название CLD связано с его высокой гомологией с кателином – белком, выделенным из лейкоцитов свиньи и относящемся к семейству цистатинов – ингибиторов цистеиновых протеаз [147]. Несмотря на цистатин-подобную пространственную организацию, данные о способности этого домена ингибировать активность цистеиновых протеаз остаются неоднозначными. Например, в одной из работ [148] было показано, что CLD белка-предшественника человеческого кателицидина LL-37 способен подавлять активность катепсина L, лизосомальной цистеиновой протеазы, участвующей в процессинге антигенов для презентации молекулами МНС класса II [149]. На основании этих данных авторы предположили, что подобное действие может снижать повреждение тканей и другие неблагоприятные эффекты, связанные с высвобождением катепсина L в очаге воспаления и, возможно, других протеаз, в том числе и протеаз патогенов, являющихся факторами вирулентности. Однако более поздние исследования человеческого CLD [150] не подтвердили для него ингибирующую активность в отношении катепсина L и указали на отсутствие в его структуре ключевых элементов, необходимых для выполнения такой функции. Напротив, для CLD белка-предшественника свиного протегрина-3 был описан противоположный эффект – способность активировать катепсин L [151]. Авторы предположили, что наблюдаемый эффект может свидетельствовать об участии CLD в иммунных процессах. В настоящее время наиболее вероятной функцией CLD считается обеспечение контролируемого протеолитического высвобождения

зрелого пептида в очаге инфекции, что позволяет ограничивать преждевременную активацию АМП и снижать риск повреждения тканей хозяина [152]. Кателицидины синтезируются как иммунными, так и эпителиальными клетками, а уровень экспрессии их генов определяется локализацией и типом клеток, а также видом животного. В одних случаях экспрессия генов кателицидинов носит конститутивный характер, в других – индуцируемый в ответ на присутствие микробных компонентов и эндогенных факторов, например, витамина D у приматов [153,154]. Предшественники кателицидинов могут либо депонироваться в гранулах нейтрофилов и других секреторных клеток, либо секретироваться во внеклеточную среду. В обоих случаях высвобождение зрелого пептида обеспечивается последующим протеолитическим расщеплением белка-предшественника сериновыми протеазами в соответствующем тканевом или клеточном окружении. У ряда млекопитающих образование активного кателицидина осуществляется эластазой, тогда как у человека – протеиназой 3 и калликреином [155–157]. Анализ предполагаемых сайтов расщепления у кателицидинов рыб, амфибий, рептилий и птиц также указывает на вероятное участие эластазоподобных протеаз [152].

У беспозвоночных животных защитные пептиды характеризуются значительно большим разнообразием структур, организации белков-предшественников и тканеспецифических паттернов экспрессии [158]. У представителей разных групп беспозвоночных описаны как сравнительно простые секретлируемые препептиды, так и более сложные формы предшественников. Одним из примеров такой организации служит тахиплезин из мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, который синтезируется в составе белка-предшественника, включающего сигнальный пептид, последовательность зрелого АМП, сигнал C-концевого амидирования Gly-Lys-Arg и дополнительный C-концевой участок, обогащенный кислыми аминокислотами [159]. Созревание тахиплезина, вероятно, происходит поэтапно и включает удаление сигнального пептида, протеолитическое расщепление по сайту Lys-Arg, последующее отщепление основных C-концевых остатков карбоксипептидазой В-подобного типа и формирование амидированного зрелого пептида. У насекомых, в свою очередь, описаны мультипептидные предшественники, из которых в результате процессинга может образовываться несколько зрелых форм АМП, как, например, в случае апидаецина медоносной

пчелы *Apis mellifera* [160]. Другим примером являются пенаеидины, выделенные из креветки *Penaeus vannamei*, которые после процессинга белков-предшественников образуются в форме зрелых молекул с выраженной доменной организацией, включающей пролин-богатый *N*-концевой и обогащенный цистеинами *C*-концевой участки [161]. Их созревание включает *C*-концевое амидирование, а для отдельных изоформ описано образование *N*-концевой пироглутаминовой кислоты.

Наиболее подробно регуляция экспрессии генов АМП изучена у насекомых. В этой группе защитные пептиды синтезируются главным образом в жировом теле, различных эпителиальных тканях и гемоцитах, а при инфекции экспрессия их генов регулируется преимущественно NF- κ B-зависимыми сигнальными путями Toll и IMD [18,162–165]. Синтезируемые жировым телом АМП секретируются в гемолимфу, где могут накапливаться в концентрациях, существенно превышающих уровни, необходимые для подавления роста большинства микроорганизмов *in vitro*, не оказывая при этом токсического действия на организм хозяина [166]. Важно отметить, что даже в пределах одной и той же ткани отдельные АМП могут демонстрировать разный характер экспрессии их генов: для одних характерна конститутивная экспрессия, тогда как другие экспрессируются под инфекционным воздействием, что отражает особенности их регуляции [167]. Для ряда насекомых описана конститутивная экспрессия АМП в специализированных тканях. Так, у термитов (инфраотряд Isoptera) наличие зрелого пептида термицина в слюнных железах рассматривается как возможный механизм защиты яиц от грибковых инфекций [168]. Наряду с этим, в тканях мозга американского таракана *Periplaneta americana* была обнаружена выраженная антибактериальная активность, что может свидетельствовать о присутствии молекул с антимикробными свойствами [169]. В то же время, цекропины, выделенные из гемолимфы гусениц шелкопряда *Hyalophora cecropia*, относятся к числу АМП с преимущественно индуцируемой в ответ на инфекцию экспрессией [170].

1.4.1. Семейство BRICHOS-ассоциированных белков

На протяжении своего жизненного цикла клетки подвергаются различным стрессовым воздействиям, таким как колебания температуры, окислительные агенты, механические повреждения и мутации, что может негативно сказываться на структуре и функциональной активности белков. Ненативные конформации и агрегаты белков также могут вызывать клеточный стресс и способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, а также метаболических расстройств, включая сахарный диабет 2 типа. Для поддержания стабильности протеома организмы экспрессируют молекулярные шапероны, которые способствуют правильному сворачиванию белков, предотвращают их агрегацию и снижают токсические последствия неправильного фолдинга, особенно в условиях клеточного стресса [171–174]. Молекулярные шапероны подразделяются на АТФ-зависимые и АТФ-независимые. Первые обеспечивают правильное сворачивание белков или подготавливают их к деградации, тогда как вторые стабилизируют белки в развернутом состоянии, предотвращая их агрегацию, но не способствуют их рефолдингу [175].

Функции молекулярных шаперонов могут выполнять и отдельные домены белков, например, так называемый BRICHOS-домен, препятствующий образованию фибрилл и агрегации белков. Своё название домен получил от аббревиатур трёх не связанных между собой функционально, но содержащих его белков, в том числе: белка BRI2 с неизвестной функцией, хондромодулина-I и предшественника сурфактантного белка C (proSP-C). BRICHOS-домены встречаются у различных многоклеточных организмов, от беспозвоночных до млекопитающих [176]. BRI2, BRI3 и proSP-C являются наиболее изученными BRICHOS-содержащими белками человека, которые подвергаются протеолитическому процессингу в секреторном пути. В частности, BRI2 и proSP-C секретируются во внеклеточное пространство, в то время как BRI3 остается мембраносвязанным [177,178]. Известно, что BRICHOS-домены этих белков-предшественников являются эффективными АТФ-независимыми шаперонами, которые ингибируют агрегацию как амилоидных, так и аморфных белков [179–181].

Белки-предшественники, содержащие этот домен, как правило, являются трансмембранными или секретируемыми и имеют характерную структурную

организацию: цитозольный N-концевой домен, гидрофобный трансмембранный регион (TM) или сигнальный пептид (SP), линкерную область, BRICHOS-домен и C-концевой участок, склонный к агрегации, преимущественно за счет формирования β -структур (**Рисунок 3А**). Исключением является proSP-C, у которого отсутствует амилоидогенный C-конец, но присутствует склонная к агрегации трансмембранная область [182,183]. Зрелый сурфактантный белок SP-C, образующийся из белка-предшественника proSP-C, имеет α -спиральную структуру, в составе которой преобладают аминокислотные остатки изолейцин и валин. В мембранной среде α -спираль остается стабильной, но вне фосфолипидного окружения может разворачиваться и агрегировать с формированием амилоидоподобных структур [184,185].

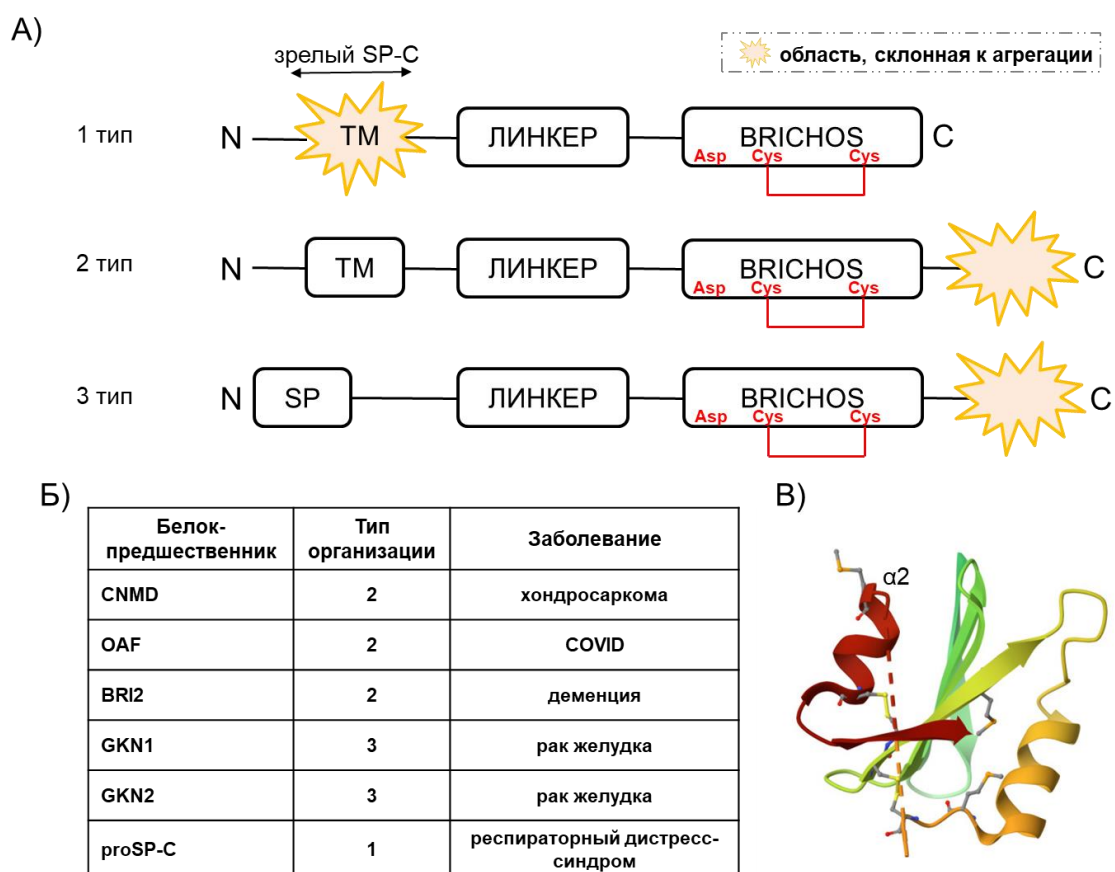


Рисунок 3. Структурные особенности BRICHOS-домена и его связь с развитием заболеваний человека. А) Схематическое изображение структурной организации белков-предшественников, содержащих BRICHOS-домен. Консервативные аминокислотные остатки выделены красным цветом. Б) Белки, содержащие BRICHOS-домен и вовлеченные в развитие различных заболеваний. В) Структура BRICHOS-домена предшественника сурфактантного белка SP-C человека (proSP-C, PDB 2YAD).

На сегодняшний день идентифицировано более 3000 белков, содержащих BRICHOS-домены. Эти белки подразделяют на 14 филогенетических групп, 10 из которых встречаются у человека. Некоторые из этих белков связаны с различными заболеваниями (**Рисунок 3Б**). Например, мутации в стоп-кодоне белка-предшественника BRI2 приводят к образованию нейротоксичных удлиненных С-концевых пептидов AB β i и ADan, которые являются причиной возникновения наследственных форм деменции. Мутации в другом представителе семейства BRICHOS-ассоциированных белков, proSP-C, обнаружены у больных с расстройствами дыхательной системы [186,187].

Несмотря на высокую степень консервативности элементов вторичной структуры BRICHOS-доменов, их аминокислотные последовательности демонстрируют значительное разнообразие. BRICHOS-домены включают примерно 100 аминокислотных остатков. При выравнивании небольшого числа аминокислотных последовательностей BRICHOS-доменов были выявлены строго консервативные участки в их структурах, включающие один остаток аспарагиновой кислоты и два остатка цистеинов, образующих дисульфидную связь [182,188]. Однако, более поздний анализ 2019 последовательностей BRICHOS-доменов показал, что остаток аспарагиновой кислоты встречается в 97 % случаев, в 2,7 % происходит его замена на аспарагин, а в 0,3 % – замена на глутаминовую кислоту или серин [189]. Консервативный остаток аспарагиновой кислоты регулирует функциональную активность BRICHOS-домена, в ионизированной форме обеспечивая структурную гибкость, позволяющую домену адаптироваться к изменениям pH в клеточной среде и снижать токсичность амилоидоподобных структур, а в протонированном состоянии позволяет домену приобретать более компактную, упорядоченную структуру и эффективно ингибировать формирование фибрилл [190]. При этом способность домена предотвращать аморфную агрегацию белков остается неизменной. Специфичность и активность BRICHOS-доменов зависит от вариабельности их конформационных состояний (мономер, димер, олигомер) и участков, отвечающих за связывания с субстратами [176,191–193].

Пространственная структура BRICHOS-домена образована центральным β -слоем, фланкированным α -спиралью с каждой стороны (**Рисунок 3В**). Два остатка цистеина формируют дисульфидную связь между второй спиралью (α 2) и β -слоем.

Первая спираль ($\alpha 1$) обладает повышенной конформационной гибкостью, что способствует эффективному связыванию субстратов [191,194]. Функции большинства BRICHOS-содержащих белков остаются недостаточно изученными. Исключения составляют proSP-C, который в результате многоступенчатого протеолитического процессинга превращается в SP-C – ключевой компонент альвеолярного сурфактанта, и BRI2, который участвует в нейрональном развитии и регуляции образования амилоидного предшественника, хотя его точная роль до конца не исследована [195,196].

У беспозвоночных животных, в частности у полихет, BRICHOS-домен участвует в процессинге с образованием зрелого АМП. Несмотря на то, что функциональные свойства данного домена изучены преимущественно у млекопитающих, у кольчатых червей его присутствие, вероятно, связано с эволюционной адаптацией и обеспечением корректного фолдинга АМП, склонных к агрегации, в экстремальных условиях, например при гипоксии и/или резких температурных колебаниях [197]. На сегодняшний день идентифицировано лишь небольшое число АМП полихет, синтезирующихся в составе белков-предшественников, содержащих BRICHOS-домен (**Рисунок 4**).

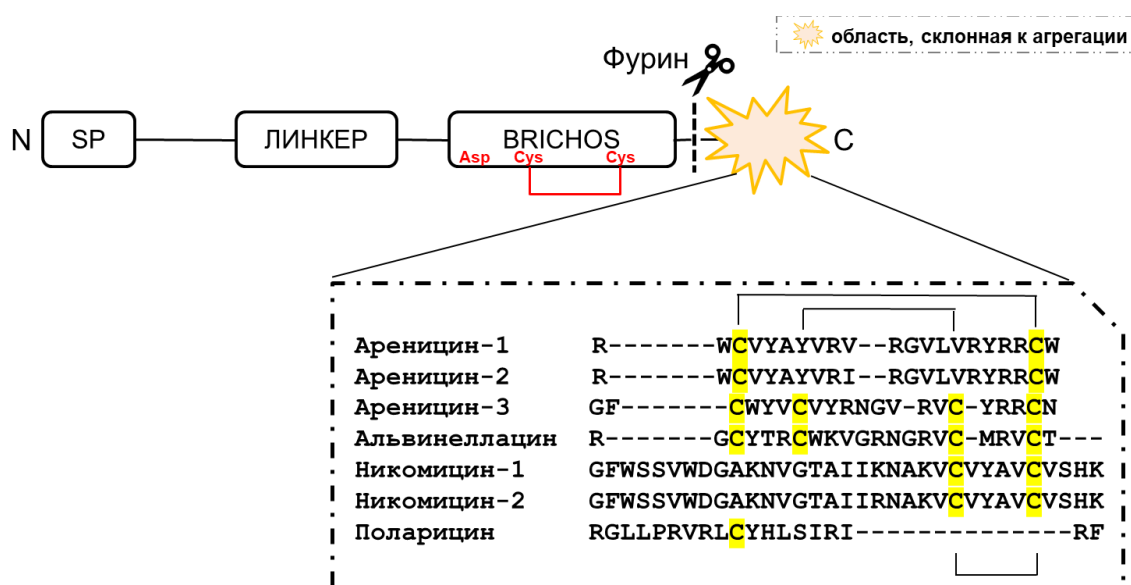


Рисунок 4. BRICHOS-ассоциированные АМП у различных видов полихет. Остатки цистеина выделены желтым цветом. Квадратные скобки отражают порядок замыкания дисульфидных связей.

Анатомия этих морских животных характеризуется наличием целома – полости, заполненной подвижными клетками, называемыми целомоцитами. У

различных видов полихет целомоциты стерилизуют целомическую жидкость, в том числе за счет секреции АМП как гуморальных факторов [198]. Первые представители данного семейства, названные ареницинами (ареницин-1 и ареницин-2), были выделены из целомоцитов морского червя пескожила *Arenicola marina*, обитающего в условиях значительной температурной изменчивости, солёности, высокого содержания кислорода и сульфидов [199]. Эти пептиды оказались двумя изоформами, различающимися одним аминокислотным остатком (V10I). О значимой роли ареницинов в первичной защите червя от патогенов свидетельствует их экспрессия не только в целомоцитах, но и в эпителии стенок тела и кишечника. Конститутивный характер экспрессии, не зависящий от стимуляции инфекционными агентами и их природы (грамотрицательные и грамположительные бактерии, дрожжеподобные грибы), обусловлен особенностями среды обитания пескожила, постоянно подвергающегося воздействию микроорганизмов. Функционально пептиды выполняют две основные задачи: во-первых, они хранятся в цитозольных гранулах целомоцитов и участвуют в фаголизосомной деградации патогенов, во-вторых, секретируются из продуцирующих клеток в кутикулярный эпителий и железистые клетки средней кишки, где формируют барьер против микробного окружения [200]. Примечательно, что секреция ареницинов в целомическую жидкость червя не обнаружена ни в нормальных условиях, ни после микробного воздействия.

Пространственная структура ареницинов в водных растворах представляет собой скрученную β -шпильку, состоящую из двух β -цепей (Cys3-Ile10 и Val13-Cys20) и β -изгиба I типа (Arg11-Gly12), **Рисунок 5А** [201]. В мембраноподобном окружении (мицеллы РС) пептиды претерпевают конформационные изменения, формируя асимметричную димерную структуру за счет ассоциации N-концевых β -цепей (CN $\uparrow\uparrow$ NC), **Рисунок 5Б**. В результате образуются ион-проводящие поры в мембране, состоящие из 2-4 димеров ареницинов, взаимодействующих с анионными концевыми группами липидов, что согласуется с моделью тороидальной поры [201–203]. Димеризация ареницина обуславливает его высокую токсичность. В частности, аналог ареницина-2 [V8R] продемонстрировал сниженную активность в отношении клеток млекопитающих и значительно меньшую склонность к димеризации при контакте с мицеллами РС по сравнению с пептидом дикого типа. При этом оба

варианта обладали сопоставимым профилем антибактериальной активности и схожей кинетикой нарушения проницаемости бактериальных мембран [204].

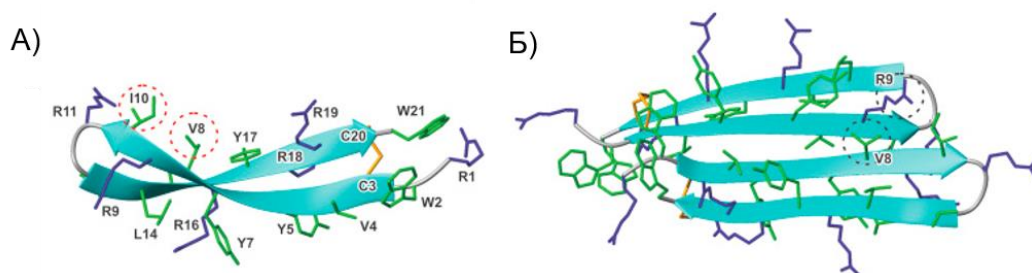


Рисунок 5. Пространственная структура ареницина-2 в воде (А), PDB 2JN1 и в среде, имитирующей мембранное окружение – мицеллы PC (Б), PDB 2L8X [201].

Ареницины обладают высокой активностью в отношении грамположительных бактерий (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. citreus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *M. luteus*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *V. alginolyticus*, *L. anguillarum*, *A. tumefaciens*), а также действуют на патогенные грибы (*C. albicans*, *F. solani*) [203,205]. Предполагается, что противогрибковая активность этих пептидов связана с генерацией активных форм кислорода, которая приводит к деполяризации митохондриальной мембраны, что, в свою очередь, активирует апоптоз [206]. Большое количество исследований было посвящено поиску терапевтически ценных аналогов ареницинов [207–211]. Однако, несмотря на разработку ряда соединений с повышенной селективностью в отношении бактерий, в открытых источниках отсутствуют данные о проведении доклинических исследований этих соединений, что ставит под сомнение их безопасность и/или эффективность *in vivo*. Позже была обнаружена третья изоформа, названная ареницином-3, содержащая дополнительную дисульфидную связь (Cys7 – Cys16). Пептид проявляет высокую активность *in vitro* в отношении мультирезистентных грамотрицательных бактерий, но и обладает токсичностью в отношении клеток млекопитающих [212]. Ареницин-3 был запатентован датской фармацевтической компанией Adenium Biotech в 2011 году как потенциальное средство для лечения инфекций мочевыводящих путей, вызванных *E. coli*. Несмотря на продемонстрированную активность *in vitro* и *in vivo* в отношении грамотрицательных бактерий, его клиническое применение было ограничено из-за достаточно высокой токсичности. В результате структурной оптимизации ареницина-3 был получен аналог AA139 (**Рисунок 6**) с улучшенной

антибактериальной активностью и селективностью в отношении бактерий. Это подтверждается увеличением его терапевтического индекса в 62,5 раз по сравнению с природным пептидом (рассчитанного как отношение МИК, вызывающего 20% лизис эритроцитов, к МИК в отношении *E. coli*) [213].

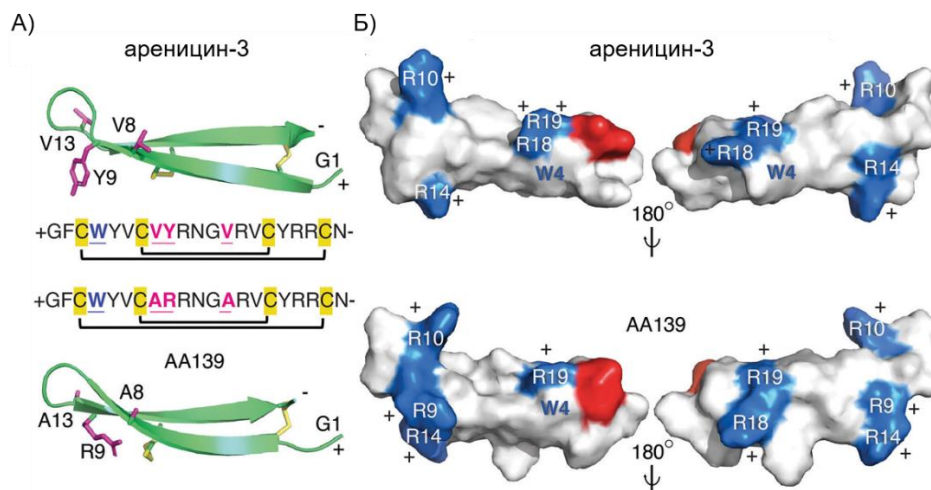


Рисунок 6. Сравнение пространственных структур ареницина-3 и AA139.

(А) Пространственная структура ареницина-3 (PDB 5V0Y) и AA139 (PDB 5V11). Боковые цепи отличающихся аминокислотных остатков выделены фиолетовым цветом. Б) Вид поверхности пептидов в двух проекциях с поворотом на 180° вокруг оси Y. Положительно заряженные остатки изображены синим цветом, отрицательно заряженные остатки – красным, а нейтральные – белым [214].

AA139 продемонстрировал высокую эффективность *in vivo* на экспериментальных моделях перитонита, инфекции мочевыводящих путей и пневмонии у мышей. Предполагалось, что механизм действия пептида связан с нарушением целостности внешней мембраны бактерий за счет его связывания с фосфолипидами и нарушением их транспорта, обусловленного однонуклеотидным полиморфизмом в гене *miaC*. Это приводило к повышенной проницаемости мембраны, утечке АТФ и последующему лизису бактериальных клеток. При этом, в отличие от других мембраноактивных антибиотиков, таких как полимиксины, его взаимодействие с мембраной не зависело от связывания с монофосфатными группами липида А, что предотвращало развитие кросс-резистентности к колистину [213]. Недавнее исследование [214] показало, что AA139 взаимодействует с внешней мембраной за счет электростатических взаимодействий, погружается в ее гидрофобный слой, приводя к частичному разрыву, а затем нарушает целостность цитоплазматической мембраны (пермеабилзация наблюдается в течение 1 часа при

концентрации, близкой к МИК), что в конечном итоге приводит к гибели клетки. По сравнению с ареницином-3, AA139 демонстрирует более высокую избирательность в отношении модельных мембран, имитирующих анионную поверхность бактериальных мембран, и глубже проникает в толщу липидного бислоя, что может объяснять его повышенную антибактериальную активность и низкую токсичность.

Альвинеллацин является еще одним представителем семейства BRICHOS-ассоциированных АМП у полихет, выделенным из целомоцитов морского червя *Alvinella pompejana*, обитающего в гидротермальных источниках в восточной части Тихого океана. Эти среды характеризуются высокими температурами, а также повышенными концентрациями сероводорода (> 1 мкМ) и тяжелых металлов (от 0,3 до 200 мкМ) [215]. Данный пептид демонстрирует структурное сходство с ареницинами и представляет собой β -шпильку, стабилизированную двумя дисульфидными связями (22 а.о.). Альвинеллацин активен в наномолярном диапазоне против широкого спектра бактерий, как грамположительных (*B. megaterium* и *S. aureus*), так и грамотрицательных (*E. coli*, *V. diabolicus*, *Pseudomonas sp.*). Пептид конститутивно экспрессируется эпителиальными клетками и накапливается на покрове червя, обеспечивая защиту от патогенов. Уникальной особенностью полихеты *A. pompejana* является регуляция эпибиотической микрофлоры, которая не только снабжает червя питательными веществами, но и участвует в детоксикации окружающей среды [216]. Альвинеллацин играет ключевую роль в регуляции таксономического состава бактериального сообщества, формирующего на поверхности червя плотные волосковидные структуры и агрегированные колонии в межсегментных пространствах [197]. Метагеномный анализ показал, что микробиота *A. pompejana* представлена 12-15 флотипами, из которых более 98% принадлежат к *Epsilonproteobacteria* (доминирующая группа бактерий гидротермальных источников) [217]. Предполагается, что BRICHOS-домен обеспечивает структурную стабильность альвинеллацина в условиях резких колебаний температур, предотвращая его агрегацию и потерю антибактериальной активности. В отличие от большинства АМП, подвергающихся диверсифицирующему отбору, альвинеллацин остается высоко консервативным у географически разобщенных видов *A. pompejana* и *A. caudata*, обитающих в схожих условиях окружающей среды. Вариабельность последовательности BRICHOS-

домена у данных видов свидетельствует о его эволюционной значимости в стабилизации β -шпилечной структуры пептида, которая обеспечивает эффективную защиту от патогенов и контроль состава эпимикробного сообщества в экстремальных условиях обитания [218].

Ранее предполагалось, что BRICHOS-домен участвует исключительно в посттрансляционном процессинге β -шпилечных АМП полихет. Однако, идентифицированные позже α -спиральные никомидины (никомидин-1 и никомидин-2), обнаруженные у полихеты *Nicomache minor*, обитающей в умеренных и арктических зонах, свидетельствуют о его универсальной роли в биосинтезе как β -шпилечных, так и α -спиральных пептидов [219]. Структурная организация данных пептидов аналогична АМП амфибий и включает α -спиральную N-концевую часть и C-концевой фрагмент, стабилизированный дисульфидной связью, известный как мотив Rana-box (петля из 6-7 а.о.). Исследование никомидина-1 в среде, имитирующей мембранное окружение (мицеллы РС), выявило его выраженную амфифильность: полярные и заряженные остатки сосредоточены на одной стороне N-концевой α -спирали и C-концевой области (Ser31–Lys33), тогда как противоположная сторона α -спирали и область, окружающая дисульфидную связь (Cys24–Cys29), представлены только ароматическими и гидрофобными остатками. Связывание пептида с поверхностью РС осуществляется преимущественно при участии N-концевой α -спирали (**Рисунок 7**), в то время как C-концевой фрагмент может быть как погружён в мицеллу (правая панель), так и ориентирован в водную фазу (левая панель).

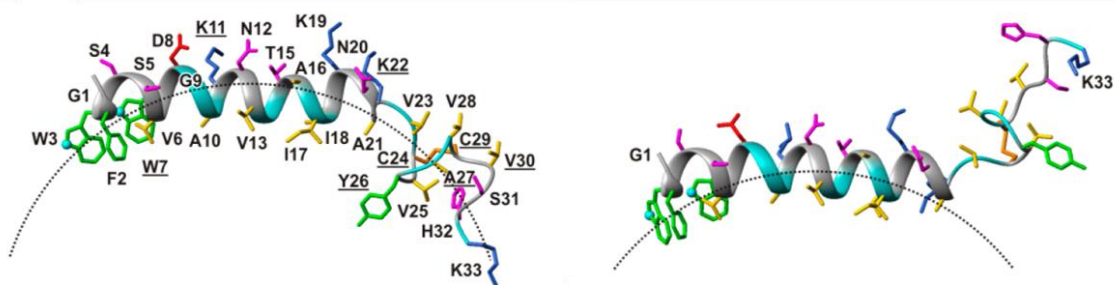


Рисунок 7. Пространственная структура никомидина-1 (PDB 6HN9). Дисульфидная связь, положительно и отрицательно заряженные, гидрофобные, ароматические, полярные остатки окрашены в оранжевый, синий, красный, желтый, зеленый и фиолетовый цвета, соответственно. Пунктирная линия обозначает поверхность РС, а остатки, распложенные внутри мицеллы, выделены бирюзовым цветом [219].

Никомицин-1 обладает высокой антибактериальной активностью в субмикромольных концентрациях преимущественно в отношении грамположительных бактерий (*M. luteus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. aureus*, *Rhodococcus sp.*). Однако его эффективность снижается в присутствии соли в физиологической концентрации. Пептид разрушает как бактериальные, так и эукариотические мембраны, вызывая 80% лизис эритроцитов при концентрации 128 мкМ.

Недавно у антарктической полихеты *Amphitritides sp* из семейства *Terebellidae* был обнаружен BRICHOS-ассоциированный АМП, названный поларицином [220]. Пептид состоит из 19 а.о. и содержит единственный остаток цистеина, что отличает его от других известных АМП полихет. Масс-спектрометрический анализ показал, что 75% полярных молекул поларицина участвуют в димеризации пептида, происходящей предположительно за счёт образования межмолекулярной дисульфидной связи при взаимодействии остатков цистеина. Согласно данным моделирования *in silico*, пространственная структура пептида меняется при димеризации: в мономерной форме он принимает α -спиральную конформацию, тогда как в димерной форме образует две параллельные β -цепи, в которых цистеиновые остатки ориентированы навстречу друг к другу. (Рисунок 8).

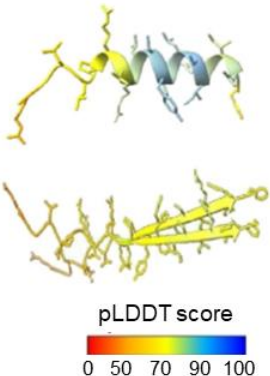
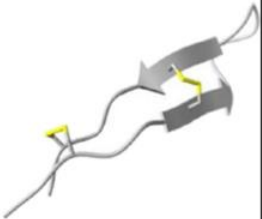
АМП	Поларицин	Ареницин-1	Альвинеллацин
Структура	 pLDDT score 0 50 70 90 100	 PDB 2JSB	 PDB 2LLR

Рисунок 8. Сравнение пространственных структур ареницина-1 и альвинеллацина с предсказанной структурой поларицина с помощью Alpha Fold [220].

Сравнительный анализ антибактериальной активности подтвердил гипотезу о локальной адаптации BRICHOS-ассоциированных АМП к среде обитания их продуцентов [220]. Ареницин и альвинеллацин обладают высокой эффективностью против бактерий, характерных для их природных экосистем, тогда как поларицин

демонстрирует заметно меньшую активность по отношению к гидротермальной и прибрежной микробиоте умеренных широт. При этом пептид проявляет активность в отношении бактерий *Vibrio alginolyticus*, распространённых в полярных и умеренно холодных экосистемах, что свидетельствует о его адаптации к специфическим условиям Антарктики.

Совокупность опубликованных данных свидетельствует о том, что BRICHOS-ассоциированные АМП являются продуктом эволюционного отбора, направленным на оптимизацию их биологической активности в специфических условиях среды. Это подчеркивает необходимость комплексного подхода к изучению АМП, включающего анализ их природного микробного окружения и экологических факторов, что позволит оценить перспективы их потенциального практического применения. В условиях глобального изменения климата исследование таких адаптационных механизмов может расширить наши представления о реакции организмов на изменяющиеся условия окружающей среды и заложить основу для дальнейших исследований этих молекул с целью использования в фармацевтике и биомедицине.

Таким образом, BRICHOS-домен выступает в качестве универсального структурного элемента, принимающего участие в биосинтезе различных классов АМП у полихет. Поиск новых АМП, синтезируемых в составе BRICHOS-домен-содержащих белков-предшественников, существенно расширит представление о биологических функциях новых структурных семейств защитных пептидов полихет.

1.5. Перспективы применения АМП в медицине

Проблема возрастающего количества резистентных штаммов бактерий вынуждает фармацевтические компании приостанавливать разработку новых антибиотиков и сосредоточиться на поиске альтернативных классов противоинфекционных препаратов. В этом контексте АМП рассматриваются как перспективный класс антибактериальных агентов, обладающих терапевтическим потенциалом для лечения инфекций [221,222].

В настоящее время ряд АМП находится на различных стадиях доклинических и клинических испытаний, часть из которых уже завершены или приостановлены из-за выявленных побочных эффектов. Информация о текущем статусе разработок лекарственных препаратов на основе АМП представлена с учетом данных из различных источников, таких как Dramp Database, Clinical trials database, а также официальных сайтов компаний-разработчиков и ранее опубликованных статей [223–232]. Большинство препаратов на основе АМП представляют собой природные соединения (например, кателицидин человека LL-37 или растительный дефенсин HXR124) или их ближайшие структурные аналоги, в частности, MSI-78 (аналог магейнина), IB-367 (аналог протегрина-1), MBI-226 (аналог индолицидина). Однако, некоторые клинические исследования АМП были завершены ввиду отсутствия или недостаточной эффективности препаратов, а также из-за выявления нежелательных побочных явлений. Так, MSI-78 (известный как пексиганан) был разработан под руководством профессора Заслоффа в компании Magainin Pharmaceuticals (впоследствии Genaera Corporation) для лечения диабетических трофических язв [233–235]. Но несмотря обнадеживающие результаты *in vitro*, *in vivo* и в доклинических исследованиях, в 1999 году FDA отклонило заявку на его регистрацию в виду отсутствия явных преимуществ перед традиционными антибиотиками [236,237]. В 2014 году компания возобновила клинические исследования пексиганана в форме крема для местного применения (Locilex), а в 2015 году препарат получил рекомендации Европейского агентства лекарственных средств (ЕМА) для лечения трофических язв при диабете [238]. Однако, в 2017 году компания-разработчик Dipeptium Pharmaceuticals сообщила о приостановлении III фазы клинических испытаний [239]. Другой АМП, MBI-226 (MX-595AN, омиганан), не прошел IIIb фазу клинических испытаний из-за недостаточной эффективности и

отсутствия преимуществ по сравнению с существующими терапевтическими средствами для лечения катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей, вызванных *S. aureus*. В то же время, MBI-226 успешно завершил III стадию клинических испытаний как средство для лечения розацеа и обработки кожи (антисептик), а также находится на II стадии клинических исследований для лечения атопического дерматита, акне и вагинальной интраэпителиальной неоплазии [240]. IB-367 (исеганан) проходил III фазу клинических испытаний в составе аэрозольной лекарственной формы для лечения пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией легких (ИВЛ), а также как пероральный раствор для снижения частоты язвенного орального мукозита у пациентов, получающих химиотерапию [241–243]. Однако, несмотря на свою эффективность на первых двух фазах, препарат потерпел неудачу ввиду отсутствия значимой эффективности и повышенной смертности среди пациентов по сравнению группой плацебо [243,244].

Препараты на основе АМП – производных LL-37 и гистатина – обладают не только выраженной антимикробной активностью, но и иммуномодулирующим действием, что можно рассматривать в качестве преимущества при лечении хронических инфекций, особенно на фоне иммунодефицита. В иных случаях АМП рассматриваются как альтернатива традиционным антибиотикам. Большинство таких препаратов предназначены для местного применения в виде гелей, растворов и аэрозолей для обработки инфицированных ран, ожогов, трофических язв и инфекций кожи и слизистых. Как правило, их механизм действия связан с нарушением целостности и деполяризацией мембраны патогенов. Исключения составляют лантибиотик NVB302 и циклический пептид POL7080. NVB302 представляет собой полусинтетический лантибиотик II типа, полученный на основе дезоксиактагардина В, продуцируемого актинобактериями *Actinoplanes linuriae*. Пептид ингибирует синтез клеточной стенки *Clostridium difficile* и других грамположительных бактерий [245]. NVB302 успешно прошел I фазу клинических испытаний для лечения диареи, вызванной *C. difficile*. POL7080 (муревадин) представляет собой циклический аналог протегрина-1, разработанный компанией Polyphor Ltd. как препарат для лечения нозокомиальной и связанной с ИВЛ пневмонии, вызванной *P. aeruginosa*. Препарат обладает высокой специфичностью в отношении данного патогена и в доклинических испытаниях показал более

высокую эффективность против мультирезистентных штаммов *P. aeruginosa* по сравнению с колистином [230,246–248]. POL7080 является первым представителем класса антибиотиков, действующим на внешнюю мембрану бактерий нелитическим путем, специфически связываясь с ее транспортным белком LptD, участвующем в биогенезе ЛПС [2,249,250]. Известно, что мутации в гене *pmrB* двухкомпонентной системы PmrA/PmrB, аналогичные тем, которые возникают при формировании устойчивости к колистину, могут приводить к развитию резистентности к препарату и, как следствие, к перекрёстной резистентности к полимиксинам [251]. Безопасность и эффективность препарата были подтверждены на первых двух фазах клинических испытаний у пациентов с выраженным обострением немуковисцидозного бронхоэктаза или ИВЛ-ассоциированной бактериальной пневмонией, вызванной *P. aeruginosa*. В одном из исследований клиническое выздоровление было достигнуто у 10 из 12 пациентов (83%), а 28-дневная смертность составила 9% [252]. Тем не менее, в 2019 году компания Polyphor Ltd. приостановила III фазу клинических испытаний по собственной инициативе из-за высокой частоты острого почечного повреждения: у 56% пациентов наблюдалось повышение уровня сывороточного креатинина [223,253]. Впоследствии компания Spexis продолжила разработку препарата в виде ингаляционной формы, подтвердив её эффективность в доклинических испытаниях: внутритрахеальное введение мурепавадина в дозе 1 мг/кг мышам, инфицированным *P. aeruginosa* ATCC 27853, ATCC BAA2113 и NCTC13437, приводило к снижению уровня КОЕ более чем на два порядка [254]. В 2020 году было получено разрешение на проведение клинических испытаний мурепавадина для лечения респираторной синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. В 2023 году компания сообщила о положительных результатах первой фазы клинического исследования ингаляционной формы препарата, в ходе которого была показана его хорошая переносимость и низкая системная биодоступность (<5%). При изучении фармакокинетических параметров было показано, что максимальная концентрация мурепавадина достигалась через 1-2 часа после введения и сохранялась на уровне, превышающем МИК, в течение 24 часов [255].

Наряду с антибактериальным действием, некоторые АМП проявляют противогрибковую активность. Например, на основе фрагмента гистатина-5, α -

спирального пептида, обнаруженного в слюне человека, был разработан препарат PAC113 (также известный как P113). PAC113 демонстрирует как фунгистатическую, так и фунгицидную активности *in vitro* в отношении ряда грибов, включая *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Cryptococcus neoformans*, а также в отношении азол- и амфотерицин-резистентных штаммов этих патогенов [256,257]. Было показано, что противогрибковое действие гистатина-5 реализуется путём связывания с поверхностным белком клеточной стенки *C. albicans* – Ssa1/2p с последующим проникновением во внутриклеточные компартменты. Попадая в цитозоль, АМП способствует оттоку малых молекул и ионов, включая АТФ, K^+ и Mg^{2+} посредством прямого или косвенного взаимодействия с транспортером калия Trk1p [258–260]. Препарат PAC113 завершил II фазу клинических испытаний в качестве средства для лечения грибковых инфекций полости рта у ВИЧ-инфицированных пациентов. Другими примерами противогрибковых препаратов на основе АМП являются циклический пептид NP213 и растительный дефенсин HXP124 (HXP124-ONY-002), предназначенные для терапии онихомикоза [140,261].

Разнообразие структур природных АМП открывает широкие возможности для создания пептидомиметиков – соединений, имитирующих структуру и биологическую активность пептидов, но обладающих повышенной стабильностью. Среди таких препаратов можно выделить PMX-30063 (брилацидин) – ариламидный фолдамер, воспроизводящий амфифильные свойства АМП класса дефенсинов, а также синтетический катионный трипептид LTX-109 (литиксар), состоящий из двух остатков аргинина, 2,5,7-три(трет-бутил)триптофана и этилфенильной группы [262,263]. Брилацидин демонстрирует бактерицидную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, приводя к деполяризации мембран патогенов [264,265]. Препарат получил статус QIDP (Qualified Infectious Disease Product или отвечающий требованиям к препаратам для лечения инфекционных заболеваний) и в 2017 году успешно завершил клинические испытания фазы IIb в форме ополаскивателя для полости рта при лечении орального мукозита. LTX-109 продемонстрировал быстрое бактерицидное действие *in vitro* против 155 клинических изолятов метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, включая таковые, обладающие устойчивостью или пониженной чувствительностью

к ванкомицину, даптомицину и линезолиду [266]. Наряду с антибактериальным действием, LTX-109 проявляет противогрибковую активность в отношении *S. cerevisiae* как в планктонной форме, так и в составе биоплёнок [267,268]. Механизм действия пептида связан с неспецифическим разрушением цитоплазматической мембраны клеток, предположительно путём прямого или опосредованного взаимодействия со сфинголипидами [269]. LTX-109 успешно завершил II фазу II клинических испытаний в форме геля для терапии кожных инфекций, вызванных грамположительными бактериями, включая лечение пациентов с атопическим дерматитом (2011 г.) и небуллезным импетиго (2014 г.). Кроме того, были проведены исследования безопасности и эффективности препарата при назальной колонизации MSSA (метициллин-чувствительный *S. aureus*) / MRSA (2011 г.) [84,232]. В 2021 году была завершена фаза IIa клинических испытаний 3% геля LTX-109 для назальной деколонизации носителей *S. aureus*, однако результаты этого исследования пока остаются не опубликованными.

Таким образом, результаты клинических испытаний препаратов на основе АМП подтверждают их высокий терапевтический потенциал в качестве средств многоцелевого назначения для лечения различных бактериальных и грибковых инфекционных заболеваний, в том числе ассоциированных с формированием биоплёнок.

1.5.1. Проблемы разработки препаратов на основе АМП для клинического применения

Выведение соединений пептидной природы на рынок в качестве потенциальных антибиотиков связано с рядом проблем, а именно: сравнительно высокая токсичность, низкая стабильность, отсутствие специфичности, короткий период полувыведения и низкая биодоступность (Таблица 1) [270–274]. Далее будут рассмотрены ключевые факторы, ограничивающие переход АМП от доклинических исследований к клиническим испытаниям.

Таблица 1. Преимущества и недостатки АМП.

Преимущества	Недостатки
• Различные виды активности (антибактериальная, антибиопленочная, противогрибковая, иммуномодулирующая и т.д.) • Широкий спектр действия • Быстрота действия • Наличие нескольких мишеней действия • Низкий уровень развития резистентности • Биологическое / химическое разнообразие • Синергизм с антибиотиками • Низкая иммуногенность	• Низкая селективность в отношении бактериальных клеток • Природная устойчивость некоторых бактерий (например, <i>Serratia marcescens</i>) • Высокая чувствительность к протеолитической деградации • Низкая биодоступность • Высокая стоимость производства

Отсутствие активности *in vivo* является одной из главных проблем при разработке новых антибактериальных соединений на основе АМП. При оценке МИК АМП в условиях, близких к физиологическим, например в присутствии 0,9% NaCl и/или сывороточных белков, таких как альбумин и липопротеины, активность пептидов в большинстве случаев снижается на несколько порядков. В связи с этим, важным этапом исследований АМП перед оценкой их эффективности на животных моделях является анализ активности АМП в различных культуральных средах, что позволит более точно прогнозировать их терапевтический потенциал [270,275].

Природные АМП часто подвержены быстрой протеолитической деградации, что существенно снижает их стабильность и время циркуляции в кровотоке [276,277]. Высокая чувствительность пептидов к ферментам ЖКТ, таким как α -химотрипсин, трипсин и панкреатическая эластаза, в сочетании с ограниченной проницаемостью через кишечный эпителий значительно осложняет их пероральное

применение [270,273,276,278,279]. Помимо этого, физико-химические характеристики АМП (вторичная структура, заряд, гидрофобность, растворимость) могут влиять на стабильность пептидов и их способность преодолевать барьеры ЖКТ и достигать системной циркуляции. При местном, внутримышечном или подкожном введении влияние этих факторов выражено в меньшей степени, однако даже при внутривенном введении пептиды могут подвергаться разрушению под действием протеаз и пептидаз плазмы или сыворотки крови [273]. В связи с этим, инъекционные пути введения часто рассматриваются как предпочтительные для системной доставки большинства АМП. Одним из способов повышения стабильности АМП и сохранения их активности в кровяном русле является замена L-аминокислот в их структуре на D-изомеры. Кроме того, циклизация и другие химические модификации АМП, включая пегилирование, также могут повышать стабильность [280–282].

Немаловажным является тот факт, что многие АМП обладают низкой селективностью в отношении бактерий, то есть демонстрируют активность в отношении как бактериальных, так и эукариотических клеток [283–285]. Тем не менее, некоторые пептидные антибиотики, синтезируемые не на рибосоме, такие как полимиксины, обладают выраженной нефро- и нейротоксичностью, но при этом успешно применяются в медицине для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными грамотрицательными бактериями, выступая в качестве препаратов последней линии [286,287]. Оптимизация аминокислотной последовательности АМП позволяет повысить их избирательность и минимизировать токсичность в отношении клеток млекопитающих, что расширяет перспективы их безопасного клинического применения.

Еще одним из ограничений разработки фармацевтических субстанций на основе АМП является высокая себестоимость их производства. Стоимость производства 1 миллиграмма АМП методом твердофазного синтеза оценивается в среднем в 100-1000 долларов США, что существенно превышает затраты на производство традиционных антибиотиков [288,289]. Такие высокие затраты снижают интерес фармацевтических компаний к проведению доклинических и клинических испытаний. В связи с этим, поиск альтернативных методов для промышленного производства пептидов является актуальной задачей. Наиболее

подходящим подходом для получения необходимого количества АМП является генная инженерия. Биотехнологические способы производства рекомбинантных АМП предполагают экспрессию соответствующих генов с использованием компетентных клеток бактерий или дрожжей, а также трансгенных животных или растений [290]. Наибольшее распространение получили бактериальные и дрожжевые системы экспрессии, обеспечивающие до 95% выхода рекомбинантных пептидов [291]. Преимущество бактериальных систем заключается в использовании недорогих и доступных компонентов в питательных сред. Аутоиндукция приводит к более высоким выходам целевых АМП по сравнению с обычными стратегиями, основанными на индукции экспрессии, например, изопропил- β -d-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) [292]. Кроме того, использование IPTG может приводить к дополнительным затратам при производстве АМП в промышленных масштабах. Таким образом, оптимизация условий экспрессии в бактериальных системах может существенно повысить эффективность производства АМП и снизить их себестоимость [292].

Несмотря на существующие ограничения, препятствующие разработке и выходу на рынок препаратов на основе АМП, в настоящее время активно разрабатываются различные подходы к их преодолению. Среди таких стратегий можно выделить следующие: снижение токсичности, улучшение фармакокинетических характеристик пептидов и оптимизацию процессов их производства. Одним из ключевых препятствий для широкого применения АМП является необходимость разработки оптимальных рецептур и способов введения препаратов. В связи с этим фармацевтические компании направляют свои усилия на создание препаратов для наружного применения, рассматривая их как более безопасный и экономически выгодный вариант. Кроме того, использование современных биотехнологических подходов и универсальных платформ для синтеза АМП с различными структурами может значительно повысить количество перспективных препаратов [289]. Важной задачей для регулирующих органов является создание новых стандартов проведения клинических испытаний АМП и других антибактериальных агентов, которые будут учитывать их эффективность в подавлении роста мультирезистентных патогенов и стремительную динамику развития устойчивости к традиционным антибиотикам.

2. Материалы и методы

2.1. Оборудование

Настольные микроцентрифуги «MiniSpin» (Eppendorf); системы очистки воды (Millipore); спектрофотометр NanoPhotometer N80 (Implen); микроволновая печь (Samsung); мешалка магнитная (Biosan); pH-метр (Sartorius); ПЦР-амплификатор «Терцик» (ДНК-Технология) и T100 (Bio-Rad); установка для лиофильной сушки «FreeZone2.5» (Labconco); спектрофотометр «Ultraspec 3300 PRO» (Amersham Biosciences); твердотельный термостат для микропробирок «Гном» (ДНК-Технология); шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick Scientific); весы электронные «E5500S» (Sartorius); весы электронные аналитические «R200D» (Sartorius); встряхиватель для пробирок (Biosan); источник питания «PS500XT» (Hoefer Scientific Instruments); водяной термостат «Multitemp II» (LKB); лампа ультрафиолетовая «UVGL-25 Mineralight Lamp» (Ultra-violet Products); настольный ламинарный бокс «Gelaire» (Flow Laboratories); низкоскоростная центрифуга с охлаждением «Minifuge GL» (Heraeus); вакуумный концентратор «SpeedVac» (Savant); планшетный фотометр «Multiscan EX» (Thermo Scientific); ультрацентрифуга «L8-70M» (Beckman); ультразвуковой дезинтегратор «Q125 Sonicator» (Qsonica); насос перистальтический «2115 Multiperperex» (LKB); термостатируемый шейкер для 96-луночных планшетов «PST-60HL-4» (Biosan); планшетный ридер PlateReader AF2200 (Eppendorf); встряхиватель пробирок «BioVortexV1» (Biosan); сушижаровой шкаф BINDER FD 115 (Binder); воздушный термостат «Model 132000» (Boekel Scientific); системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии «HPLC LC-20AP» (Shimadzu); спектрофлуориметр «Hitachi F-2710» (Hitachi); автоклав «MLS-3781L» (Sanyo); Масс-спектрометр сверхвысокого разрешения Q Exactive Plus, сопряженный с нанопоточным хроматографом высокого давления Ultimate 3000RSLCnano (Thermo Scientific); NovoCyte 2060R (ACEA Biosciences Inc); Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies).

2.2. Реактивы и расходные материалы

Глюкоза (Sigma-Aldrich); глутамат магния (Sigma-Aldrich); термостабильные ДНК-полимеразы Taq и «Tersus» (Евроген); ДНК-лигаза фага T4 (Fermentas);

эндонуклеазы рестрикции EcoRI, BglII, BamHI (Fermentas); агароза (Bio-Rad); буфер FastDigest (Fermentas); дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP, Promega); ДНК маркеры молекулярных масс (Сибэнзим); orange G (Serva); этидий бромид (Serva); глицерин (Merck, Serva); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (MTT-реагент, Sigma-Aldrich); трифторуксусная кислота (ТФУ, Applied BioSystems); изопропанол (Реахим); ацетонитрил (Merck); уксусная кислота (Химмед); среда DMEM/F-12 (Gibco); кристаллический фиолетовый (Sigma), фетальная бычья сыворотка (ФБС, Gibco); этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА, Sigma-Aldrich); соляная кислота (Реахим); гидроксид натрия (Lachema); ацетат натрия (Реахим); ацетат калия (Реахим); хлорид натрия (Sigma-Aldrich); хлорид калия (Реахим); хлорид магния (Merck); сульфат аммония (Serva); хлорид кальция (Sigma-Aldrich); хлорид железа III (Реахим); гидрохлорид гуанидина (Sigma-Aldrich); имидазол (Sigma-Aldrich); бакто-агар (Difco); триптон (Difco); дрожжевой экстракт (Pronadisa); бульон Мюллера-Хинтона (МН, Sigma); Triton X-100 (Merck); бромциан (Merck); изопропилтио- β -D-галактопиранозид (IPTG) (Applichem); бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma-Aldrich); набор для выделения ДНК из агарозного геля Cleanup Mini (Evrogen); набор для выделения плазмидной ДНК «Plasmid Miniprep» (Evrogen); Ni-NTA сефароза (GE Healthcare); колонка для ОФ-ВЭЖХ (Reposil-Pur Basic C18); пропиций йодид (PI, Biotium); DIBAC4(3) (Solarbio); вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США); первичные кроличьи антитела к His-метке (Abcam, Великобритания); N-оксид лаурилдиметиламина (LDAO, Anatrace, США); N-лауроилсаркозина (Solarbio, Китай); н-октил-бета-D-глюкопиранозид (OG, BLD Pharmatech, Китай); Pico ECL (Thermo Fisher Scientific, США). Деионизированная вода была получена на установке «Milli-Q» (Millipore). Стерилизация питательных сред, буферов и других растворов проводилась путем автоклавирования или с помощью фильтров Stericup-GP (Millipore).

2.3. Поиск АМП в транскриптах полихет

Сырые данные RNAseq для различных видов полихет были получены из базы NCBI и преобразованы в формат FASTQ. Далее выполняли очистку прочтений от адаптерных последовательностей низкокачественных участков в Trimmomatic.

Сборку транскриптомов *de novo* проводили в Trinity. Полученные транскрипты преобразовывали в транслированные последовательности, а целевые белки-предшественники идентифицировали по наличию BRICHOS-домена с помощью алгоритма BLASTP.

2.4. Создание генно-инженерных конструкций, кодирующих АМП

Генно-инженерные конструкции, кодирующие отобранные пептиды, были спроектированы с учетом данных о частоте встречаемости кодонов в геноме *E. coli*. Последовательности всех праймеров были подобраны и проверены с использованием программы OligoAnalyzer для снижения вероятности образования шпилек и межмолекулярных димеров в ходе синтеза. Гены, кодирующие новые BRICHOS-ассоциированные АМП, были получены путем медленного отжига 3'-концов двух праймеров с последующей достройкой ДНК-полимеразой до двуцепочечной структуры и затем клонированы в экспрессионный вектор на основе плазмиды серии pET, названный pTK (см. раздел 2.19, **Рисунок 9А**). 5'-Концы прямых и обратных праймеров были фланкированы сайтами рестрикции эндонуклеаз BglII и EcoRI соответственно. Кроме того, был предусмотрен иницирующий метиониновый кодон ATG перед нуклеотидной последовательностью и стоп-кодоном TAA на ее 3'-конце.

2.5. Трансформация методом теплового шока

На первом этапе для образования липких концов фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BglII, а плазмидный вектор – BamHI и EcoRI в течение 1 ч при 37 °C. Реакции останавливали тепловой инактивацией ферментов в соответствии с рекомендациями производителя. После этого продукты рестрикции охлаждали, разделяли в 1,5% агарозном геле, вырезали соответствующие полосы и очищали ДНК с помощью набора CleanUp Mini (Евроген). Лигирование очищенных вставок с линеаризованным вектором проводили с использованием ДНК-лигазы фага T4 в течение 16 ч при 15 °C. К 5 мкл полученных лигазных смесей добавляли 100 мкл взвеси химически компетентных клеток *E. coli* DH10B и инкубировали на льду в течение 15 мин, периодически помешивая во избежание замерзания. Далее проводили тепловой шок при 42 °C в

течение 1,5 мин и переносили смесь на лед на 5 мин. К содержимому пробирок добавляли 1 мл питательной среды SOC (20 mM глюкоза, 20 г/л триптон, 10 г/л дрожжевой экстракт, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$,) и инкубировали клетки на шейкере (220 об/мин) при 37 °C в течение 45 мин. Далее клетки осаждали центрифугированием 4000 об/мин в течение 2 мин, отбирали 900 мкл супернатанта и ресуспендировали осадок в оставшемся объеме. Полученные суспензии высевали на чашки Петри с питательной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при 37 °C в течение 16 ч.

2.6. ПЦР-анализ клонов

Отдельные выросшие колонии переносили микробиологической петлей на свежие чашки с плотной питательной средой того же состава. Наличие вставки требуемой длины в плазмиде проверяли методом ПЦР с последующим разделением в 1,5% агарозном геле. В качестве прямого праймера использовали ген-специфичный праймер, соответствующий кодирующей последовательности исследуемого АМП, а в качестве обратного праймера применяли универсальный олигонуклеотид, комплементарный участку терминации транскрипции (T7 Reverse). Клоны, для которых было подтверждено наличие вставки ожидаемого размера, инокулировали в жидкую питательную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали в течение 6 – 8 ч. После чего плазмидную ДНК выделяли набором «Plasmid Miniprep» (Евроген) согласно инструкции производителя. Секвенирование плазмидных ДНК выполнялось в ООО «Евроген Лаб» на базе ИБХ РАН.

2.7. Гетерологическая экспрессия и очистка АМП в составе гибридных белков

Рекомбинантные пептиды получали методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в виде гибридных белков, содержащих His-метку (8×His), тиоредоксин А с заменой M37L, остаток метионина (в качестве сайта химического расщепления) и последовательность зрелого пептида. Клетки, трансформированные соответствующими плазмидными конструкциями, выращивали в среде LB, содержащей 20 mM глюкозы, 1 mM $MgSO_4$, 100 мкг/мл ампициллина при 37 °C до достижения оптической плотности OD_{600} 0,7 – 1,0. Экспрессию индуцировали

добавлением 0,2 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего культуру инкубировали в течение 4 – 5 ч при 30 °С и 220 об/мин. Далее клетки осаждали центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 30 мМ имидазола и 6 М гидрохлорида гуанидина. Осветленный лизат, полученный путём центрифугирования при 30000g, наносили на колонку Ni-NTA Sepharose (GE Healthcare) и проводили элюцию буфером, содержащим 0,5 М имидазола. Элюат подкисляли концентрированной соляной кислотой (до рН 1,0 – 2,0) и добавляли 100-кратный молярный избыток CNBr. Полученную реакционную смесь выдерживали в течение 18 ч в темноте при 25 °С, после чего продукты реакции расщепления разбавляли 3-кратным избытком воды и лиофилизировали. Далее лиофилизаты растворяли в воде и проводили финальную очистку методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) на полупрепаративной колонке Reprosil-pur C18-AQ (10 × 250 мм, размер частиц 5 мкм, Dr. Maisch GmbH). Разделение проводили в линейном градиенте ацетонитрила в воде с добавлением 0,1% ТФУ, а детектирование целевых пиков осуществляли при 214 и 280 нм. Пики собирали и анализировали с помощью MALDI-TOF MS с использованием масс-спектрометра Reflex III (Bruker Daltonics). Фракции, соответствующие молекулярным массам целевых пептидов, упаривали в вакуумной центрифуге и растворяли в воде.

Для проведения экспериментов на животных отобранные пептиды получали в штамме ClearColi® BL21(DE3), характеризующемся модифицированной апирогенной структурой ЛПС, что позволяет свести к минимуму вероятность выраженной иммунной реакции при *in vivo* применении рекомбинантных препаратов.

Для изучения структуры капителлацина методом ЯМР был получен пептид, тотально меченный стабильным изотопом ^{15}N . Трансформированные клетки *E. coli* BL21 (DE3) культивировали в бедной среде M9 с добавлением 0,2 г/л $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ в качестве основного источника азота, 0,2 мМ глюкозы, 1 мМ MgSO_4 , 100 мкг/мл ампициллина, 2 мг/л дрожжевого экстракта, 10 мг/л гидрохлорида тиамин.

2.8. Анализ вторичной структуры АМП методом спектроскопии кругового дихроизма

Вторичную структуру пептидов оценивали методом спектроскопии кругового дихроизма в водной среде и в условиях, имитирующих мембранное окружение (30 мМ додецилфосфохолина). Молярное соотношение пептид:липид составляло 1:100. Измерения выполняли в Центре коллективного пользования ИБХ РАН на спектрополяриметре J-810 (Jasco). Спектры измеряли в диапазоне 190 – 250 нм в кювете с оптическим путем 0,01 см. Каждое измерение выполняли в четырех повторностях, а усредненные данные анализировали с использованием программы CONTINLL (пакет CDPPro).

2.9. Анализ замыкания дисульфидных связей

0,1 мг исследуемого пептида растворяли в 100 мкл 100 мМ буфера Tris-HCl (pH 8,0). Далее к образцу добавляли трипсин, предварительно растворенный в 50 мМ уксусной кислоте, в массовом соотношении 1:50 (фермент:пептид). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 16 ч, после чего реакцию останавливали замораживанием. Продукты реакции анализировали методом ОФ-ВЭЖХ на аналитической колонке Luna C18 в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0 – 40% за 40 мин, 1 мл/мин) в присутствии 0,1% ТФУ. Основные фракции лиофильно высушивали и анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

2.10. Определение антимикробной активности АМП

Антимикробную активность полученных АМП в отношении тест-культур патогенов, приведенных в **Таблице 2**, определяли методом двукратных серийных разведений в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых микропланшетах (Eppendorf, NEST, Corning). Антибактериальную активность оценивали в бульоне Мюллера-Хинтона (МН, 17,5 г/л кислого гидролизата казеина, 2 г/л мясного экстракта 1,5 г/л крахмала) в присутствии или отсутствии 0,9 % NaCl. В случае бактерий *Vibrio harveyi* BB120 активность пептидов оценивали в среде МН с добавлением 3% NaCl. Бактериальные культуры выращивали при 37 °С в среде LB до достижения оптической плотности $OD_{600}=1,0$ и разбавляли средой МН до

конечной концентрации клеток 10^6 КОЕ/мл. Аликвоты тест-культур объемом 50 мкл добавляли к 50 мкл водных растворов пептидов, предварительно разведенных в 0,1% стерильном бычьем сывороточном альбумине (БСА) для снижения неспецифического связывания пептидов с поверхностью планшетов. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37 °C и 950 об/мин на планшетном микрошейкере.

Активность пептида AmBRI-44a в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* определяли в среде RPMI-1640 (Capricorn, Германия). Суспензию клеток готовили до конечной концентрации 5×10^4 КОЕ/мл и смешивали с равными объемами водного раствора пептида. Инкубацию проводили при 30 °C в течение 24 ч. Рост дрожжей оценивали визуально на микроскопе CX31 (Olympus), а также путём измерения оптической плотности культуры при 570 нм. Во всех случаях значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) определяли как наименьшую концентрацию пептида, при которой отсутствует видимый рост культуры. Значения МИК рассчитывали как медиану девяти полученных значений.

Таблица 2. Используемые штаммы микроорганизмов

Микроорганизм	Характеристика (источник, устойчивость к антибиотикам)
Бактерии	
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Штамм для клонирования (Invitrogen, США)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Штамм для экспрессии (Novagen, США)
<i>Escherichia coli</i> ML-35p	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23724	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Escherichia coli</i> K12 BW25113	Лабораторный штамм (коллекция Keio)
<i>Escherichia coli</i> K12 SBS 1936	Лабораторный штамм (коллекция ИМГ РАН)
<i>Escherichia coli</i> U10 SRCAMB B-8551	XDR клинический изолят (моча, мочекаменная болезнь, ESBL+, <i>mcr-1</i> +)
<i>Escherichia coli</i> U22 SRCAMB B-8553	XDR клинический изолят (моча, инфекции мочевыводящих путей, ESBL+, <i>mcr-1</i> +)
<i>Escherichia coli</i> 1057 SRCAMB B-10910	MDR клинический изолят(моча, инфекции мочевыводящих путей, ESBL+)
<i>Escherichia coli</i> CI 3600	MDR клинический изолят (моча, инфекции мочевыводящих путей; ESBL+)
<i>Escherichia coli</i> CI 214	Клинический изолят (моча, острый пиелонефрит)
<i>Enterobacter cloacae</i> CI 4172	XDR клинический изолят, MBL+

<i>Acinetobacter baumannii</i> CI 2675	XDR клинический изолят, MBL+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Лабораторный штамм (коллекция ATCC)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI 236	XDR клинический изолят (моча, мочекаменная болезнь)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI1049	XDR клинический изолят (моча, мочекаменная болезнь, ESBL+, MBL+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI1995	XDR клинический изолят, MBL+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CI223	XDR клинический изолят, MBL+
<i>Vibrio harveyi</i> BB120	Лабораторный штамм (ATCC BAA-1116)
<i>Bacillus subtilis</i>	Лабораторный штамм (VKM B-886)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Лабораторный штамм (VKM B-511)
<i>Bacillus mycoides</i>	Лабораторный штамм (VKM B-814)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Лабораторный штамм (ATCC 29213)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Лабораторный штамм (ATCC 6538P)
<i>Staphylococcus aureus</i> CI 119	MDR клинический изолят
<i>Enterococcus faecalis</i>	Лабораторный штамм (ATCC 29212)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155	Лабораторный штамм (ATCC 700084D-5)
<i>Mycobacterium phlei</i>	Лабораторный штамм (VKM Ac-1291)
<i>Micrococcus luteus</i>	Лабораторный штамм (VKM B-1314)
Дрожжи	
<i>Candida albicans</i>	Лабораторный штамм (ATCC 18804)
<i>Candida albicans</i>	Лабораторный штамм (ATCC 10231)

Примечание: MDR, штамм с множественной лекарственной устойчивостью; XDR, штамм с экстремальной лекарственной устойчивостью; ESBL+, штамм, вырабатывающий бета-лактамазу расширенного спектра; MBL+, штамм, вырабатывающий металло-бета-лактамазу; *mcr-I*+, ген-опосредованная устойчивость к полимиксинам.

2.11. Исследование гемолитической и цитотоксической активности АМП

Способность АМП нарушать целостность эукариотических мембран оценивали в отношении эритроцитов здоровых доноров, а также в отношении трансформированных клеток эмбриональной почки человека (HEK293T) или кератиноцитов человека (HaCaT), полученных из Института цитологии РАН.

Свежую кровь центрифугировали в течение 15 мин при 500g для отделения фракции эритроцитов и трижды промывали холодным фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4). К исследуемым пептидам, предварительно разведенным в 50 мкл 0,1% БСА в 96-луночных полипропиленовых планшетах, добавляли 50 мкл 8% суспензии эритроцитов в PBS. Смеси инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °C на шейкере при 950 об/мин. После инкубации планшеты центрифугировали 15 мин при 1000g для осаждения интактных эритроцитов, после чего аликвоты супернатанта переносили в новый полистироловый планшет и измеряли количество высвобожденного гемоглобина при 405 нм. Суспензию эритроцитов в PBS и 0,1% тритон X-100 использовали в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно. Гемолитическую активность пептидов рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{\text{OD}_{405}(\text{препарат}) - \text{OD}_{405}(\text{отриц.контроль})}{\text{OD}_{405}(\text{полож.контроль}) - \text{OD}_{405}(\text{отриц.контроль})} \times 100\%$$

Для оценки цитотоксического действия АМП проводили МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать желтый реагент МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия) до нерастворимого в воде фиолетового кристаллического формазана. Для этого линии НЕК293Т или HaCaT высаживали в 96-луночный планшет по 10^4 клеток на лунку в модифицированной среде Игла Дульбекко DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в течение 24 ч. Далее культуральную жидкость заменяли свежей средой, в которой предварительно растворяли тестируемые пептиды, и инкубировали в течение 16 ч. Далее в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и выдерживали в течение 4 ч. Культуральную среду осторожно удаляли, а образовавшиеся кристаллы растворяли 100 мкл смеси ДМСО и этанола (1:1). Оптическую плотность полученных растворов измеряли при 570 нм на микропланшетном ридере AF2200 (Erppendorf, Германия). Оптическую плотность раствора клеток без пептидов принимали за 100% жизнеспособность клеток.

2.12. Оценка проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий

Способность исследуемых пептидов нарушать целостность цитоплазматической мембраны оценивали в отношении штамма *E. coli* ML-35p,

характеризующемся конститутивным синтезом β -галактозидазы в цитоплазме клетки. О состоянии цитоплазматической мембраны *E. coli* судили по ее проницаемости для субстрата β -галактозидазы о-нитрофенила- β -D-галактопиранозид (ONPG) в присутствии пептидов. Тест-культуру выращивали при 37 °C в триптиказо-соевом бульоне (TSB) до стационарной фазы роста, после чего клетки трижды промывали PBS (pH 7,4) и ресуспендировали в той же среде до конечной концентрации 2×10^7 КОЕ/мл. ONPG добавляли до конечной концентрации 2,5 мМ. Изменение оптической плотности раствора, обусловленное накоплением продукта гидролиза ONPG, измеряли спектрофотометрически при 405 нм.

2.13. Получение и анализ бактериальных штаммов со сниженной чувствительностью к АМП

Способность пептидов индуцировать бактериальную резистентность оценивали методом последовательных пересевов бактерий в жидкой среде, содержащей субингибирующие концентрации исследуемых антимикробных препаратов. В качестве тест-культур использовали *E. coli* MDR CI 1057 или *B. licheniformis* B-511. Культуры, достигшие стационарной фазы роста, разводили свежей средой МН, содержащей 0,9% NaCl, до достижения конечной концентрации клеток 10^6 КОЕ/мл. В лунки планшета вносили 50 мкл полученной бактериальной суспензии (в двукратной тест-среде) и 50 мкл растворов испытуемых препаратов. После инкубации в течение 20 – 24 ч при 37 °C определяли значение МИК (1 день). Для последующих пассажей отбирали 2 мкл бактериальной взвеси из лунки 1 дня, соответствующей наивысшей концентрации препарата, при которой сохранялся рост, и переносили в 1 мл той же среды. Далее 50 мкл полученной суспензии вносили в лунки следующего пассажа, содержащие аликвоты пептидов, после чего вновь определяли значение МИК. Культуры бактерий, демонстрировавшие рост при максимальных концентрациях АМП в последний день эксперимента, дополнительно пассировали три раза на агаризованной среде без добавления пептидов с целью получения устойчивых фенотипов. Полногеномное секвенирование полученных устойчивых штаммов бактерий было выполнено на платформе Illumina MiSeq (США). Качество полученных парноконцевых прочтений (100×2) было оценено при помощи программы FastQC. Прочтения низкого качества были удалены с помощью

Trimmomatic, после чего был выполнен повторный контроль качества. Сборка генома контрольного штамма была произведена программой SPAdes с использованием парных и непарных прочтений высокого качества. Качество сборки оценивалось при помощи программы QUAST. Структурную аннотацию генома контрольного штамма проводили в программе Prokka. Для получения выравниваний прочтений ДНК резистентных штаммов на сборку контрольного генома и последующей обработки результатов выравнивания использовали инструменты BWA и SAMtools. Биоинформатический анализ проводился сотрудниками УНЦ ИБХ РАН и ООО «Биоспарк».

2.14. Оценка стабильности АМП в сыворотке крови

Устойчивость исследуемых пептидов к протеолитической деградации оценивали при инкубации в 25% сыворотке свежевыделенной крови человека. Для этого 20 мкл исходного водного раствора пептида с концентрацией 3 мг/мл смешивали с 480 мкл раствора сыворотки и инкубировали при 37 °С в течение 2, 8 и 24 часов. По окончании инкубации белки сыворотки селективно осаждали добавлением ТФУ до конечной концентрации 10% в присутствии 3 М мочевины. В контрольных пробах осаждение проводили сразу после добавления сыворотки. После этого образцы выдерживали при 0 °С в течение 30 мин и центрифугировали при 14000 g в течение 20 мин. Полученные супернатанты анализировали методами аналитической ОФ-ВЭЖХ (колонка Symmetry 300 C18) и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Количество интактного пептида оценивали по площади пика, соответствующего исходному соединению, на хроматограмме ОФ-ВЭЖХ. Для каждого пептида проводили два независимых эксперимента в двух повторностях.

2.15. Оценка ингибирования формирования биопленок под действием АМП

Способность пептидов подавлять формирование биопленок оценивали методом серийных двукратных разведений в жидкой питательной среде LB. Бактериальную культуру выращивали в течение 24 ч и разводили в среде LB до конечной концентрации 10^6 КОЕ/мл. К 50 мкл полученной суспензии добавляли 50 мкл раствора тестируемых пептидов, предварительно приготовленных в 0,1% БСА. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 32 °С и перемешивании 120 об/мин, после

чего определяли рост бактериальной культуры спектрофотометрически при 570 нм. Затем суспензионную культуру удаляли, а лунки трижды промывали стерильной водой. Для окрашивания сформировавшейся пленки в лунки вносили 0,1% водный раствор кристаллического фиолетового (CV) и инкубировали в течение 40 мин при 25°C. После этого лунки промывали стерильной водой для удаления несвязанного красителя и добавляли 30% уксусную кислоту в каждую лунку с последующей инкубацией при 25 °C в течение 15 мин. Полученные экстракты, содержащие CV, переносили в новый планшет и измеряли оптическую плотность при 570 нм.

2.16. Оценка действия АМП на предварительно сформированные биопленки

Биопленки выращивали в 96-луночном планшете при 32 °C в течение 24 ч и перемешивали 120 об/мин для формирования биопленок преимущественно на стенках лунок. Влияние пептидов на массу зрелых биопленок оценивали методом окрашивания CV, как описано в разделе 2.16. Метаболическую активность клеток в составе биопленок определяли с помощью МТТ-теста. Для этого предварительно сформированные биопленки инкубировали с растворами тестируемых пептидов в течение 2 ч, после чего лунки промывали стерильной водой, добавляли раствор МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч при 37 °C. По завершении инкубации надосадочную жидкость удаляли, а образовавшиеся кристаллы формазана растворяли смесью этанола и ДМСО в соотношении 1:1. Через 20 мин измеряли оптическую плотность раствора при 570 нм с использованием микропланшетного ридера AF2200 (Eppendorf, Германия).

2.17. Электрохимические измерения на бислойных липидных мембранах

Измерения на бислойных липидных мембранах (БЛМ) проводили в присутствии пептидов капителлацина или Ar9. В эксперименте с капителлацином БЛМ формировали по методу Мюллера на отверстиях диаметром 0,85 мм в тефлоновой перегородке, разделяющей два отсека ячейки объемом по 2 мл каждый. Для получения мембран использовали экстракт полярных липидов *E. coli* (Avanti Polar Lipids), содержащий фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилглицерин (PG) и кардиолипин (CL) в соотношении 67:23,2:9,8 вес. %. Отсеки ячейки заполняли буферным раствором на основе 5 mM HEPES с добавлением 0,154 M NaCl.

Капителлацин добавляли до конечной концентрации 1 мкМ. Электрохимические измерения проводили при pH 7,4 и 25 °C. Записи тока были оцифрованы с частотой дискретизации 10 кГц и проанализированы с использованием программы ClampFit (версия 9.2; Axon Instruments Inc.). Диаметр пор (D) рассчитывали по формуле $D=2*\sqrt{((g*L)/(\pi \sigma))}$, где L – толщина мембраны (50 Å), g – измеренная проводимость, σ – электропроводность электролита (1,24 См/м).

В другой серии экспериментов для пептида Ar9 БЛМ формировали по методике Мюллера-Рудина на кольцах медной сетки, закрепленной на дне чашки Петри, заполненной раствором электролита (100 мМ KCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4). Мембраны формировали из липидной смеси, включающей фосфатидилхолин (PC), PE, PG, CL в соотношении 35:35:20:10 мол. %. Электрод заземления помещали в раствор электролита в чашке Петри, а измерительный электрод – в пэтч-пипетку, заполненную раствором, содержащим Ar9 в концентрации 1 мкМ или 4 мкМ. Далее пэтч-пипетку подводили к поверхности мембраны до формирования герметичного контакта. После чего к электродам было приложено напряжение величиной +100 мВ, и зарегистрирован ток, проходящий через участок липидного бислоя, контактирующий с пэтч-пипеткой.

2.18. Определение скорости роста бактериальных культур

Ночные культуры *E. coli* разводили в среде LB до концентрации 1×10^6 КОЕ/мл. Аликвоты по 100 мкл полученных суспензий переносили в лунки 96-луночного планшета и инкубировали при 37 °C с перемешиванием со скоростью 900 об/мин. Рост бактериальных культур оценивали по изменению оптической плотности при 570 нм с помощью микропланшетного ридера AF2200 через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 ч.

2.19. Сборка и получение комплекса LptD/LptE

Последовательности *lptD* и *lptE* были амплифицированы из геномной ДНК *E. coli* MDR CI 1057 методом ПЦР с использованием праймеров LPT-1/LPT-2 и LPT-3/LPT-4 соответственно (Таблица 3).

Таблица 3. Праймеры, использованные для получения комплекса LptD/LptE.

Название праймера	Последовательность (5'→3')
-------------------	----------------------------

LPT-1	GGAGATATACATATGAAAAAACGTATCCCCACTCTC
LPT-2	CGCGGATCCTTACAAAGTGTTTTGATACGGCAGAATGT
LPT-3	CGGGATCCGTTACCCAGCGTGGTGGAG
LPT-4	GGAGATATACATATGCGATATCTGGCAACATTGTTG
pET-dir	CATACGATATAAAGATCTGCGGGATCTCGATCC
pET-rev	AAATGCCTGAGGATTTCGCCAATCCGGATATAGTTCC
pLys-dir	GATTGGCGAATCCTCAGGCATTTGAGAAGCAC
pLys-rev	CCCGCAGATCTTTATATCGTATGGGGCTGACTTCAG
LPT-5	CGGGATCCGGTAGCATGCGTAAAGGCGAAGAGCT
LPT-6	CGCTCGAGACTACCTTTGTACAGTTCATCCATACCATGC

Полученные ампликоны были клонированы в экспрессионные векторы: *lptD* – в вектор pTK по сайтам рестрикции XhoI и NdeI, а *lptE* – в вектор pHybr по сайтам рестрикции NdeI и BamHI (**Рисунок 9А**). Вектор pHybr был предварительно сконструирован с использованием метода безлигазного клонирования [293] на основе фрагмента pTK, амплифицированного с помощью праймеров pET-rev и pET-dir, и фрагмента pLysS, амплифицированного с использованием праймеров pLys-rev и pLys-dir, как приведено на **Рисунке 9А, 9Б, 9В**. Далее полученными конструкциями на основе плазмид pHybr и pTK трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3) и проводили коэкспрессию генов *lptE-his₆* и *lptD*.

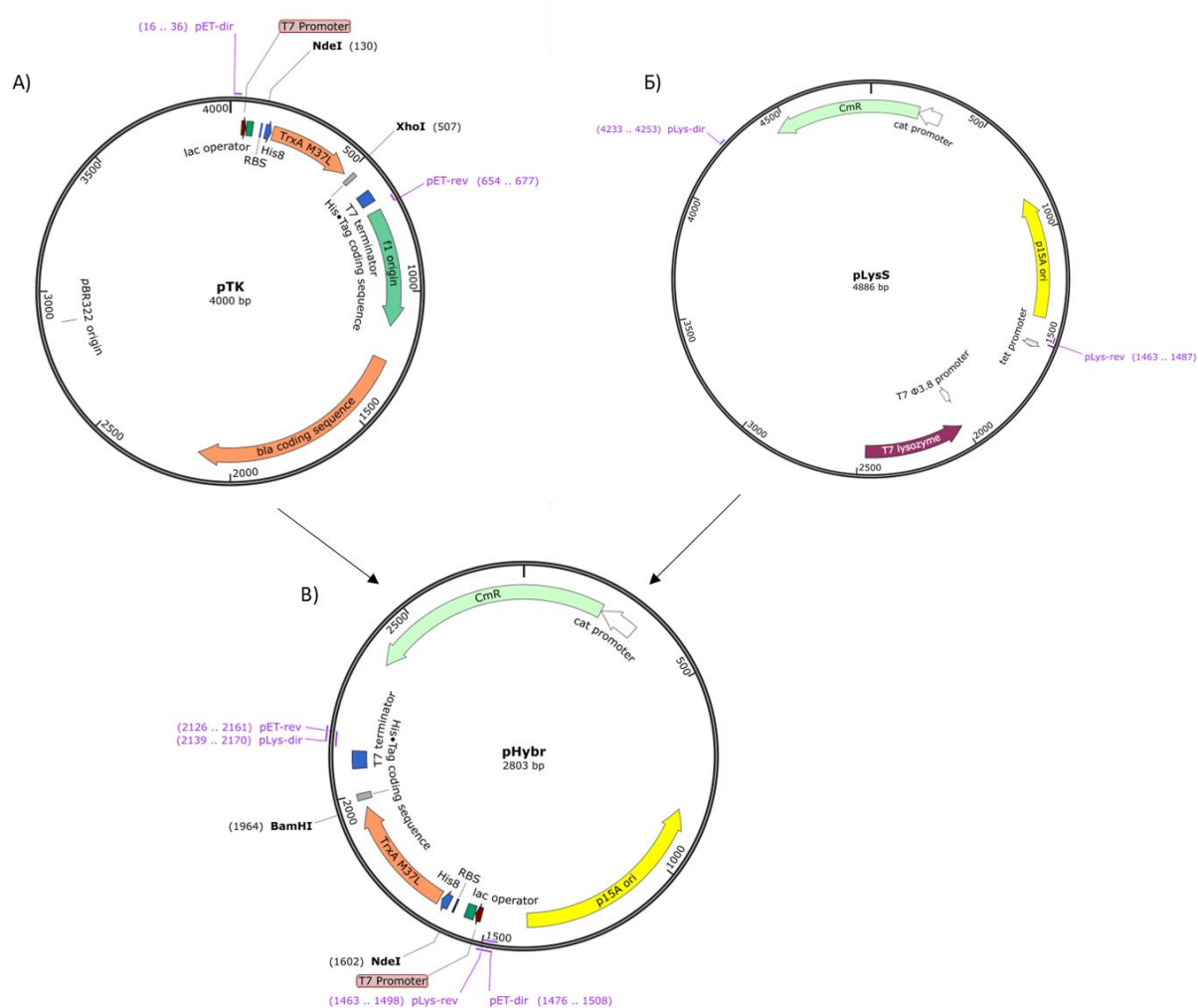


Рисунок 9. Карты плазмид pTK (А), pLysS (Б) и pHybr (В).

Двойные трансформанты отбирали на агаризованной среде LB, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл ампициллина. Для получения флуоресцентно-меченого варианта комплекса, фрагмент, кодирующий GFP, был амплифицирован из плазмиды pJ23119-GFP [294] с использованием праймеров LPT-5 и LPT-6 (**Таблица 3**). Полученный продукт был обработан рестриктазами BamHI и XhoI и клонирован в ранее полученный вектор pHybr-*lptE-his₆* (**Рисунок 10**). В результате была получена конструкция, кодирующая белок LptE, слитый с GFP-His₆ через гибкий GS-GS-линкер. Далее была проведена коэкспрессия белков LptE-GFP-His₆ и LptD в *E. coli* BL21 (DE3) (**Рисунок 10А, 10Б, 10В**).

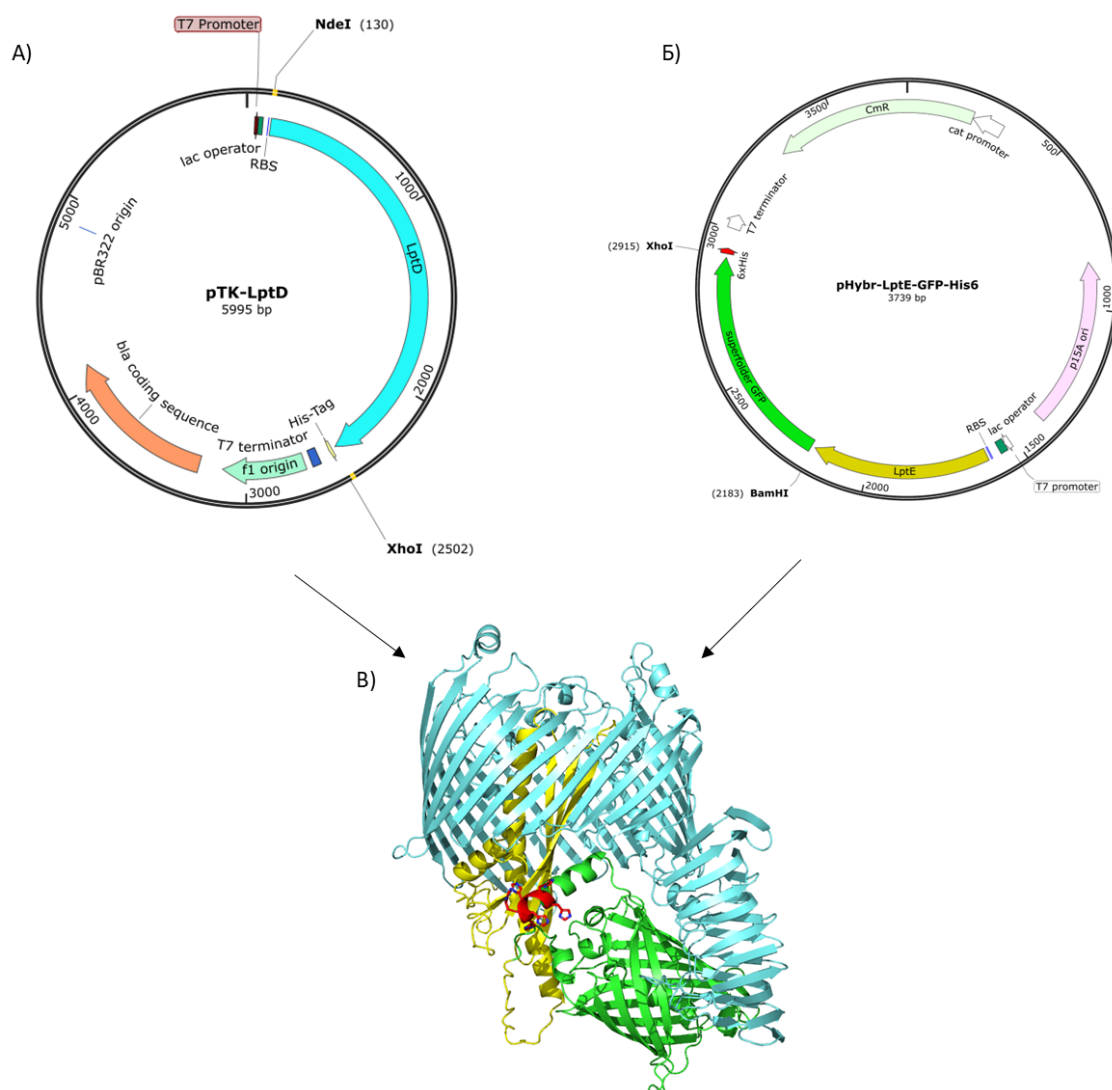


Рисунок 10. Получение меченого комплекса LptD/LptE-GFP-His₆. А) Карта плазмиды pTK-*lptD*. Б) Карта плазмиды pHybr-*lptE-gfp-his₆*. В) Визуализация комплекса LptD/LptE, слитого с GFP, с помощью PyMOL. Модель комплекса была получена с использованием программы AlphaFold3 [295].

Для получения комплексов LptD/LptE-His₆ (DE) или LptD/LptE-GFP-His₆ (DEG) 10 мл ночных культур *E. coli*, несущих соответственно плазмиды pTK-*lptD* / pHybr-*lptE-his₆* либо pTK-*lptD* / pHybr-*lptE-gfp-his₆*, инокулировали в 250 мл среды LB, содержащей 20 мМ глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина, 34 мкг/мл хлорамфеникола, 1 мМ MgSO₄, 0,1 мМ CaCl₂. Полученные культуры выращивали при 37 °С до достижения оптической плотности OD₆₀₀ 0,85 (DE) и 0,4 (DEG). Экспрессию индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ, после чего клетки инкубировали при 22 °С. Спустя 17 ч инкубации финальные значения оптической плотности составили 6,2 для DE и 4,6 для DEG. Протокол

выделения комплексов DE и DEG был идентичным. Клетки осаждали центрифугированием (10000 об/мин) в течение 15 мин при 4 °C, после чего полученный осадок ресуспендировали в 6 мл буфера TBS-A (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 8 mM имидазол, pH 7,8), содержащего 1 mM ингибитора протеаз PMSF. Лизис клеток осуществляли путем ультразвуковой обработки на льду (10 сек воздействия/20 сек пауза, амплитуда 85%, суммарное время 6 мин). Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 5000 об/мин, 4 °C в течение 15 мин, а мембранную фракцию осаждали ультрацентрифугированием при 90000 об/мин (ротатор SW40Ti, Beckman Coulter, США) при 4 °C в течение 1 ч. Мембранный осадок промывали 5 мл буфера TBS-A, содержащего 0,5% натриевой соли N-лауроилсаркозина (Solarbio, Китай), и инкубировали при 4 °C в течение 1 ч при мягком перемешивании. После повторного ультрацентрифугирования при 90000 об/мин в течение 1 ч при 4 °C получали осадок, обогащенный фрагментами наружной мембраны, который далее использовали для экстракции комплекса при 4 °C в 13 мл буфера TBS-B (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM имидазол, pH 7,8), содержащего 1% *N*-оксид лаурилдиметиламина (LDAO, Anatrace, США), 100 мкг/мл лизоцима, в течение 2 ч при мягком перемешивании, после чего вновь центрифугировали при 90000 об/мин в течение 1 ч при 4 °C. Полученный супернатант наносили на Ni-NTA-сефарозу (2 мл), предварительно уравновешенную буфером TBS-B, содержащим 1% LDAO. Смолу последовательно промывали буфером TBS-B, содержащим 1% LDAO, далее буфером TBS-B, содержащим 0,1% LDAO, и далее буфером TBS-B, содержащим 1% *n*-октил-бета-D-глюкопиранозид (OG, BLD Pharmatech, Китай). Комплекс элюировали буфером TBS-C (25 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 250 mM имидазол, pH 7,8), содержащим 1% OG. Полученные фракции анализировали методом SDS-PAGE, вестерн-блоттинга и масс-спектрометрии.

2.20. SDS-PAGE и вестерн-блот анализ

Фракции, содержащие комплексы LptD/LptE-GFP-His₆ или LptD/LptE-His₆, смешивали с буфером Лэммли и разделяли электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии SDS при напряженности поля 25 В/см в течение 1 ч. После окрашивания гелей кумасси бриллиантовым синим R-250 полосы,

соответствующие анализируемым белкам, вырезали и анализировали методом масс-спектрометрии в Центре коллективного пользования ГНЦ ИБХ РАН. Для последующего вестерн-блот анализа белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм (Bio-Rad, США) методом влажного переноса при 20 В в течение 1 ч. Мембрану блокировали в буфере TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6), содержащем 5% обезжиренного сухого молока, в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными кроличьими антителами к His-метке, разведенными в тысячу раз в TBST (Abcam, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех промывок в TBST мембрану инкубировали со вторичными антителами против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:25000 в TBST, содержащем 5% сухого молока, в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывок в TBST мембрану инкубировали с субстратом пероксидазы хрена Pico ECL (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя и визуализировали белковые полосы с помощью системы ChemiDoc (Bio-Rad, США).

2.21. Оценка связывания белковых молекул методом микротермофореза

Связывание пептидов с комплексом LptD/LptE-GFP-His₆ оценивали методом микротермофореза на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) с использованием стандартных капилляров (NanoTemper Technologies). Концентрация комплекса во всех измерениях составила 300 нМ в буфере, содержащем 25 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 mM NaCl, 250 mM имидазола, 1% OG. Для пептидов готовили серийные разведения в 0,1% водном растворе БСА в диапазоне концентраций от 40 мкМ до 1 нМ. После чего белок и лиганд смешивали в равных объемах и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин для удаления возможных агрегатов. Измерения проводили при 20% мощности термофоретического нагрева и 100% мощности светодиода. Значения K_d рассчитывали с помощью программного обеспечения MO.Affinity Analysis v2.3 (NanoTemper Technologies).

2.22. Оценка деполяризации цитоплазматической мембраны

Культуру *E. coli* ML-35p выращивали в среде LB при 37 °C до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,5$, после чего клетки разбавляли в 10 раз в PBS (pH 7,4), содержащем 20 mM глюкозы и 0,05% BSA. Полученную бактериальную суспензию инкубировали с АМП при 37 °C, 900 об/мин в течение 1 ч. Далее добавляли PI и DiBAC4(3) до конечных концентраций 5 мкг/мл и 2 мкМ соответственно, и выдерживали в темноте при 37 °C в течение 15 мин. Затем клетки осаждали при 5000 g в течение 5 мин, дважды промывали холодным PBS, ресуспендировали в 1 мл PBS и анализировали методом проточной цитометрии с использованием прибора NovoCyte 2060R (ACEA Biosciences Inc). Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении NovoExpress версии 1.2.4 (ACEA Biosciences).

2.23. Исследования на животных

Все исследования на животных выполнены на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с одобрения локального этического комитета ГНЦ ПМБ (протокол исследования на животных № VP-2022/1, № 924/23), а также в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации и Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей».

3. Результаты и обсуждение

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 -шпилечные АМП, названные ареницинами [199]. При анализе структур их белков-предшественников был обнаружен BRICHOS-домен, ранее идентифицированный в составе белков многих животных и человека. Изначально считалось, что BRICHOS-домен у полихет выполняет функцию внутримолекулярного шаперона, способствующего фолдингу АМП при процессинге предшественников исключительно β -шпилечных пептидов. Однако в предшествующих исследованиях, выполненных в УНЦ ИБХ РАН, были 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 является универсальным функциональным элементом белков-предшественников, участвующим в биосинтезе АМП различных структурных классов у полихет аналогично 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.

Сбор образцов тканей полихет с последующим выделением, очисткой и анализом биологической активности потенциальных АМП является сложным и трудоемким процессом. Кроме того, хранение и транспортировка полученных образцов в неоптимальных условиях могут привести к деградации веществ пептидно-белковой природы, что затруднит получение достоверных данных о первичной структуре потенциальных АМП. Одним из распространенных подходов к обнаружению новых пептидов, синтезируемых рибосомой, является поиск генов, кодирующих потенциальные АМП, в базах данных нуклеотидных последовательностей по гомологии с ранее охарактеризованными защитными пептидами и депонированными в специализированных базах данных (например, Antimicrobial Peptide Database или APD). Однако, данный метод имеет некоторые ограничения, главным из которых является невозможность обнаружить принципиально новые структурные семейства АМП. Известно, что большинство

АМП животных синтезируется в составе белков-предшественников, из которых зрелый активный пептид высвобождается путем процессинга специализированными протеазами организма-хозяина [296,297], что можно рассматривать в качестве дополнительных вводных данных при разработке стратегий поиска новых АМП-подобных молекул.

В данном исследовании был использован подход, основанный на *de novo* сборке транскриптомов различных видов полихет с последующим поиском и анализом белков, содержащих в своей структуре BRICHOS-домен, в массивах транслированных последовательностей. В качестве объектов исследования нами были выбраны различные виды морских полихет, бóльшая часть из которых принадлежит к инфраклассу *Scolecida*. Выбор был обусловлен тем, что у представителей данного таксона (например, *A. marina* и *N. minor*) ранее были идентифицированы BRICHOS-ассоциированные АМП.

3.1. Поиск новых BRICHOS-ассоциированных АМП

Сборку транскриптомов животных проводили на основе соответствующих данных, депонированных в базе данных GenBank для всех представителей таксона *Scolecida* (SRA, RNA-seq, по состоянию на 03.2021), а также для полихеты *Urechis unicinctus* из подкласса эхиурид (*Echiura*). После удаления адаптерных последовательностей, неоднозначных и низкокачественных прочтений были получены очищенные риды для сборки транскриптомов с помощью пакета Trinity. Далее собранные транскриптомы были преобразованы в базы данных транслированных последовательностей. Целевые белки-предшественники были обнаружены в полученных базах данных с помощью инструментов BLASTP. Поиск транскриптов, кодирующих BRICHOS-домен, позволил отобрать из полученных транскриптомных данных около 100 целевых последовательностей. Учитывая ранее опубликованные данные об особенностях процессинга представителей данного семейства АМП, дальнейший поиск последовательностей зрелых пептидов осуществлялся на основании их расположения между стоп-кодоном и сайтом протеолиза ферментами семейства фуринов. В результате такого анализа и отсеивания транскриптов с неполной информацией о С-концевой части белков-

предшественников была сформирована библиотека из 84 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 [295]. В связи с тем, что большинство предсказанных пептидов в настоящее время не охарактеризованы с точки зрения биологической активности и не представлены в открытых источниках, их аминокислотные последовательности не раскрываются. Для иллюстрации полученных данных на **Рисунке 11** показано структурное многообразие обнаруженных BRICHOS-ассоциированных пептидов у полихет.

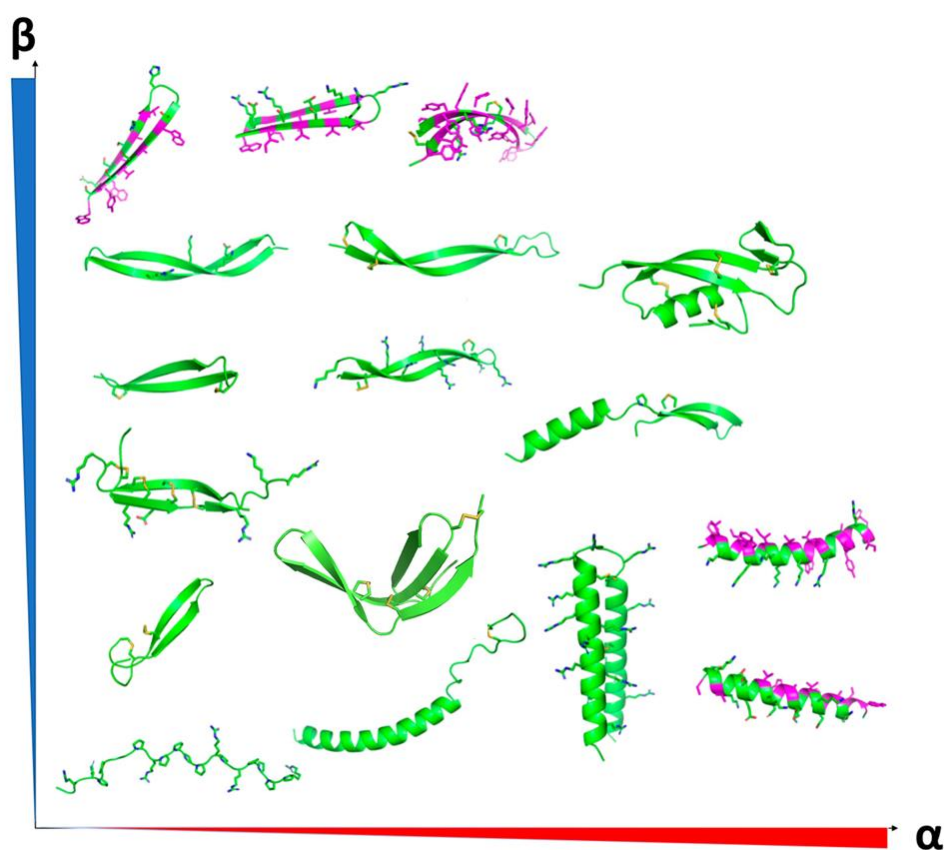
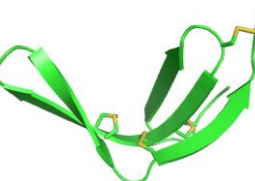


Рисунок 11. Биоразнообразие новых обнаруженных BRICHOS-ассоциированных АМП. Классификация пептидов была проведена с учетом представленности в их структуре α -спиральных участков (ось абсцисс) и β -листов (ось ординат). Розовым цветом обозначены гидрофобные участки в структуре отдельных пептидов с выраженной амфифильностью. Дисульфидные связи выделены желтым цветом.

В результате, было предсказано существование следующих структурных семейств: β -шпильчатые АМП длиной от 14 до 40 а.о. с симметричным и асимметричным расположением остатков цистеина (стабилизированные 1 – 3

дисульфидными связями); β -шпилечные АМП без остатков цистеина; α -спиральные АМП длиной до 60 а.о., в том числе несущие С-концевой мотив «Rana-box»; пептиды, состоящие из двух доменов – α -спирального и β -шпилечного, стабилизированного одной дисульфидной связью; дефенсин-подобные АМП, обогащенные остатками цистеина. Для определения биологической активности у представителей некоторых их вышеупомянутых семейств нами была получена панель АМП, представленная в Таблице 4.

Таблица 4. Характеристика отобранных BRICHOS-ассоциированных АМП.

Объект исследования	Вид	Первичная структура	Пространственная структура*
Капителлацин (β -шпилечный АМП)	<i>Capitella teleta</i>	SPRV C IRV C RNGV C YR R C WG	
Абареницин (β -шпилечный АМП)	<i>Abarenicola pacifica</i>	GY C FT A C Y LRNGV R I C Y R RCN	
UuBRI-21 (β -шпилечный АМП)	<i>Urechis unicinctus</i>	G F C GY A C Y YRNGV R I C V R YCN	
HfBRI-25 (β -шпилечный АМП с асимметричным расположением остатков цистеина)	<i>Heteromastus filiformis</i>	SPRG C F C VWISVNGRRVR R C WGSG C	
CtBRI-28 и CtBRI-28(i) (α -спиральные АМП, содержащие С-концевой «Rana-box»)	<i>Clymenella torquata</i>	GWLSKAWKKAKEVAGKV V A C I Q TR C LG GWLSKAWKKAKEAAGKAV G A C I Q TR C LG	
HfBRI-28 (α -спиральный АМП)	<i>Heteromastus filiformis</i>	GWLKS I WKGIKKAVKWVL RHGVYVRIT F	
AmBRI-44a (дефенсин-подобный АМП, стабилизированный 4 дисульфидными связями)	<i>Arenicola marina</i>	AT C PAGDVLVRYNT C Y W F C CD F C VRYSNGYTT C Y R C SYLGR S C K	

*Информация о пространственной структуре АМП была получена с использованием программы AlphaFold3 [295].

3.2. Получение новых АМП

Рекомбинантные аналоги обнаруженных пептидов были получены в составе гибридных белков, содержащих модифицированный тиоредоксин А (M37L) и участок из восьми остатков гистидина (His-tag). Тиоредоксин А, будучи нетоксичным цитозольным белком *E. coli*, является одним из широко используемых белков-носителей для экспрессии АМП [298] благодаря способности накапливаться в растворимой форме в цитоплазме клеток-хозяева. При дизайне нуклеотидных последовательностей не допускали использования редких кодонов в геноме *E. coli* и формирования молекулой мРНК стабильных вторичных структур. Каждый из генов, кодирующих пептиды, был получен путем отжига 3'-концов двух праймеров, соответствующих N- и С-концевым участкам пептида, с последующей достройкой ДНК-полимеразой, и клонирован в экспрессионный вектор на основе плазмиды серии pET длиной 4000 п.н. 5'-концы прямых и обратных праймеров были фланкированы сайтами узнавания эндонуклеазами рестрикции BglIII и EcoRI, соответственно. В конструкцию также был введен метиониновый кодон, по остатку которого осуществляли расщепление гибридного белка бромцианом в кислой среде, что позволило получить целевые пептиды с нативным N-концом. Штаммы-продуценты были получены методом трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3), несущих ген T7 РНК полимеразы, соответствующими плазмидными конструкциями. Индукцию экспрессии осуществляли при достижении клетками оптической плотности 0,7–1,0 с помощью 0,2 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG). Культивирование проводили в течение 5 ч при температуре 30 – 32°C и интенсивном перемешивании. Далее клетки осаждали центрифугированием и удаляли супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мМ фосфатном буфере, содержащем 30 мМ имидазола и 6 М гидрохлорида гуанидина и подвергали ультразвуковому лизису. Очистку соответствующих белков осуществляли с помощью металлохелатной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ на полупрепаративной колонке Reprosil-Pur C18-AQ (**Рисунок 12**). При очистке пептида CtBRI-28, обладающего высокой гидрофобностью, было обнаружено, что время его выхода на хроматограмме совпадает со временем выхода тиоредоксина А. В связи с этим была проведена ультрафильтрация белка-предшественника после его

расщепления бромцианом с использованием фильтров Millipore с порогом отсечения 5 кДа, что позволило эффективно удалить белок-носитель и нерасщеплённый гибридный белок. Как результат, в ходе ОФ-ВЭЖХ наблюдался и визуализировать отдельный пик, соответствующий целевому пептиду (**Рисунок 12**).

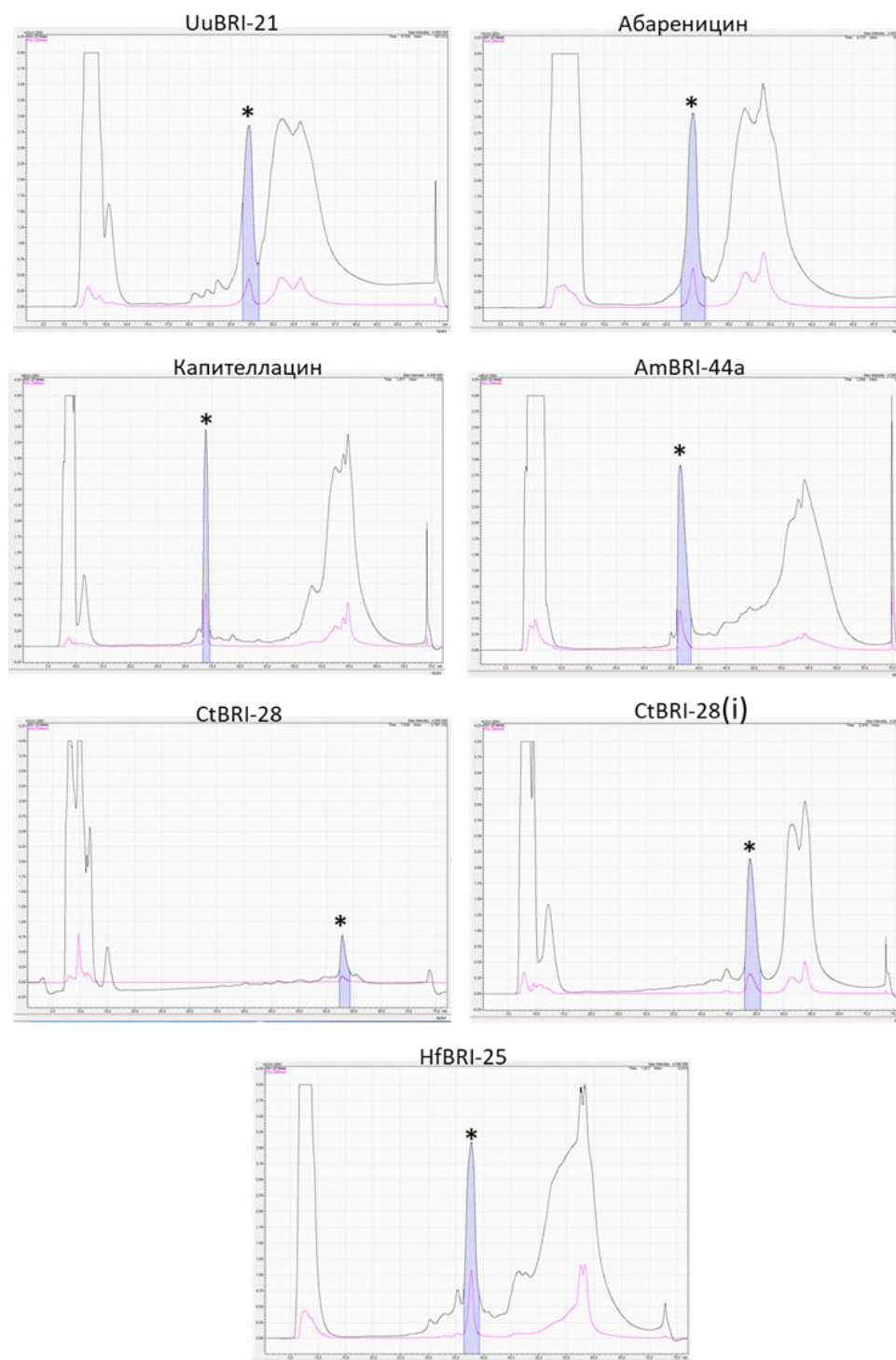


Рисунок 12. Хроматограммы очистки полученных АМП методом ОФ-ВЭЖХ.

Фракции, содержащие целевые АМП, выделены звездочкой и штриховкой.

Детектирование осуществлялось при двух длинах волн: 214 нм (черный цвет) и 280 нм (розовый цвет).

Содержание целевых пептидов в полученных образцах было подтверждено с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии (**Таблица 5**). Выход пептидов составил от 4,5 до 8,2 мг на литр бактериальной культуры. При оценке уровня экспрессии пептида HfBRI-28 методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) было показано отсутствие видимой полосы гибридного белка в суммарном клеточном лизате, что может свидетельствовать о крайне низком уровне экспрессии или ее отсутствии. Такое явление часто связано с высокой токсичностью продуцируемого гибридного белка для клеток штамма *E. coli* [299]. Вследствие этого пептид был получен методом твердофазного синтеза сотрудниками отдела Общей патологии и патологической физиологии Института экспериментальной медицины. Чистота пептида составила не менее 95%.

Таблица 5. Характеристика полученных BRICHOS-ассоциированных АМП.

Название или обозначение пептида	Выход рекомбинантного пептида, мг/л	Расчетное значение молекулярной массы, Да	Экспериментальное значение m/z (МАЛДИ-МС)
UuBRI-21	7,1	2476,08	2476,26
Абареницин	5,1	2527,16	2527,04
Капителлацин	6,1	2535,26	2535,28
AmBRI-44a	8,2	5103,17	5102,96
CtBRI-28	1,5	3027,68	3028,14
CtBRI-28(i)	3,1	2929,57	2929,77
HfBRI-25	4,5	2837,35	2836,57
HfBRI-28	Хим. синтез	3368,99	3368,72

3.3. 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 (**Рисунок 13**).

АМП	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК, мкМ)											
	Г(-)							Г(+)				
	EC	AB	KP	PA	ECI	PM	VH	SA	BS	BL	BM	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
EC: <i>E. coli</i> ATCC 25922												

Рисунок 13. Антибактериальная активность обнаруженных АМП.

Стоит отметить, что активность большинства АМП значительно снижается в среде с повышенной ионной силой, что следует учитывать при определении объективных значений МИК. Для поддержания оптимальных условий роста морской бактерии *Vibrio harveyi* BB120 использовали среду с добавлением 3% NaCl. Цитотоксическое действие пептидов было исследовано на свежесыведенных человеческих эритроцитах и адгезионной клеточной линии человека HEK293T (Рисунок 14).

АМП	*Токсичность в отношении эукариотических клеток при 128 мкМ (%)	
	Эритроциты	HEK293T
Капителлацин		
Абареницин		
UuBRI-21		
HfBRI-25		
CtBRI-28		
CtBRI-28(i)		
HfBRI-28		
AmBRI-44a		
*0-10 ■ 10-20 ■ 20-30 ■ 30-40 ■ 40-50 ■ 50-60 ■ 60-70 ■ 70-80 ■ 80-90 ■ 90-100 ■		

Рисунок 14. Цитотоксичность обнаруженных АМП.

Согласно полученным данным, каждому из обнаруженных семейств BRICHOS-ассоциированных АМП свойственна антимикробная активность в отношении определенных групп патогенов. Так, представители семейства α -спиральных пептидов, подобно ранее описанному никомицину-1, проявляют выраженную активность преимущественно в отношении грамположительных бактерий. Следует отметить, что аминокислотная последовательность CtBRI-28 демонстрирует некоторое сходство с никомицинами за счет наличия С-концевой дисульфидной петли типа «Rana-box», характерной для ряда семейств АМП из кожного секрета амфибий и рыб [300]. Ряд исследований указывает на то, что этот мотив может играть ключевую роль для проявления антимикробной активности. С другой стороны, было показано, что удаление данного мотива приводит к сохранению или даже повышению активности в отношении отдельных штаммов бактерий [301–303]. Таким образом, сделать однозначный вывод о функциональном значении мотива «Rana-box» достаточно сложно и требуется детальный анализ связи «структура-активность» для каждого конкретного пептида. Среди исследованных пептидов CtBRI-28 демонстрирует наиболее выраженную антибактериальную активность в отношении большинства тест-штаммов, однако обладает высокой сопутствующей цитотоксичностью в отношении клеток человека. Изоформа пептида CtBRI-28, CtBRI-28(i), характеризуется меньшей гидрофобностью по сравнению с CtBRI-28 (индексы GRAVY -0,126 и 0,2, соответственно), что сопровождается снижением как антибактериальной активности, так и цитотоксичности. В свою очередь, HfBRI-28, обладая умеренной антибактериальной активностью наряду с высокой токсичностью, демонстрирует специфичность к грамотрицательным бактериям *V. harveyi* – основным патогенам ряда беспозвоночных морских животных.

Представители семейства β -шпилечных BRICHOS-ассоциированных АМП, напротив, преимущественно активны в отношении грамотрицательных бактерий. Повышенный интерес к β -шпилечным структурам обусловлен их высокой устойчивостью к протеолитической деградации, быстрым бактерицидным эффектом, а также сравнительно низкой вероятностью формирования бактериальной резистентности [207]. Обнаруженное нами семейство β -шпилечных АМП включает пептиды как с симметричным (капителлацин, абареницин и UuBRI-

21), так и с асимметричным (HfBRI-25) расположением остатков цистеина. Для HfBRI-25 аранжировка дисульфидных связей (C1-C4/C2-C3) была подтверждена с помощью гидролиза трипсином и последующим анализом методами ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ масс-спектрометрии (**Рисунок 15, 16**). После расщепления пептида отсутствовали два фрагмента, соответствующие *N*- и *C*-концевым участкам, которые ожидалось бы при альтернативном замыкании C1-C2/C3-C4. Основные пики на хроматограмме ОФ-ВЭЖХ соответствовали двум линейным фрагментам (4 – 16 а.о.) и (19/20 – 25 а.о.), соединенным двумя дисульфидными связями.

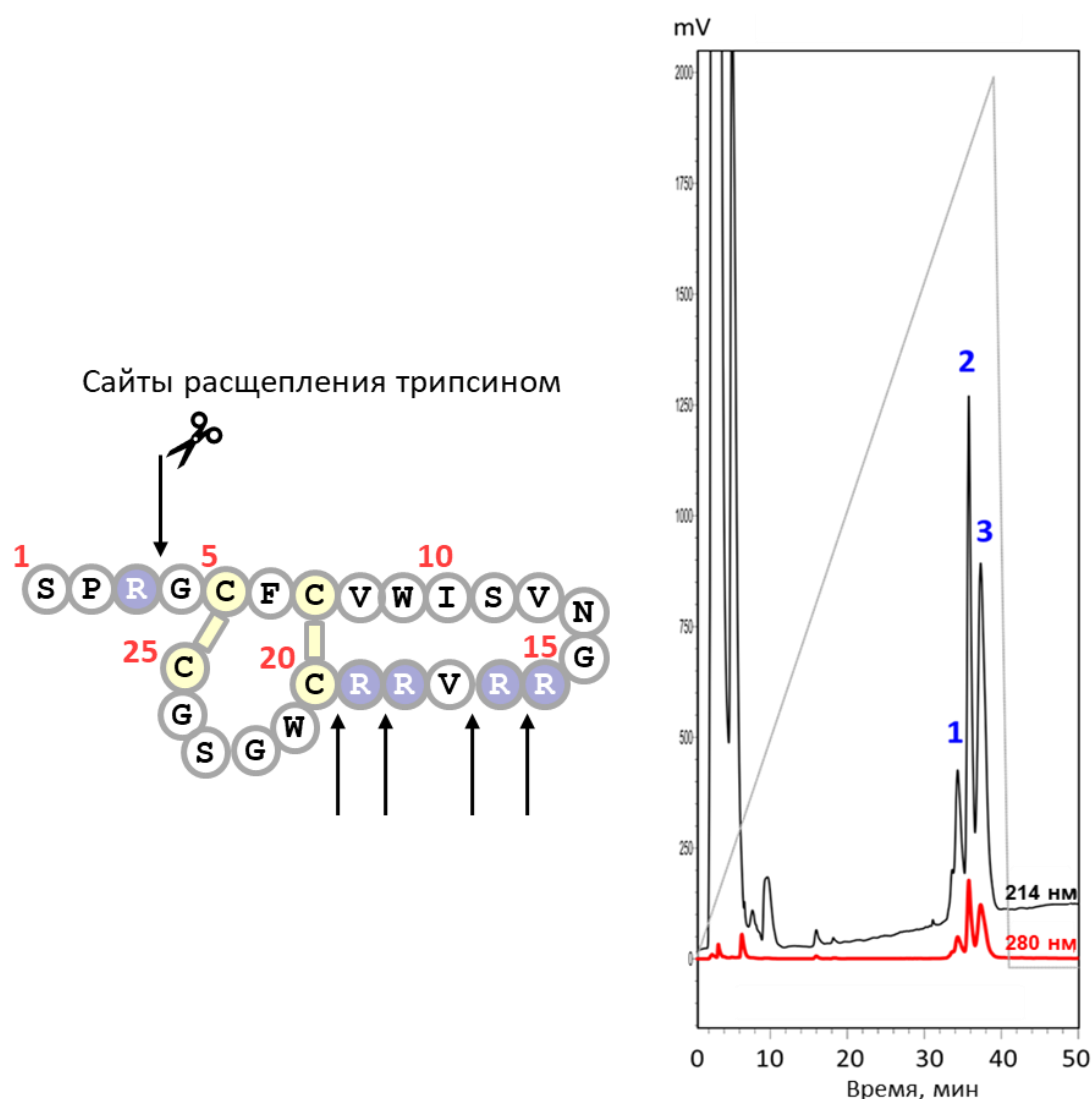


Рисунок 15. Анализ продуктов расщепления пептида HfBRI-25 трипсином после 16 ч инкубации методом ОФ-ВЭЖХ.

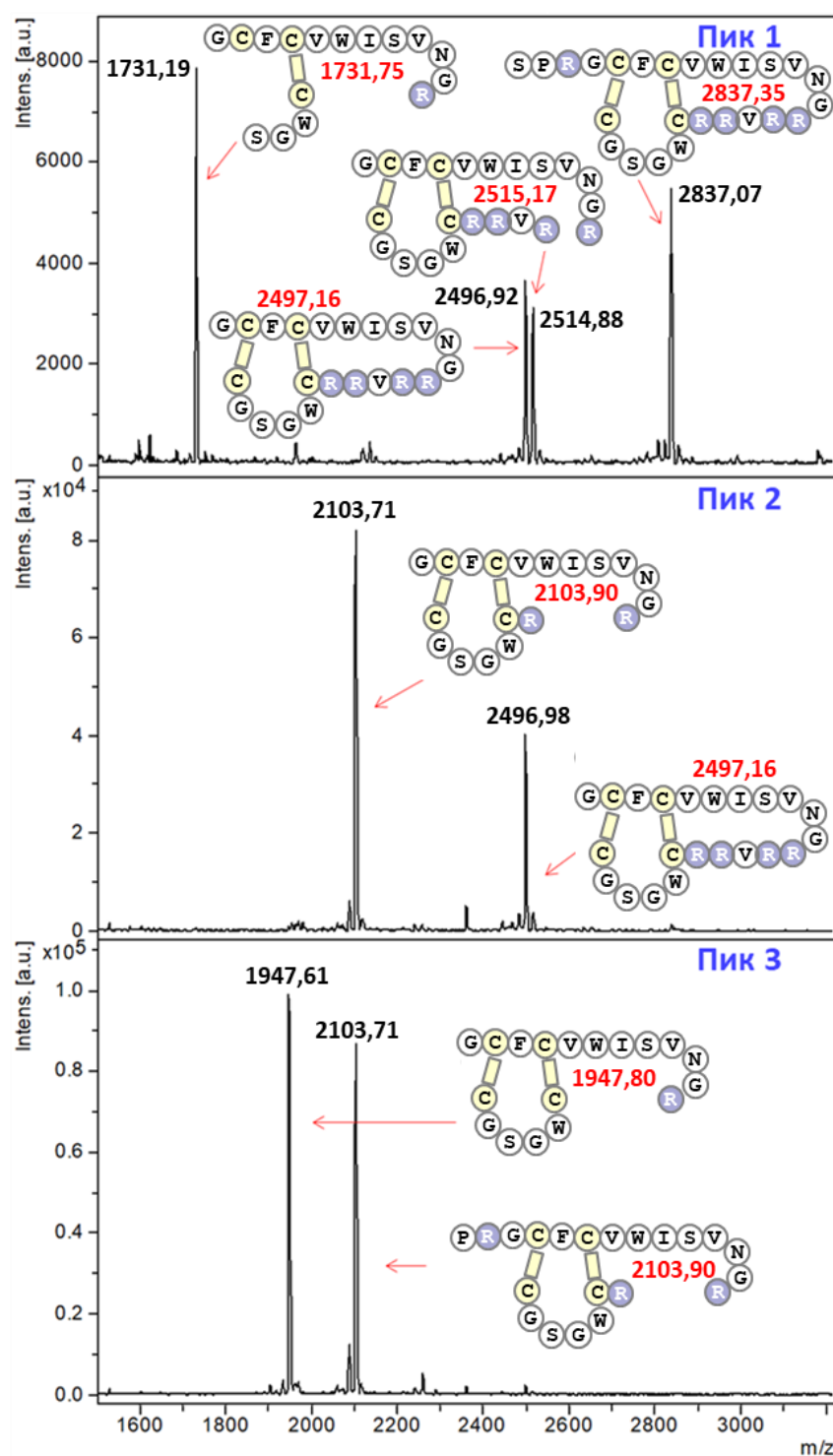


Рисунок 16. Анализ продуктов гидролиза пептида HfBRI-25 трипсином методом МАЛДИ масс-спектрометрии. Экспериментальные значения m/z для основных фракций, собранных после ОФ-ВЭЖХ, указанные черным цветом, соответствовали расчетным значениям молекулярной массы, обозначенным красным цветом.

Среди β -шпилечных пептидов HfBRI-25 и капителлацин обладали высокой селективностью действия в отношении бактериальных клеток, что позволяет рассматривать их в качестве матриц для дальнейшей модификации их структуры с

целью увеличения антибактериальной активности. HfBRI-25 проявлял 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 биоплёнки или обладающих *mcr-1*-опосредованной устойчивостью к полимиксинам [6], составляет 1 – 2 мкМ (Таблица 6). Принципиально важной особенностью пептида HfBRI-25 является его устойчивость к инаktivации фетальной бычьей сывороткой (ФБС), в присутствии которой значительно снижается или полностью подавляется активность многих природных АМП [304]. Однако в случае HfBRI-25 его эффективность сохраняется в средах, содержащих 5, 10 и даже 25% ФБС.

Таблица 6. Активность пептида HfBRI-25 в отношении различных штаммов *E. coli*.

Штаммы <i>E. coli</i>	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК, мкМ)		
	МН	МН +0.9% NaCl	МН +0.9% NaCl +5% ФБС
ML-35p	0,25	1	1
ATCC 25922	0,5	1	2
ATCC 23724	0,5	1	2
K12 BW25113	0,125	1	2
K12 SBS 1936	0,5	2	2
CI 214	0,25	1	1
XDR CI 3600	0,5	2	2
MDR 1057	0,5	1	1
XDR U10 (<i>mcr-1</i> ⁺)	0,125	1	1
XDR U22 (<i>mcr-1</i> ⁺)	0,125	1	1

Полученные данные позволяют предположить наличие активности у пептида HfBRI-25 в отношении биопленочных сообществ, включающих *E. coli*. Биопленки, образуемые различными штаммами данной бактерии, усугубляют течение целового ряда инфекций, включая воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона), инфекции урогенитального тракта, катетер-ассоциированные инфекции, а также инфекции, связанные с медицинскими устройствами (протезы, шунты) [305,306]. Эрадикация зрелых биопленок является сложной задачей, поскольку бактерии, входящие в их состав, обладают высокой устойчивостью к антибактериальным агентам, что требует применения высоких концентраций препаратов. Способность HfBRI-25 убивать бактерии в составе предварительно сформированных биопленок *E. coli* оценивали по присутствию остаточного

количества метаболически активных клеток после обработки пептидом с использованием МТТ-теста. На первом этапе был проведен скрининг штаммов *E. coli* на способность формировать биопленки на поверхности лунок планшета методом окрашивания кристаллическим фиолетовым. После этого осуществляли экстракцию связанного красителя 30% уксусной кислотой с последующим измерением оптической плотности при 570 нм. На основании полученных данных ($OD_{570}=0,3726 \pm 0,03$) штамм *E. coli* K12 SBS 1936 был выбран в качестве модельного объекта для дальнейшего исследования антибиопленочной активности HfBRI-25. Показано, что пептид снижает жизнеспособность этих клеток до 3% при концентрации, вдвое превышающей МИК (Рисунок 17). В качестве контроля был выбран антибиотик из группы фторхинолонов ципрофлоксацин, широко используемый в клинической практике для лечения инфекций мочевыводящих путей, вызванных *E. coli* [307]. Однако в последние годы все чаще выявляются уропатогенные штаммы *E. coli*, резистентные к данному препарату [308,309].

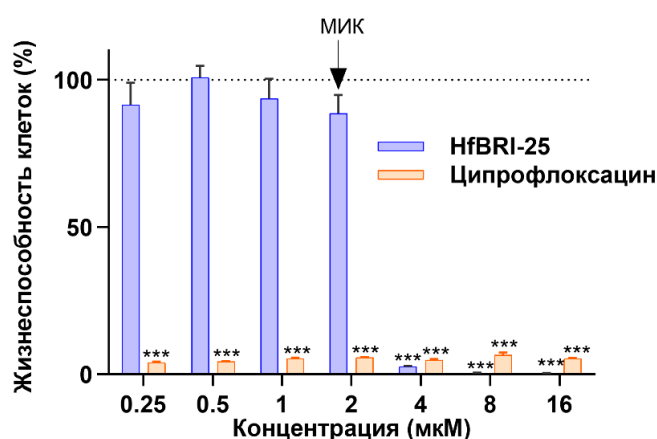


Рисунок 17. Влияние HfBRI-25 и ципрофлоксацина на жизнеспособность клеток *E. coli* K12 SBS 1936 в составе биопленки.

В рамках сравнения антибактериального потенциала селективных β -шпилечных пептидов мы также оценили способность капителлацина воздействовать на бактерии в составе биопленки. При концентрации $2 \times \text{МИК}$ пептид снижал жизнеспособность клеток *E. coli* K12 SBS 1936 всего лишь на 28%, что значительно уступает эффективности пептида HfBRI-25. Полученные результаты подтверждают высокую активность пептида HfBRI-25 как в отношении планктонных форм, так и биопленок *E. coli*.

Другие β -шпилечные пептиды абареницин и UuBRI-21 являются патентно чистыми структурными гомологами ареницина-3, на основе которого компанией

Adenium Biotech был разработан аналог AA139 с подтвержденной *in vivo* эффективностью [213]. Согласно результатам скрининга и абареницин, и UuBRI-21 обладали высокой активностью в отношении большинства грамотрицательных бактерий группы ESKAPEE, однако проявляли значительную токсичность в отношении человеческих эритроцитов. В связи с этим данные высокоактивные соединения представляют особый интерес в качестве исходных матриц для рационального дизайна аналогов со сниженной токсичностью. Важно отметить, что UuBRI-21 (Uu), в отличие от абареницина, не оказывает цитотоксического действия на эукариотические клетки линии HEK293T в использованной нами тест-среде, что, вероятно, может объясняться его высокой аффинностью к компонентам ФБС (снижение активности в 16 раз в отношении *E. coli* ML-35p) (Таблица 7).

Таблица 7. Влияние ФБС в среде на антибактериальную активность гомологов ареницина-3 в отношении *E. coli* ML-35p.

Пептид	МИК, мкМ	
	МН + 0,9% NaCl	МН + 0,9% NaCl + 10% ФБС
Абареницин	0,25	1
AA139	0,25	1
Uu	0,25	4

Особый интерес представляет выявленное нами у *Arenicola marina* семейство дефенсин-подобных АМП, которое включает два предсказанных пептида, названных AmBRI-44a и AmBRI-44b (Рисунок 18). Ранее в работе [310] при анализе экспрессии генов в целомоцитах этого пескожила был обнаружен голологичный им пептид AmIMP2, обладающий неизвестной функцией и синтезируемый в составе белка-предшественника, содержащего BRICHOS-домен. При этом уровень экспрессии для кодирующего AmIMP2 гена был низкий. Расположение и количество остатков цистеина в его последовательности лишь отдалённо напоминают структуру дефенсинов позвоночных. В отличие от ранее описанных препропоследовательностей BRICHOS-ассоциированных АМП, например, препроареницинов, белки-предшественники AmIMP2, а также AmBRI-44a и AmBRI-44b содержат в своей структуре не сигнальный пептид, а трансмембранный регион, что может свидетельствовать об ином пути внутриклеточной локализации и/или условиях активации. AmBRI-44a и AmBRI-44b отличаются друг от друга лишь двумя аминокислотными остатками (L39M, S42R) и при нейтральных значениях pH

имеют положительный заряд (+3 и +4, соответственно), что является характерной особенностью катионных АМП, необходимой для проявления антимикробной активности. При этом их первичная структура демонстрирует низкую степень гомологии с известными АМП из базы данных APD3 (<40%), а ближайшими гомологами по расположению остатков цистеина являются хитин-связывающие растительные АМП семейства гевеинов, обладающие противогрибковой активностью [311].

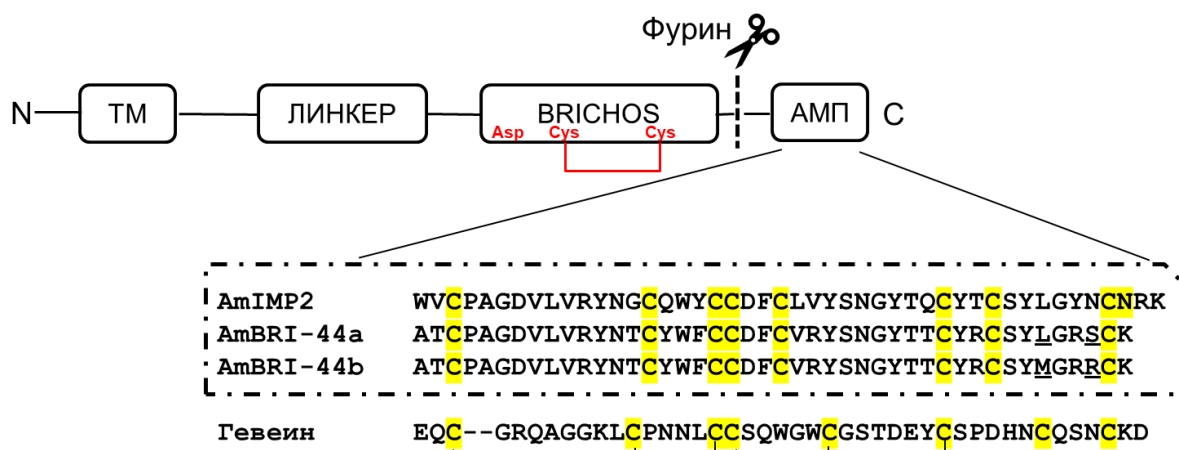


Рисунок 18. Структурная организация белков-предшественников цистеин-богатых пептидов, содержащих BRICHOS-домен (AmIMP2, AmBRI-44a, AmBRI-44b) из *A. marina* и выравнивание аминокислотных последовательностей их зрелых форм с растительным АМП гевеином из *Hevea brasiliensis* (UniProt: P02877). Остатки цистеина выделены желтым цветом, аминокислотные различия между двумя новыми АМП AmBRI-44a и AmBRI-44b подчеркнуты. Квадратные скобки показывают порядок замыкания четырех дисульфидных связей.

Для изучения биологических свойств пептидов данного семейства был выбран AmBRI-44a, последовательность которого не содержит остаток метионина. Данный выбор был обусловлен возможностью применения разработанной нами ранее схемы очистки, основанной на реакции расщепления бромцианом по введенному остатку метионина в участке между белком-носителем и пептидом, что упрощает выделение целевого продукта после экспрессии. Вторичную структуру AmBRI-44a изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) в воде и в присутствии мицелл РС (**Рисунок 19А**). КД-спектр пептида в воде характеризуется выраженным минимумом при 195 нм, перегибом при 200–205 нм и максимумом при 225 нм. При добавлении мицелл РС наблюдается изменение конформации пептида, что сопровождается появлением дополнительного минимума при 210 нм. Несмотря

на различия в формах КД-спектров, анализ данных с использованием программы CONTINLL показал схожее соотношение элементов вторичной структуры: преобладание β -тяжей и β -поворотов при отсутствии α -спиралей (**Рисунок 19Б**). Полученные результаты хорошо согласуются с данными моделирования пространственной структуры AmBRI-44a *de novo* с использованием алгоритма AlphaFold3 (**Рисунок 19В**). Для полученной модели характерно наличие центрального элемента структуры – β -шпильки (20–36 а.о.), стабилизированной дисульфидной связью (Cys23 – Cys33) и типичным структурным элементом β -изгиба (Asn28 – Gly29). Таким образом, AmBRI-44a представляет собой преимущественно β -структурный пептид с нетипичной пространственной организацией для ранее описанных в литературе АМП.

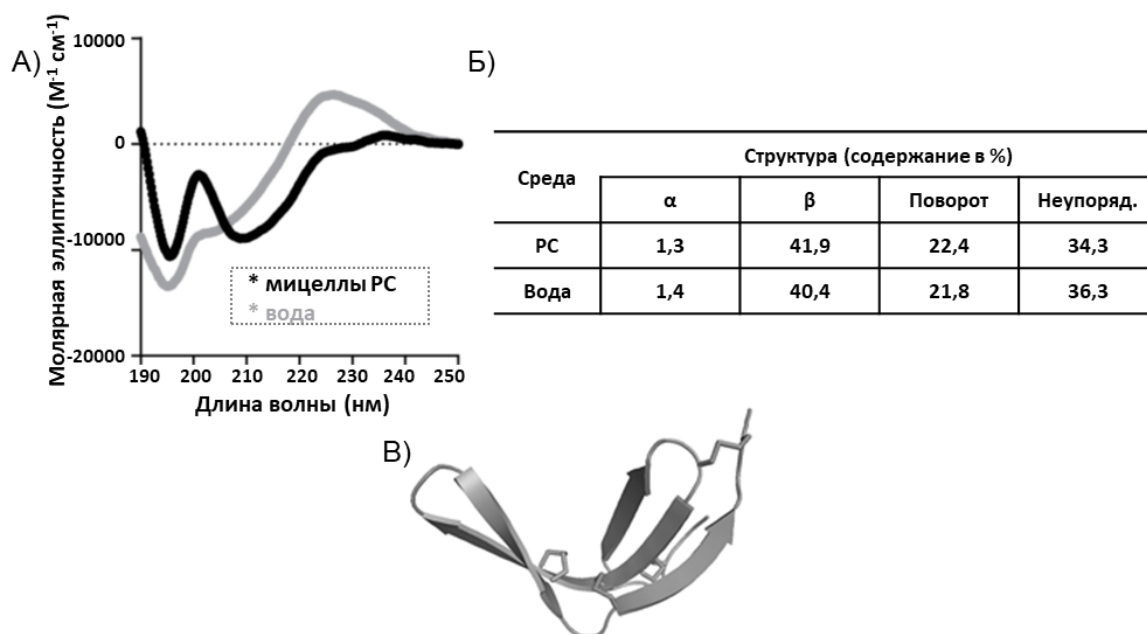


Рисунок 19. Исследование структуры AmBRI-44a. А) КД-спектры пептида в воде и мицеллах PC. Б) Анализ данных с использованием программы CONTINLL. В) Моделирование пространственной структуры пептида с использованием алгоритма AlphaFold3 (программа ColabFold), визуализация модели получена в программе PyMol.

Исследование антимикробной активности пептида выявило его специфическое действие в отношении грамположительных бактерий родов *Bacillus* и *Mycobacterium*. Эффективность AmBRI-44a значительно возрастает в среде без NaCl (в отношении *B. subtilis* B-886 в 8 раз, *B. licheniformis* B-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 (**Таблица 8**). Кроме

того, пептид проявляет активность в отношении 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 [312].

Таблица 8. Антимикробная активность пептида AmBRI-44a в отношении чувствительных к нему тест-штаммов.

Тест-штаммы		МИК, мкМ
Г(+) бактерии	Среда МН	Среда МН + 0,9% NaCl
<i>B. subtilis</i> B-886	0,25	2
<i>B. licheniformis</i> B-511	0,25	1
<i>B. mycoides</i> B-814	8	8
<i>M. phlei</i> Ac-1291	0,5	4
<i>M. luteus</i> B-1314	4	>32
Дрожжи	Среда RPMI	
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	16	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	

Исследование потенциальных токсических свойств AmBRI-44a показало сравнительно высокую гемолитическую активность, сопровождающуюся агглютинацией эритроцитов, но только при концентрации выше 64 мкМ (**Рисунок 14**). При этом AmBRI-44a, активность которого не снижается в присутствии сыворотки, не оказывал цитотоксического действия на клетки HEK293T 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.

3.4. Изучение механизма действия обнаруженных АМП

Основной мишенью большинства природных катионных АМП, как упоминалось ранее, является бактериальная мембрана. При этом многие пептиды проявляют гемолитическую и/или цитотоксическую активность в отношении клеток млекопитающих, что приводит к необходимости поиска и разработки более селективных соединений для минимизации побочных эффектов на клетки пациента. Для изучения механизма действия обнаруженных АМП на первом этапе была определена их способность нарушать целостность цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p. Данный штамм характеризуется конститутивной экспрессией β -галактозидазы в цитоплазматическом пространстве и отсутствием пермеазы лактозы, что позволяет использовать хромогенный субстрат β -галактозидазы – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG) для оценки нарушения целостности мембраны. В случае повышения ее проницаемости, ONPG гидролизует ферментом с образованием о-нитрофенола, количество которого можно измерить спектрофотометрически при длине волны 405 нм [313]. Как показано на **Рисунке 20**, обнаруженные нами α -спиральные АМП демонстрируют быстрое мембранолитическое действие, приводя к полной пермеабилзации клеточных мембран менее чем за 70 минут при концентрациях 4 $\times$ МИК. Однако их высокая токсичность в отношении эукариотических клеток свидетельствует об отсутствии избирательности действия, что существенно ограничивает их возможное системное применение.

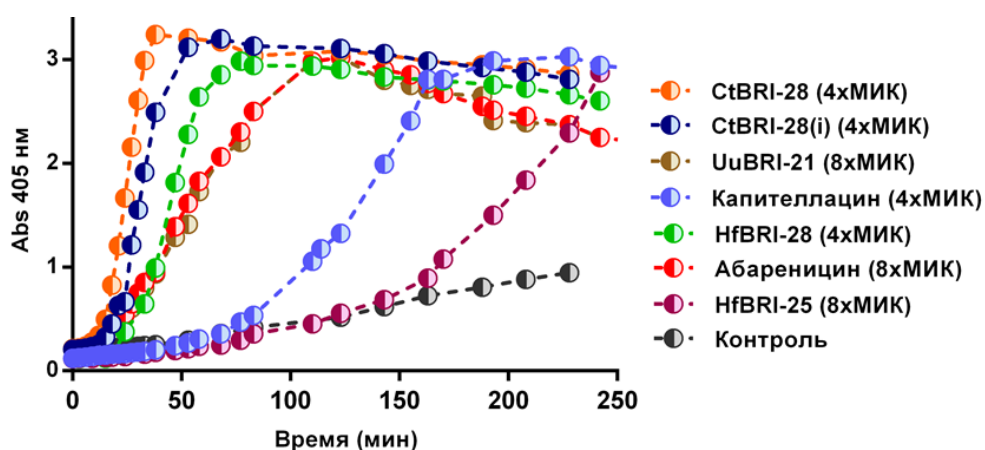


Рисунок 20. Изучение механизма действия обнаруженных АМП. Кинетика изменения проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p под действием пептидов (ONPG-тест).

Представители семейства β -спилечных АМП также являются мембрано-активными соединениями, однако капителлацин и HfBRI-25 демонстрируют более медленную 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 контрольный АМП тахиплезин-1 вызывает ее резкое повышение (до ~ 180 нСм), что сопровождается дестабилизацией мембраны (**Рисунок 21**). 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».

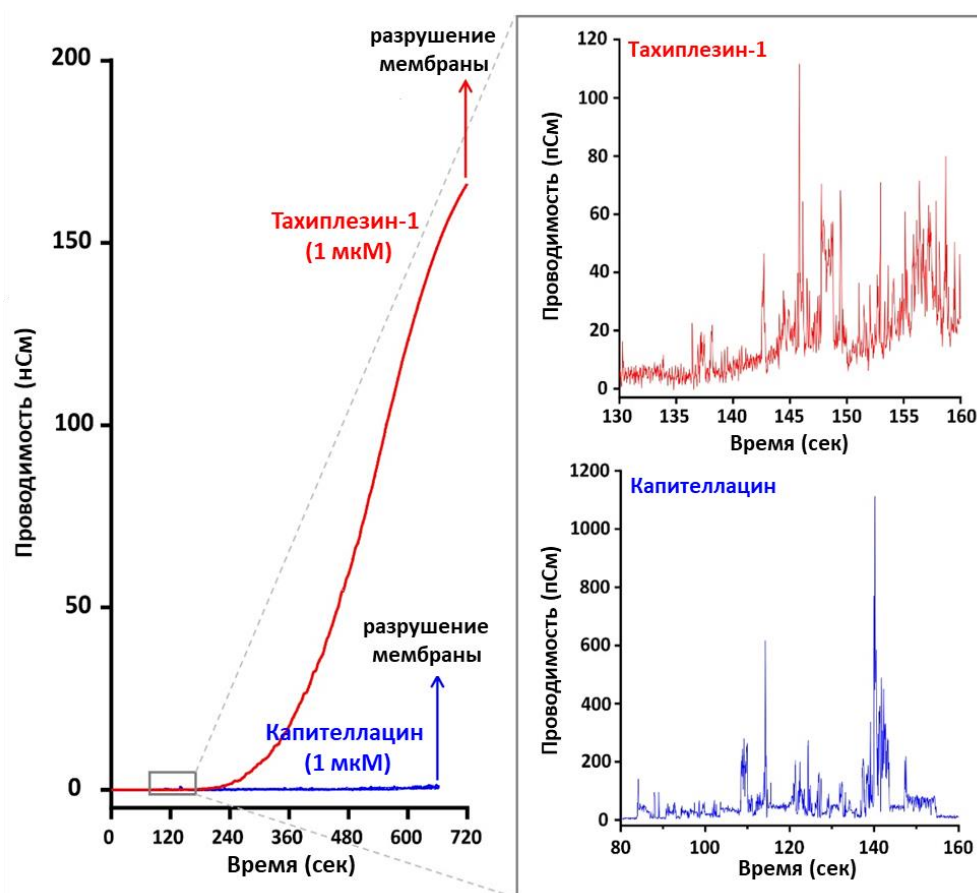


Рисунок 21. Изменения проводимости БЛМ [РЕ, РG, СL в соотношении 67:23,2:9,8 вес. %], вызванные добавлением тахиплезина-1 и капителлацина. Увеличенные записи одиночных колебаний проводимости, индуцированных пептидами, представлены на правой панели.

Отбор резистентных штаммов бактерий позволяет выявить ключевые мишени антибактериальных препаратов и изучить их механизмы действия. В настоящее время описано несколько подходов к отбору бактерий с повышенной устойчивостью к антибиотикам. Один из таких методов основан на последовательных пассажах суспензии тест-штамма в жидкой среде, содержащей антибактериальный агент в концентрациях, близких к значению МИК. По мере накопления устойчивых популяций бактерий концентрация препарата, необходимая для ингибирования их роста, постепенно возрастает. Культуру, выросшую при максимальной концентрации антибактериального агента, используют на заключительном этапе эксперимента для определения итогового значения МИК [85]. Индукцию резистентности к капителлацину и HfBRI-25 исследовали на штамме *E. coli* MDR CI 1057, обладающем высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам ввиду наличия мутаций в гене *gyrA* (S83L и D87N), что приводит к увеличению вероятности появления спонтанных мутаций и, соответственно, отбору устойчивых клонов в присутствии АМП [314]. После 22 дней культивирования значения МИК обоих пептидов увеличились в 2 раза (**Рисунок 22**).

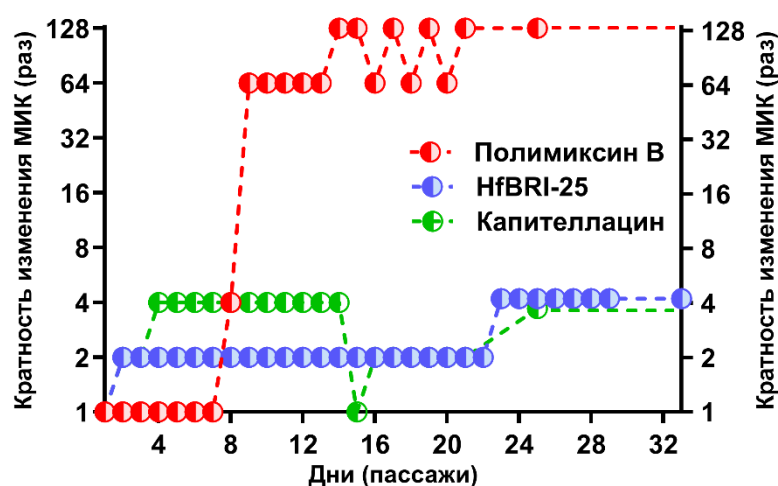


Рисунок 22. Индукция резистентности бактерий *E. coli* MDR CI 1057 к АМП HfBRI-25 и капителлацину, а также антибиотику – полимиксину В. Исходные значения МИК препаратов в среде МН с добавлением 0,9% NaCl: HfBRI-25 – 1 мкМ, капителлацин – 0,5 мкМ, полимиксин В – 0,125 мкМ.

Последующие пассажи сопровождались четырехкратным повышением МИК, однако после хранения отобранных штаммов и повторного тестирования значения МИК пептидов превышали исходный уровень только в 2 раза. Полученные данные

согласуются с представлением о низкой вероятности развития резистентности к АМП, действующим на мембрану, поскольку для этого требуются существенные изменения в структуре и электрофизиологических свойствах клеточной мембраны. В то же время нельзя исключить взаимодействие HfBRI-25 и капителлацина с какими-либо мишенями, расположенными как на бактериальных мембранах, так и внутри клетки. Однако низкая способность этих пептидов 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.

Важно отметить, что в рамках исследования структуры капителлацина в сотрудничестве с Лабораторией структурной биологии ионных каналов было показано, что в присутствии мицелл додецилфосфохолина капителлацин существует в форме мономерной β -шпильки, находящейся в равновесии с димером, образованным антипараллельной ассоциацией N-концевых β -тяжей. При понижении температуры равновесие смещается в сторону димеризации. С учетом температурных условий среды обитания полихеты *Capitella teleta*, можно предполагать, что в соответствующем диапазоне пептид преимущественно находится в димерном состоянии.

Для изучения механизма действия пептида AmBRI-44a, вероятно не связанного с нарушением целостности мембран грамположительных бактерий, был проведен эксперимент по селекции резистентных штаммов чувствительных к нему бактерий *B. licheniformis* B-511 (**Рисунок 23А**). 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 HAMP гистидин-киназы WalK – ключевого белка двухкомпонентной системы WalK/WalR, регулирующей метаболизм клеточной стенки грамположительных бактерий, в частности стафилококков и бацилл [315]. 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-домене 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 23Б). 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.

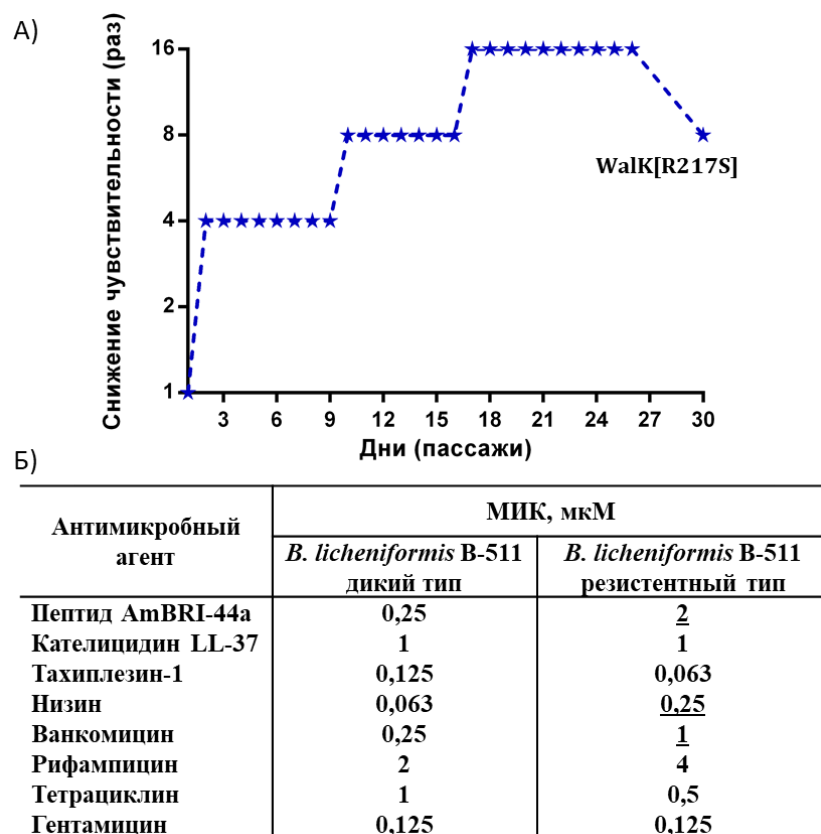


Рисунок 23. Изучение механизма действия пептида AmBRI-44a. А) Индукция резистентности бактерий *B. licheniformis* B-511 к пептиду AmBRI-44a. Б) Анализ перекрестной резистентности отобранного штамма *B. licheniformis* B-511 к конвенциональным антибиотикам и различным АМП.

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-домене, связанная со снижением чувствительности к AmBRI-44a, ванкомицину и низину указывает на предположительный механизм действия пептида, заключающийся в ингибировании биосинтеза клеточной стенки. Тем не менее, требуется ряд дополнительных исследований для подтверждения данного предположения.

3.5. Рациональный дизайн BRICHOS-ассоциированных β -шпилечных АМП

Природные АМП, обладающие высокой селективностью к бактериям и устойчивостью к действию протеаз, встречаются относительно редко. Рациональный дизайн пептидов является полезным инструментом для оптимизации их физико-химических параметров, что позволяет повысить их избирательность и эффективность действия [316]. В ходе скрининга антибактериальной активности обнаруженных АМП для более глубокого исследования были отобраны β -шпилечные пептиды капителлацин и абареницин, обладающие высоким потенциалом в отношении ключевых представителей группы ESKAPEE-патогенов. В поисках терапевтически ценных селективных аналогов абареницина, обладающего выраженной гемолитической активностью в отношении эритроцитов, было проведено сканирование его структуры аланином и аргинином в области β -поворота (**Рисунок 24**). Сканирование аланином традиционно применяется для оценки вклада отдельных аминокислотных остатков в функциональные свойства пептидов и белков, поскольку такая замена, как правило, не нарушает конформацию пептидного остова и позволяет сохранить нативную пространственную структуру [317,318]. Дополнительно было проведено сканирование аргинином для увеличения общего положительного заряда молекул, и как следствие, усиления электростатических взаимодействий с бактериальной мембраной. Ранее было показано, что аминокислотные замены в области β -поворота ареницинов и тахиплезинов на эти аминокислотные остатки часто приводили к повышению селективности за счет снижения цитотоксических свойств молекулы [319,320].

Остатки цистеина не подвергались мутациям для сохранения целостности пептидного остова и вторичной структуры, необходимой для проявления антимикробной активности.

Абареницин	GYCFTACYL ^C LRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap1	GYCFTAC ^A LRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap2	GYCFTAC ^R LRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap3	GYCFTACY ^A LRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap4	GYCFTACY ^R LRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap5	GYCFTACYL ^R NRNG ^A RI ^C YRR ^C CN
Ap6	GYCFTACYL ^R NRNG ^R RI ^C YRR ^C CN
Ap7	GYCFTACYARNGVRA ^C YRR ^C CN
Ap8	GYCFTACYARNGVR ^R CYRR ^C CN
Ap9	GYCFTAC ^A RRNGVRI ^C YRR ^C CN
Ap10	GYCFTACY ^R NRNG ^A RI ^C YRR ^C CN
Ap11	GYCFTAC ^A RRNG ^A RI ^C YRR ^C CN
AA139	GFCWYVCARRNGARV ^C YRR ^C CN

Рисунок 24. Выравнивание аминокислотных последовательностей абареницина, его модифицированных аналогов и известного АМП – АА139. Аминокислотные замены в структуре аналогов абареницина выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием. Жёлтым цветом обозначены остатки цистеина, которые образуют две дисульфидные связи в каждом АМП.

В случае нетоксичного капителлацина стояла обратная задача: повысить его антибактериальную активность при сохранении селективности действия. Более детальный анализ аминокислотной последовательности его белка-предшественника позволил предположить наличие альтернативных сайтов процессинга для зрелого пептида (**Рисунок 25**).

ATG	ACA	ATG	GTG	CTC	ATA	GCA	ACC	GTG	GCA	ACG	GGT	GTC	GTT	TTG	TTT	GTC	CGC	CAC	GTC
M	T	M	V	L	I	A	T	V	A	T	G	V	V	L	F	V	R	H	V
GAC	ACC	ACA	GTC	GAC	ATT	GAC	TCT	CTG	TCA	AGC	AAA	GTC	GAG	CAT	TTC	CGA	GTG	AAC	GGA
D	T	T	V	D	I	D	S	L	S	S	K	V	E	H	F	R	V	N	G
GCT	GAT	GTC	CGG	CAG	CGT	GTT	CAG	TTG	GAC	GTC	GAG	AGG	GAA	GCG	GAG	ATA	GTG	CGT	TAT
A	D	V	R	Q	R	V	Q	L	D	V	E	R	E	A	E	I	V	R	Y
GAC	GAC	ATA	GGC	GCC	ATC	CTT	GTG	CTG	GAC	TAC	CGC	AGG	GGT	CTC	ACT	GCG	CTG	TAT	GCA
D	D	I	G	A	I	L	V	L	D	Y	R	R	G	L	T	A	L	Y	A
AAG	AGT	TCA	GAG	GAG	TGC	TAC	TTA	GTC	GGA	GGC	ATC	GAC	CGT	CAT	CTT	CCC	TCT	CCC	TTC
K	S	S	E	E	C	Y	L	V	G	G	I	D	R	H	L	P	S	P	F
CAT	GGT	CAA	GTC	GAG	AAA	AAC	GAT	TTG	GAG	GAA	GCG	AGT	GAA	GTC	GGG	GCG	GAA	GTG	ACG
H	G	Q	V	E	K	N	D	L	E	E	A	S	E	V	G	A	E	V	T
TAC	CGG	AAG	AGC	ACC	ACA	TAT	CCG	GTG	ATG	GAC	CAT	TCA	GTG	CTA	CCT	CCT	CAC	CTA	ACG
Y	R	K	S	T	T	Y	P	V	M	D	H	S	V	L	P	P	H	L	T
TCA	AAG	TGC	GAA	GAC	AAG	CCT	GTT	TTC	TGG	ATG	GAA	GCG	TTT	CCT	GCT	GAA	GGC	GCT	GAT
S	K	C	E	D	K	P	V	F	W	M	E	A	F	P	A	E	G	A	D
GCT	CGC	CTG	AAG	AGG	TCT	CCT	CGT	GTC	TGC	ATT	AGA	GTC	TGC	CGA	AAT	GGA	GTC	TGT	TAC
A	R	L	K	R	S	P	R	V	C	I	R	V	C	R	N	G	V	C	Y
AGG	AGA	TGC	TGG	GGT															
R	R	C	W	G															

Рисунок 25. Аминокислотная последовательность белка предшественника капителлацина

(● – сигнальный пептид; ● – BRICHOS домен; ● – сайт процессинга фурином; ● – последовательность зрелого пептида). Альтернативные сайты процессинга обозначены стрелкой.

Во-первых, для белка-предшественника альвинеллацина показано, что активация зрелого пептида происходит за счет протеолитического расщепления в двухосновном сайте K↓R. С учетом этого был получен аналог капителлацина с *N*-концевым остатком аргинина, обозначенный как СТ2 (**Рисунок 26**). Во-вторых, *C*-концевой глицин может служить сигналом к дополнительной посттрансляционной модификации ферментом пептидилглицин альфа-амидирующей монооксигеназой (РАМ), которая отщепляет его с последующим амидированием карбоксильной группы предыдущего аминокислотного остатка [321]. В связи с этим мы получили аналог без *C*-концевого остатка глицина (СТ3).

Учитывая структурное сходство капителлацина с высокоактивными β-шпильчатыми тахиплезинами и полифемузинами, мы получили серию укороченных вариантов капителлацина на основе тахиплезина-1. Таким образом, стратегия рационального дизайна была основана на создании структурно близких химерных молекул. Аналог СТ4 представляет собой укороченный вариант капителлацина, состоящий из 17 а.о., в то время как аналоги СТ5, СТ6 и СТ7 содержат одну из функционально важных частей тахиплезина-1: концевую (K1R, V2W, W17R), центральную (I4F) и β-поворотную (R8Y, N9R), соответственно.

Капителлацин	-SPRV <u>C</u> IRVCRNGVCYRRCWG
CT2	<u>R</u> SPRV <u>C</u> IRVCRNGVCYRRCWG
CT3	-SPRV <u>C</u> IRVCRNGVCYRRCW-
CT4	---RV <u>C</u> IRVCRNGVCYRRCW-
CT5	--- <u>KW</u> <u>C</u> IRVCRNGVCYRR <u>CR</u> -
CT6	---RV <u>C</u> <u>F</u> RVCRNGVCYRRCW-
CT7	---RV <u>C</u> IRV <u>C</u> <u>YR</u> GVCYRRCW-
Тахиплезин-1	---KW <u>C</u> <u>F</u> RV <u>C</u> YRGICYRR <u>CR</u> -

Рисунок 26. Выравнивание аминокислотных последовательностей капителлацина, его модифицированных аналогов и известного АМП – тахиплезина-1. Аминокислотные замены в структуре аналогов выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием. Жёлтым цветом обозначены остатки цистеина, которые образуют две дисульфидные связи в каждом АМП.

Гены, кодирующие модифицированные аналоги абареницина и капителлацина, были получены методом ПЦР с перекрывающимися праймерами и клонированы в экспрессионный вектор, как описано ранее в разделе «Получение новых BRICHOS-ассоциированных АМП». Правильность сборки генно-инженерных конструкций была подтверждена методом ПЦР и секвенированием очищенной плазмидной ДНК. Все АМП были получены методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в виде гибридных белков, содержащих вспомогательные структурные элементы для повышения эффективности биосинтеза и дальнейшей очистки целевого продукта. ОФ-ВЭЖХ применяли на финальной стадии очистки рекомбинантных пептидов (**Рисунок 27, 28**).

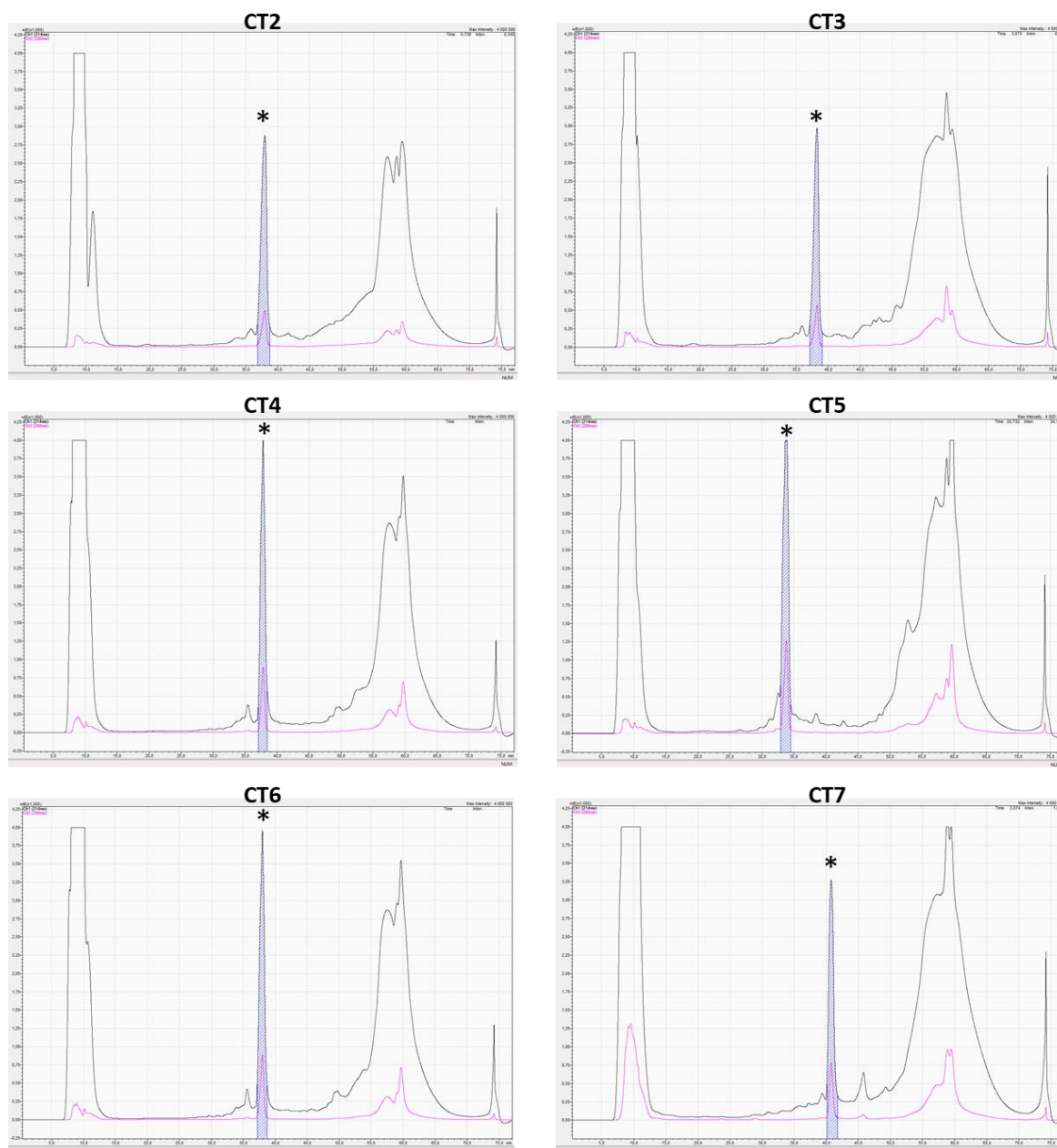


Рисунок 27. Хроматограммы очистки модифицированных аналогов капителлацина методом ОФ-ВЭЖХ. Звездочкой отмечены фракции, содержащие целевые пептиды. Детектирование элюции проводили при двух длинах волн: 214 нм (профиль черного цвета) и 280 нм (профиль розового цвета).

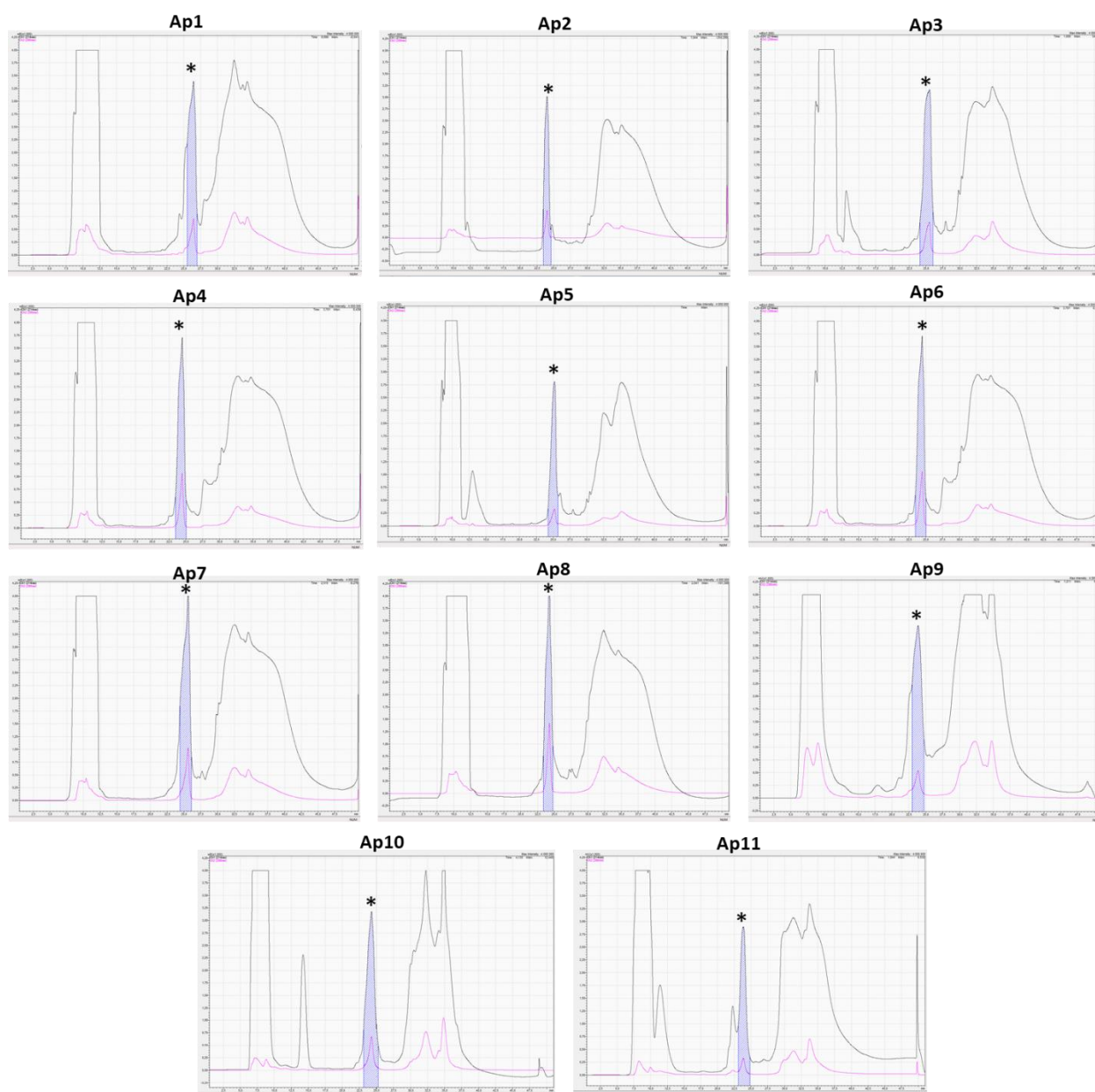


Рисунок 28. Хроматограммы очистки модифицированных аналогов абареницина методом ОФ-ВЭЖХ. Звездочкой отмечены фракции, содержащие целевые пептиды.

Детектирование элюции проводили при двух длинах волн: 214 нм (профиль черного цвета) и 280 нм (профиль розового цвета).

Качественный и количественный анализ полученных АМП был проведен с помощью масс-спектрометрии и спектрофотометрического анализа (Таблица 9).

Таблица 9. Характеристика модифицированных аналогов абареницина и капителлацина.

Название пептида	Выход рекомбинантного пептида, мг/л	Расч. значение молекулярной массы, Да	Эксп. значение m/z (МАЛДИ-МС)	Индекс GRAVY*
Ap1	5.9	2435.13	2434.92	-0,010
Ap2	6.2	2520.20	2520.20	-0,310
Ap3	5.1	2485.11	2484.82	-0,252
Ap4	8.4	2570.18	2570.26	-0,552
Ap5	4.4	2499.13	2498.85	-0,271
Ap6	7.2	2584.19	2584.11	-0,571
Ap7	8.2	2485.11	2485.10	-0,381
Ap8	11.2	2570.18	2570.07	-0,681
Ap9	5.8	2478.15	2478.11	-0,405
Ap10	8.2	2542.15	2542.00	-0,667
Ap11	4.9	2450.12	2450.03	-0,519
CT2	5.5	2535.26	2535.28	-0,419
CT3	5.1	2322.13	2322.31	-0,205
CT4	5.2	2138.05	2138.54	-0,388
CT5	5.1	2167.08	2167.42	-0,565
CT6	6.4	2172.03	2172.32	-0,188
CT7	4.6	2187.07	2187.43	0,041

* Индекс гидрофобности Кайта-Дулитла (GRAVY) был рассчитан на портале ExPASy с помощью инструмента ProtParam

3.6. Изучение свойств модифицированных аналогов BRICHOS-ассоциированных АМП

Антибактериальную активность модифицированных аналогов природных АМП определяли методом двукратных серийных разведений в 96-луночных планшетах в жидкой питательной среде МН в присутствии 0,9% NaCl в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий. Было показано, что все варианты капителлацина проявляли сопоставимую активность *in vitro* в отношении тестируемых патогенов (Рисунок 29).

		Минимальная ингибирующая концентрация (мкМ)							
		0,125-0,5		1-2		4-8		16-32	
		<i>E. coli</i> ML-35p	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> CI 3600	<i>E. coli</i> CI 214	<i>E. Cloacae</i> CI 4172	<i>A. baumannii</i> CI 2675	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603
Кап. СТ2 СТ3 СТ4 СТ5 СТ6 СТ7 Тах-1	Грамотрицательные бактерии								
		Грамположительные бактерии							
		<i>M. luteus</i> B-1314	<i>S. aureus</i> 209p	<i>B. subtilis</i> B-886					

Рисунок 29. Антибактериальная активность капителлацина и его аналогов, а также тахиплезина-1.

Наиболее активным среди полученных вариантов оказался аналог СТ2, среднее геометрическое значение (ГЗ) МИК для штаммов грамотрицательных бактерий составило 0,46 мкМ (**Таблица 10**). Это свидетельствует о функциональной значимости *N*-концевого остатка аргинина и позволяет рассматривать процессинг по сайту $K\downarrow R$, описанный для альвинеллацина, как потенциальный путь созревания капителлацина. Но поскольку природная зрелая форма пептида не охарактеризована экспериментально, данное предположение требует дополнительного подтверждения. Альтернативный вариант процессинга капителлацина (аналог СТ3) существенно не влиял на антибактериальную активность. Для укороченных аналогов в большинстве случаев значения МИК оставались сопоставимыми с полноразмерным пептидом. Умеренное снижение активности наблюдалось для аналога СТ5, что, вероятно, связано с его меньшей гидрофобностью по сравнению с другими вариантами. Примечательно, что только химерный вариант СТ7 проявлял активность, близкую к тахиплеину-1, преимущественно в отношении грамположительных бактерий (СТЗ МИК 2 мкМ против 1,59 мкМ, соответственно), тогда как в отношении грамотрицательных бактерий его активность была ниже (СТЗ МИК 0,55 мкМ против 0,15 мкМ).

Таблица 10. Среднее геометрическое значение (СТЗ) МИК капителлацина и его аналогов, а также тахиплезина-1 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Бактерии	Кап.	СТ2	СТ3	СТ4	СТ5	СТ6	СТ7	Tax-1
Грамположительные (мкМ)	8	3.17	10.08	6.35	12.7	6.35	2	1.59
Грамотрицательные (мкМ)	1	0.46	1.09	0.59	1.09	0.55	0.55	0.15

Известно, что снижение гидрофобности пептидов, довольно часто сопровождается уменьшением гемолитической активности по сравнению с исходной молекулой [322]. Однако предсказать вклад отдельных аминокислотных замен в активность и селективность пептидов довольно затруднительно. На следующем этапе были оценены профиль токсичности полученных аналогов капителлацина и их влияние на целостность бактериальных мембран. Повреждающее действие в отношении эукариотических клеток оценивали как в отношении взвеси эритроцитов человека, так и в отношении клеточной линии человека HaCaT (**Рисунок 30**). Для большинства аналогов максимальный уровень лизиса не превышал 5% даже при концентрации 128 мкМ, за исключением пептида СТ7, для которого этот показатель составил почти 50%. Сопоставимый уровень гемолитической активности наблюдался и для тахиплезина-1. Ранее было показано, что точечные замены (Y8S или I11S) в области β -изгиба тахиплезина-1 приводили к снижению его способности нарушать проницаемость бактериальных мембран и уменьшению цитотоксической активности в отношении эукариотических клеток [319]. С учетом структурного сходства СТ7 с тахиплезином-1 можно предположить, что наличие тирозина в положении 8 является одним из факторов, определяющих выраженную гемолитическую активность СТ7, вероятно за счет повышения сродства к мембранам любого состава. В целом аналоги капителлацина характеризовались умеренной цитотоксичностью в отношении адгезионных клеток HaCaT, жизнеспособность которых составила около 80% при концентрации 64 мкМ.

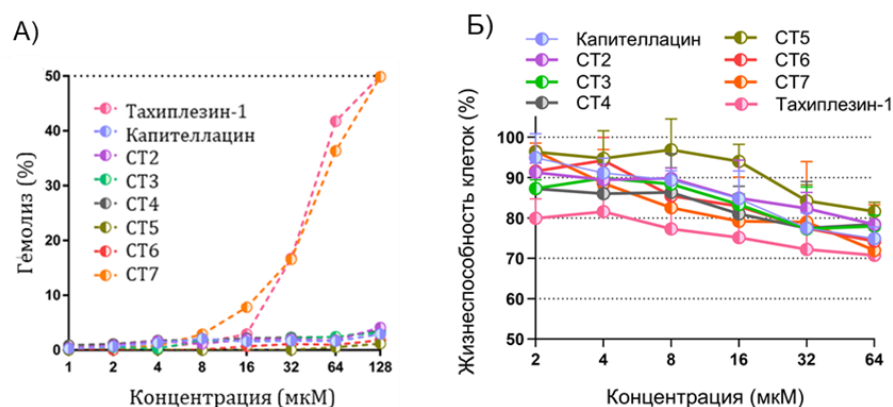


Рисунок 30. Токсичность капителлацина и его аналогов, а также тахиплезина-1 в отношении эритроцитов человека после 1,5-часового воздействия (А) и клеток NaCaT (Б).

Влияние полученных аналогов на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* оценивали при концентрациях, соответствующих индивидуальным значениям МИК. Большинство модифицированных вариантов капителлацина проявляли умеренный мембранолитический эффект подобно капителлацину, в то время как СТ7 и тахиплезин-1 демонстрировали быстрое нарушение целостности цитоплазматической мембраны *E. coli* (**Рисунок 31**). Полученные данные также подтверждают тезис о том, что точечные замены в области β -изгиба (R8Y, N9R) капителлацина могут приводить к существенному изменению его мембранотропных свойств. Таким образом, более гидрофильная структура области β -изгиба капителлацина, вероятно, обуславливает его низкую мембранотропную активность по сравнению с тахиплезином-1.

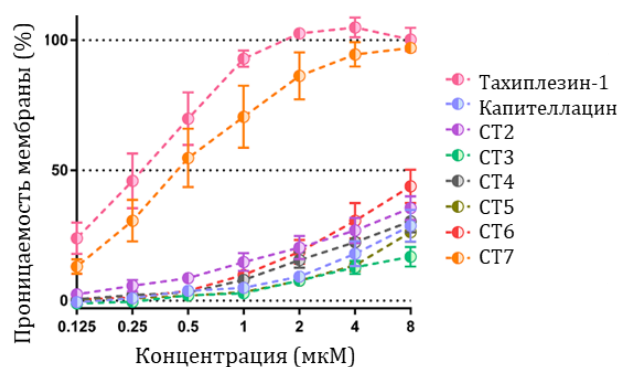


Рисунок 31. Влияние аналогов капителлацина и тахиплезина-1 при концентрациях, соответствующих МИК, на проницаемость цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p.

Оптическую плотность после инкубации с 5 мкМ мелиттина принимали за 100%.

В ходе скрининга антибактериальной активности аналогов абареницина, а также дополнительных пептидов сравнения Uu и AA139 было показано, что их

активность, подобно пептиду дикого типа, направлена преимущественно против грамотрицательных бактерий (**Рисунок 32**).

	Абар.	Ap1	Ap2	Ap3	Ap4	Ap5	Ap6	Ap7	Ap8	Ap9	Ap10	Ap11	AA139	Uu
Действие в отношении бактериальных клеток (МИК, мкМ)														
	0,063-0,5	1-2	4	8	16-32									
Грамотрицательные														
<i>E. coli</i> ML-35p														
<i>E. coli</i> ATCC 25922														
<i>E. coli</i> CI 214														
<i>E. coli</i> MDR CI 1057														
<i>P. aeruginosa</i> PAO1														
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853														
<i>P. mirabilis</i> XDR CI 3423														
<i>A. baumannii</i> XDR CI 2675														
<i>E. cloacae</i> XDR CI 4172														
<i>P. aeruginosa</i> MDR CI 223														
<i>P. aeruginosa</i> MDR CI 1049														
<i>P. aeruginosa</i> MDR CI 236														
<i>P. aeruginosa</i> MDR CI 1995														
<i>K. pneumonia</i> ATCC 700603														
Грамположительные														
<i>S. aureus</i> 209p														
<i>B. licheniformis</i> VKM B511														
<i>B. subtilis</i> B-886														

Рисунок 32. Антибактериальная активность абареницина, его аналогов, а также Uu и AA139.

Аналоги абареницина, несущие замены Y8R (Ap2) или I15R (Ap8), характеризовались существенным снижением активности в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Стоит отметить, что оба остатка (Y8 и I15) сближены в структуре β -шпильки и, по-видимому, образуют ключевой сайт взаимодействия абареницина с потенциальной молекулярной мишенью. Наиболее выраженный антибактериальный эффект среди исследованных пептидов продемонстрировал аналог Ap4: СГЗ МИК в отношении грамотрицательных бактерий составило 0,13 мкМ (**Таблица 11**). В целом

рациональный дизайн в области β -поворота абареницина позволил получить ряд аналогов с повышенной антибактериальной активностью.

Таблица 11. СГЗ МИК абареницина и его аналогов, а также Uu и AA139 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Зеленым цветом выделены наиболее активные аналоги абареницина в отношении грамотрицательных бактерий.

Патоген	Абар.	Ap1	Ap2	Ap3	Ap4	Ap5	Ap6	Ap7	Ap8	Ap9	Ap10	Ap11	AA139	Uu
Грам-(-)														
(мкМ)	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	0,74
Грам-(+)														
(мкМ)	2,52	10,08	12,7	1	0,63	5,04	6,35	8	16	3,17	2,52	4	4	2

Влияние точечных модификаций на мембранотропные свойства аналогов по сравнению с исходным пептидом оценивали по кинетике повреждения цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p (**Рисунок 33**). Все варианты абареницина демонстрировали выраженный мембранолитический эффект, о чем свидетельствовало повышение абсорбции раствора ввиду накопления окрашенного продукта гидролиза ONPG. Для аналогов Ap2 и Ap8 также наблюдалось нарушение целостности мембраны, однако пептиды демонстрировали более медленную кинетику проницаемости, что, вероятно, согласуется с их более низкой антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных бактерий.

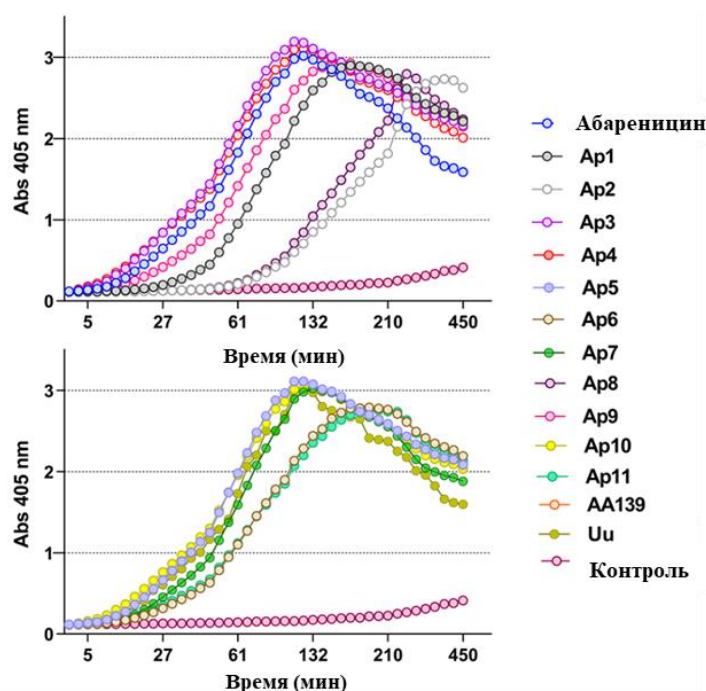


Рисунок 33. Фотометрическая оценка повышения проницаемости цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35r при действии абареницинов, Uu и AA139 в концентрации 4 мкМ с использованием хромогенного маркера ONPG.

На следующем этапе скрининга оценивали потенциальные нежелательные эффекты аналогов в отношении клеток млекопитающих, в частности, в отношении эритроцитов человека и клеточной линии НЕК293Т (**Рисунок 34**). Наиболее активные аналоги Ap3 и Ap4, несмотря на сравнительно меньшую гидрофобность по сравнению с природным пептидом, проявляли повышенную гемолитическую активность. Остальные аналоги абареницина, за исключением Ap10, не демонстрировали выраженной гемолитической активности и вызывали лизис не более 10% эритроцитов при концентрации 128 мкМ. При оценке цитотоксичности аналогов было показано, что только вариант Ap4 снижал жизнеспособность клеток НЕК293Т на 60%.

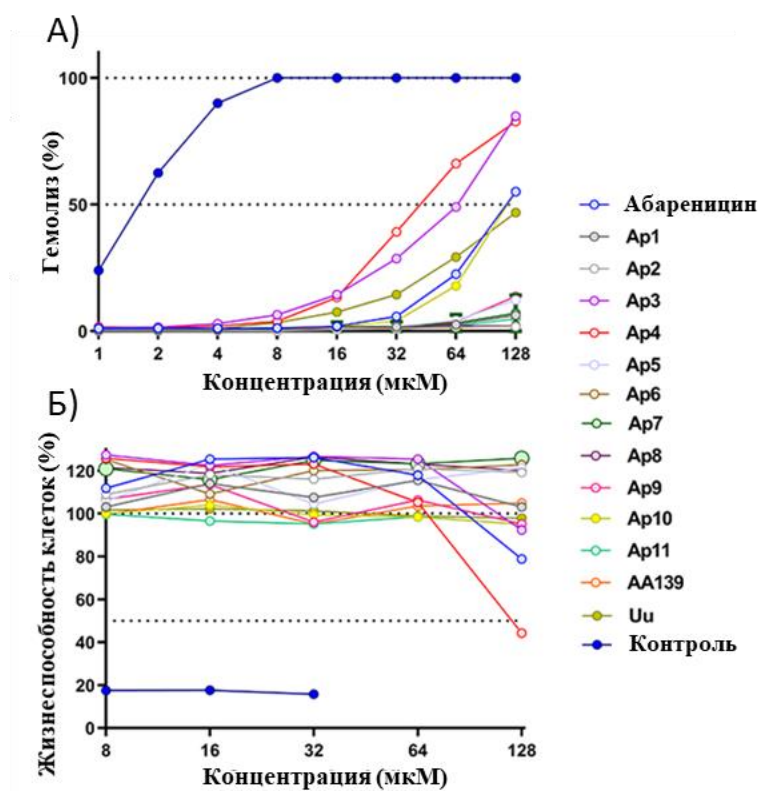


Рисунок 34. Токсичность АМП в отношении клеток млекопитающих. А) Гемолитическое действие на эритроциты человека после 2-часовой инкубации с пептидами. Б) Цитотоксичность по отношению к трансформированным клеткам эмбриональной почки человека (HEK293T) после 20-часовой инкубации с пептидами.

С учетом высокой антибактериальной активности Ar4 и одновременно выраженной токсичности, было решено провести модификацию его структуры с целью снижения общей гидрофобности молекулы. Дополнительные замены в его последовательности (Y8A – аналог Ar9 и V13A – аналог Ar10) приводили к снижению антибактериальной активности, однако были более эффективными в отношении грамотрицательных бактерий, чем абареницин дикого типа (СГЗ МИК Ar9 – 0,26 мкМ, Ar10 – 0,31 мкМ против СГЗ МИК абареницина – 0,45 мкМ). Аналог Ar11, содержащий две дополнительные замены (Y8A, V13A) продемонстрировал снижение антибактериальной активности по сравнению с Ar4 приблизительно в 5 раз. Таким образом, использованный нами подход позволил аналоги с антибактериальной активностью, превышающей или сопоставимой с активностью абареницина, однако лишенных цитотоксических свойств. Кроме того, аналог Ar9 превосходил по активности референсный пептид AA139 в отношении

грамотрицательных бактерий, СГЗ МИК составило 0,26 мкМ против 0,48 мкМ, соответственно.

Стоит отметить, что ни один из исследуемых пептидов не проявил активность в отношении бактерий рода *Serratia marcescens* CI 1689 (клинический изолят с множественной лекарственной устойчивостью) при концентрациях до 32 мкМ. Согласно литературным данным, *S. marcescens* несет гены устойчивости к различным классам антибиотиков, таким как β -лактамы, аминогликозиды, хинолоны и полипептидным антибиотикам, и характеризуется природной низкой чувствительностью к катионным АМП, что связывают с особенностями внешней мембраны, ограничивающей взаимодействие с ними, а также с наличием специфических протеаз [323].

В результате проведенного рационального дизайна новых β -шпигелочных BRICHOS-ассоциированных АМП были получены варианты, активные в отношении ключевых грамотрицательных патогенов ESKAPEE-группы: аналог капителицина СТ2 с повышенной активностью и сохраняющий селективность природного пептида, а также два селективных аналога абареницина Ар9 и Ар11. Однако пептид СТ2 уступал по уровню активности целому ряду модифицированных аналогов абареницина, для которых значения МИК в отношении всех тест-штаммов бактерий не превышали 1 мкМ. Таким образом, для дальнейших исследований, включая *in vivo* испытания, нами были отобраны аналоги абареницина Ар9 и Ар11.

3.6.1. Исследование протеолитической стабильности АМП

Во многих случаях природные АМП характеризуются ограниченной стабильностью вследствие протеолитической дегградации в сыворотке или плазме крови, что является одним из факторов, препятствующих их системному применению. Это обусловлено тем, что в кровотоке человека присутствует широкий спектр протеолитических ферментов, участвующих в регуляции иммунного ответа и гемостаза, а также формирующих среду, определяющую метаболизм и время жизни циркулирующих белков и пептидов [324]. Одним из подходов к оценке скорости распада в условиях, имитирующих системный кровоток, а также определению основных продуктов протеолиза и предполагаемых участков

расщепления соединения является его инкубация с сывороткой или плазмой крови в течение 24 ч. В качестве объектов исследования были выбраны абареницин, а также HfBRI-25 с уникальной β -шпильчатой структурой, отличающей его от других пептидов из обнаруженного семейства. По истечении заданных временных интервалов образцы анализировали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ и последующей МАЛДИ масс-спектрометрии: для абареницина через 0, 2, 8, 24 ч, для HfBRI-25 через 0, 1, 3, 24 ч (**Рисунок 35**). В качестве контрольного соединения использовали α -спиральный АМП буфорин 2, время полураспада которого в аналогичных условиях составило менее 5 мин (**Рисунок 36**).

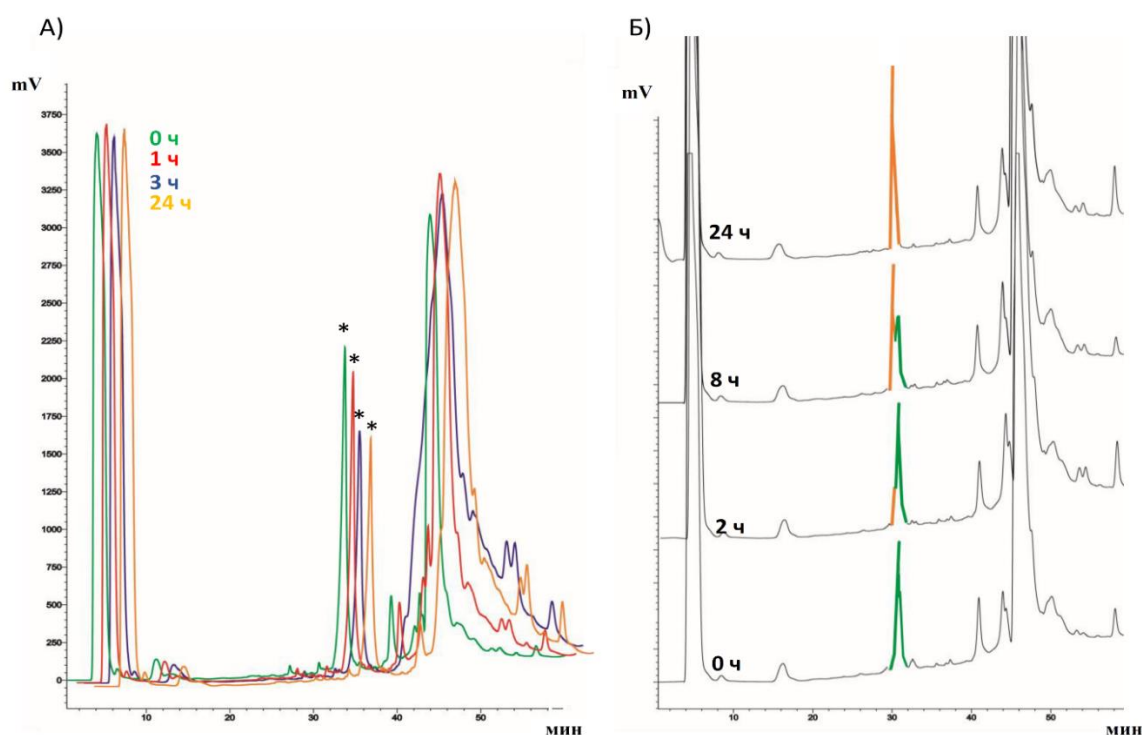


Рисунок 35. Стабильность АМП в сыворотке крови в течение 24 ч. А) Профили разделения фракций, содержащих HfBRI-25. Основные фракции, собранные по истечении каждого временного интервала, обозначены звездочкой. Б) Профили фракций, содержащих абареницин. Немодифицированный пептид выделен зелёным цветом. С течением времени наблюдается появление продукта деградации абареницина, обозначенного оранжевым цветом.

В ходе эксперимента установлено, что уже через 1 ч инкубации более половины интактного HfBRI-25 расщепляется в сыворотке крови с образованием укороченного варианта. Основным продуктом протеолитической деградации

является пептид без *N*-концевого дипептида S-P. Данный продукт дополнительно очищали методом ОФ-ВЭЖХ, после чего определяли его активность в отношении *E. coli*. Показано, что укороченный пептид обладает повышенной антибактериальной активностью в отношении штаммов *E. coli* ML-35p и ATCC 25922 (МИК укороченного пептида HfBRI-25[3-25] – 0,5 мкМ, МИК интактного пептида HfBRI-25 – 1 мкМ). Таким образом, используемый подход позволяет одновременно оценить как возможные пути деградации пептида, так и выявить его более активные формы. При этом более 80% обеих активных форм сохраняли 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. Дегградация 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.

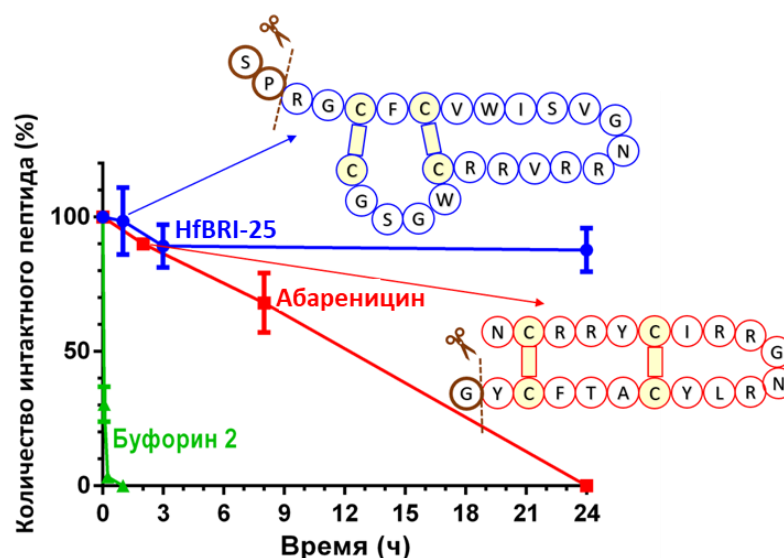


Рисунок 36. Стабильность АМП в сыворотке крови в течение 24 ч. Процентное содержание интактных пептидов в сыворотке крови. В случае с HfBRI-25 под интактным пептидом подразумевается неразделяемая на ОФ-ВЭЖХ смесь двух активных форм. Оценка количества интактных пептидов была произведена по площади соответствующих пиков на хроматограммах, полученных при разделении продуктов протеолиза с методом ОФ-ВЭЖХ и их детекции при 214 нм.

Наблюдаемый профиль протеолиза согласуется с тем, что деградация соединений пептидной природы в сыворотке крови нередко начинается с *N*-конца в результате работы аминопептидаз, приводящих к удалению одного или двух аминокислотных остатков. Вместе с тем в литературе широко встречается и *C*-концевое отщепление под действием карбоксипептидаз [325]. В наших условиях расщепление происходило с *N*-конца через 1 ч (для HfBRI-25) и 2 ч (для абареницина), что сопоставимо с временным интервалом для проявления антибактериального эффекта в модельных экспериментах большинства АМП, действующих на мембрану патогена [326,327]. Таким образом, протеолиз HfBRI-25 и абареницина в сыворотке крови происходит за пределами дисульфидной связи, что может свидетельствовать о ключевом значении цистеинов в поддержании жесткости β -спиральной структуры и её устойчивости к действию сывороточных протеаз.

3.6.2. Антибиопленочная активность АМП

Большинство исследований антибактериального потенциала АМП проводится на планктонных культурах, тогда как в клинических условиях значимая часть хронических и рецидивирующих инфекций связана с формированием биопленочных сообществ. АМП рассматриваются как перспективные агенты, поскольку способны вмешиваться в различные стадии биопленкообразования и воздействовать на несколько молекулярных мишеней [328].

P. aeruginosa является клинически значимым патогеном, вызывающим пневмонию, инфекции мочевыводящих путей и системные инфекции у пациентов с иммунодефицитами и при ожоговой травме, а также часто ассоциированным с хроническими инфекциями дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом [329]. Штамм *P. aeruginosa* PAO1 и образуемые им биоплёночные структуры широко используется как референсная модель для *in vitro* оценки антибиопленочной активности различных соединений. В рамках данной задачи были исследованы аналоги абареницина: Ap4 как наиболее активный вариант, но обладающий высокой токсичностью, а также более селективные аналоги Ap9 и Ap11. В качестве контролей использовали полимиксин В и ципрофлоксацин, а также хорошо изученный АМП человека кателицидин LL-37. Согласно данным, представленным на **Рисунке 37**, все

исследованные соединения при концентрации, соответствующей МИК, полностью подавляли формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1. Следует отметить, что хотя Ар4 характеризовался более высокой активностью в отношении планктонных культур, в модели ингибирования формирования биопленки его эффективность была ниже, чем у селективных аналогов абареницина. При этом Ар9 демонстрировал наиболее выраженное подавление при субингибирующих концентрациях среди всех исследованных соединений. В связи с этим последующие эксперименты были сосредоточены преимущественно на Ар9 и Ар11.

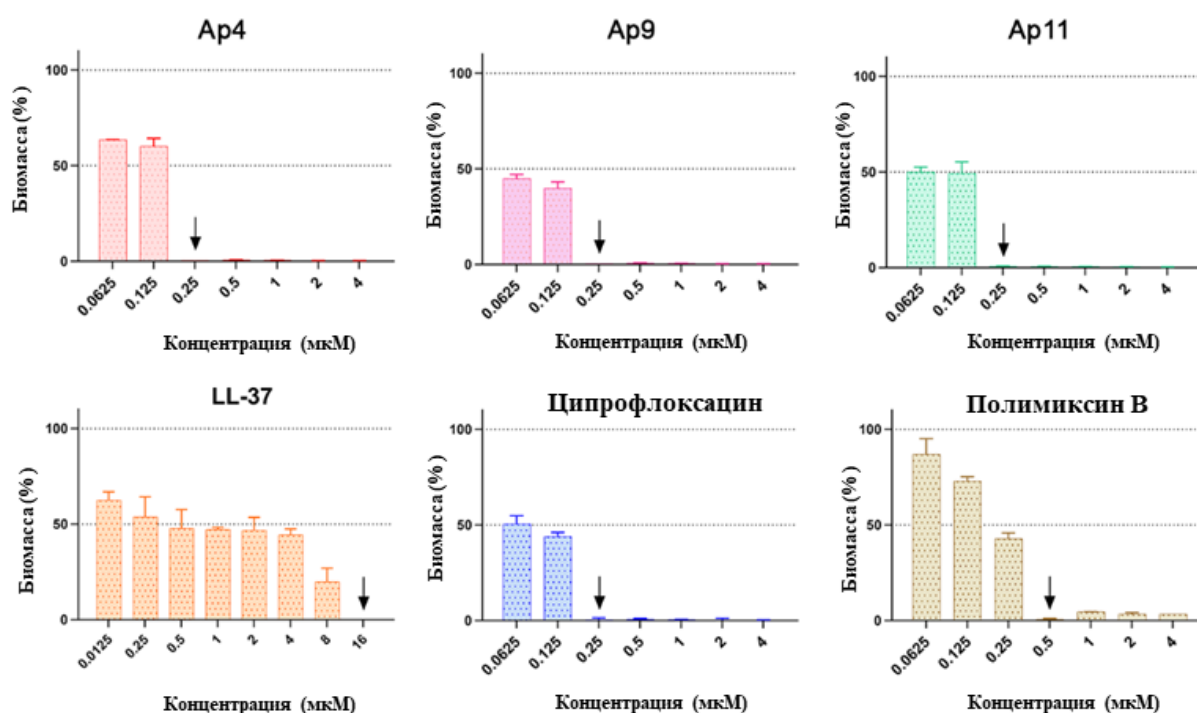


Рисунок 37. Влияние абареницинов (Ар4, Ар9, Ар11), LL-37, ципрофлоксацина и полимиксина В на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1. Биомассу биопленки оценивали методом окрашивания 0,1% кристаллическим фиолетовым. Стрелкой отмечена концентрация, соответствующая МИК пептидов.

Кроме того, показано, что аналоги абареницина способны ингибировать процесс образования биопленок у ряда клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из мочи пациентов с урологическими заболеваниями (**Рисунок 38**). Как и ожидалось, ципрофлоксацин не проявлял активности в отношении этих изолятов, обладающих устойчивостью к фторхинолонам, при концентрациях до 32 мкМ. Более того, при некоторых концентрациях антибиотика наблюдалось сильное увеличение биомассы биопленок (данные не приведены). Следует отметить, что стимуляция биопленкообразования у штаммов *P. aeruginosa* CI223 и CI1995 наблюдалась также

при действии аналогов абареницина и полимиксина В в субингибирующих концентрациях. Подобные эффекты в отношении биопленок *P. aeruginosa* ранее были описаны для некоторых антибиотиков, включая аминогликозиды и тетрациклины [330]. Полученные результаты подчеркивают необходимость подбора оптимального диапазона концентраций, чтобы минимизировать риск неконтролируемого увеличения биомассы биопленок в ходе терапии.

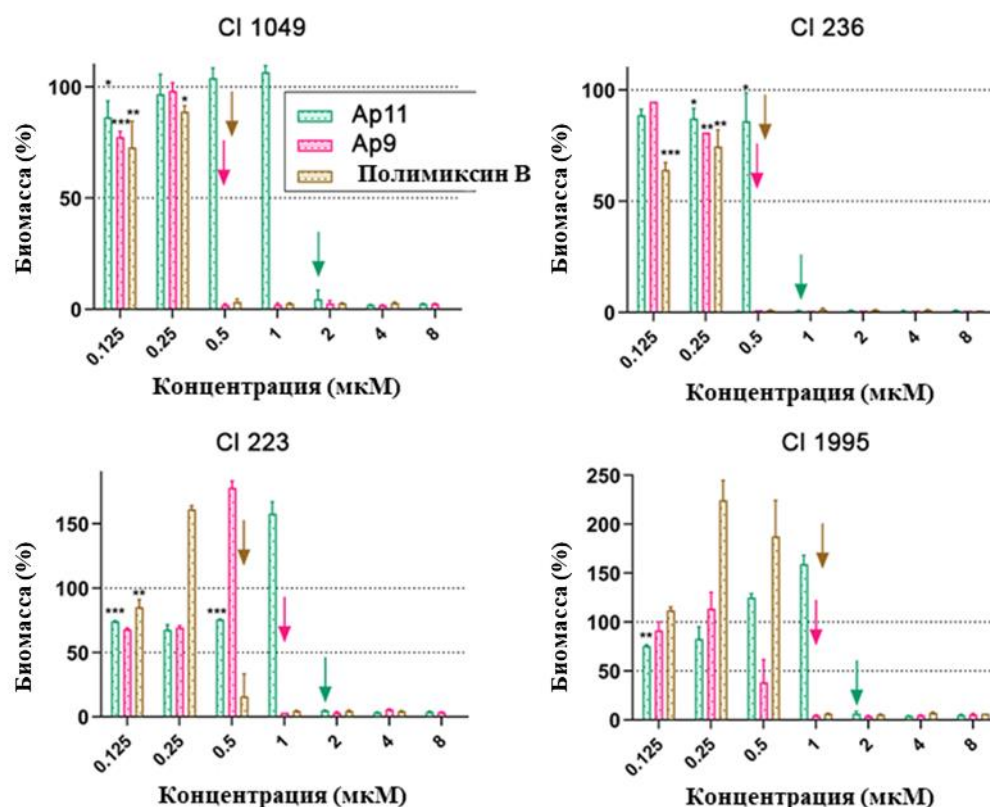


Рисунок 38. Влияние Ap9, Ap11 и полимиксина В на формирование биопленки клинических изолятов *P. aeruginosa*. Стрелкой отмечена концентрация, соответствующая МИК, звездочками отмечены статистически значимые различия между обработанными и необработанными биопленками.

Разрушение предварительно сформированных биопленок представляет собой более сложную задачу по сравнению с ингибированием их формирования. Это связано, в частности, с наличием субпопуляций метаболически малоактивных и персистирующих клеток, способных выживать при действии высоких концентраций антибактериальных соединений. На следующем этапе работы мы оценили способность пептидов воздействовать на зрелые биопленки *P. aeruginosa* PAO1 (Рисунок 39). Предварительно сформированные биопленки инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрациях, превышающих МИК в несколько

раз, в течение времени, выбранного с учетом *in vitro* стабильности абареницина в сыворотке крови. По данным оценки биомассы биопленки после 2-часовой инкубации для всех препаратов не выявлено дозозависимого эффекта снижения биомассы.

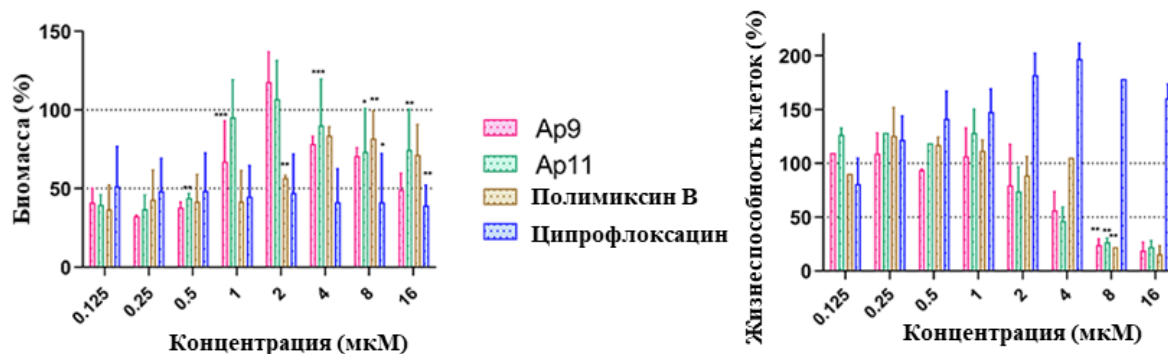


Рисунок 39. Влияние Ap9, Ap11, полимиксина В и ципрофлоксацина на зрелые биопленки *P. aeruginosa* PAO1. Биомассу биопленки оценивали методом окрашивания кристаллическим фиолетовым (левая панель). Метаболическую активность клеток в составе биопленки измеряли по восстановлению тетразолиевой соли (МТТ-тест, правая панель).

Следует отметить, что окрашивание биопленок кристаллическим фиолетовым отражает лишь изменение суммарной биомассы (клетки и внеклеточный полимерный матрикс) и не позволяет оценить жизнеспособность бактерий в их составе. В связи с этим был проведен МТТ-тест для определения метаболической активности клеток в биопленочной популяции. Аналоги абареницина и полимиксин В вызывали 80% снижение числа жизнеспособных бактерий при концентрации 16 мкМ, тогда как ципрофлоксацин в этих условиях, напротив, стимулировал метаболическую активность клеток. Таким образом, аналоги абареницина проявляют комплексное действие в отношении как формирующихся, так и зрелых биопленок *P. aeruginosa* и могут представлять практический интерес для лечения инфекций, ассоциированных с биопленочной формой синегнойной палочки.

3.7. Исследование BRICHOS-ассоциированных АМП на животных моделях

По результатам первичного *in vitro* скрининга, представленного в предыдущих разделах, для дальнейших исследований *in vivo* мы выбрали модифицированные аналоги абареницина, проявляющие высокую активность в

отношении грамотрицательных бактерий. В качестве пептида сравнения в панель тестируемых соединений включили UuBRI-21, как и абареницин относящийся к гомологам ареницина-3, что позволило оценить возможное влияние сывороточного связывания на эффективность пептидов данной структурной группы. Кроме того, было решено исследовать немодифицированный пептид HfBRI-25 как природный представитель обнаруженного класса β -шпильчатых АМП для оценки воспроизводимости его антибактериальной эффективности при переходе от стадии *in vitro* к *in vivo*.

На первом этапе оценивали активность Ap9, Ap11 и UuBRI-21 на мышинной модели летальной септицемии, вызванной вирулентным штаммом *E. coli* 3421 E/19, в сравнении с полимиксином В и референсным АМП АА139. Согласно полученным данным Ap11 и UuBRI-21 не проявляли лечебного эффекта, тогда как Ap9 обеспечивал 10^5 -кратное снижение обсеменённости крови и промывных вод брюшной полости, что было сопоставимо с действием полимиксина В и АА139 (**Рисунок 40**). Примечательно, что Ap11, несмотря на схожие структурные модификации и сопоставимую *in vitro* активность с АА139 и Ap9, оказался неэффективным на данной модели, что подчеркивает важность скрининга перспективных пептидных соединений на небольших группах животных перед проведением расширенных доклинических испытаний. Отсутствие активности у UuBRI-21 представлялось ожидаемым, и, может быть связано с его высокой склонностью связываться с компонентами сыворотки, что могло привести к снижению его эффективной концентрации в кровотоке.

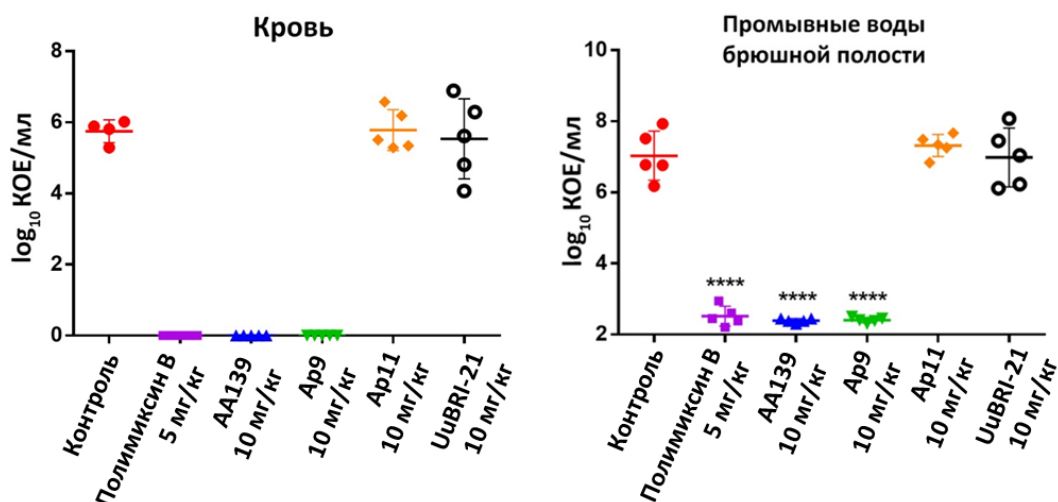


Рисунок 40. Эффективность противоиногоинфекционного действия АМР на мышцах (совместное исследование проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ). Среднее количество вирулентного штамма бактерии *E. coli* 3421 E/19 в крови и промывных водах брюшной полости мышей линии BALB/c (n=5 в каждой группе) в КОЕ/мл через 6 ч после заражения и 5 ч после однократного внутривенного введения АМР и полимиксина В.

После подтверждения высокой эффективности Ар9 при использовании 10 мг/кг препарата следующим шагом стало определение его оптимальной разовой терапевтической дозы на той же модели инфекции, вызванной *E. coli* 3421E/19. Показано, что минимальная эффективная доза Ар9 составила 1 мг/кг, что потенциально расширяет терапевтическое окно данного препарата (**Рисунок 41**).

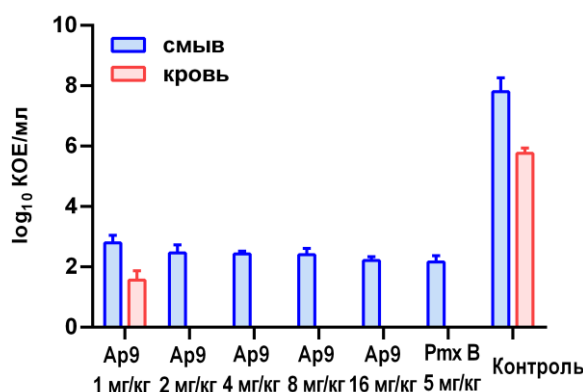


Рисунок 41. Оценка оптимальной разовой терапевтической дозы Ар9 при лечении мышей линии BALB/c (n=5) при острой перитонеальной инфекции, вызванной вирулентным штаммом *E. coli* 3421 E/19. Исследование проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ.

Эффективность пептида HfBRI-25 оценивали на модели септицемии у мышей, вызванной заражением штаммом *E. coli* ATCC 25922 в сравнении с ципрофлоксацином и AA139 (**Рисунок 42А**). Введение данного пептида

обеспечивало 100% выживаемость инфицированных животных, тогда как при применении AA139 выживаемость составила 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 -шпилечных АМП для терапии инфекций, вызванных грамотрицательными патогенами на примере *E. coli*.

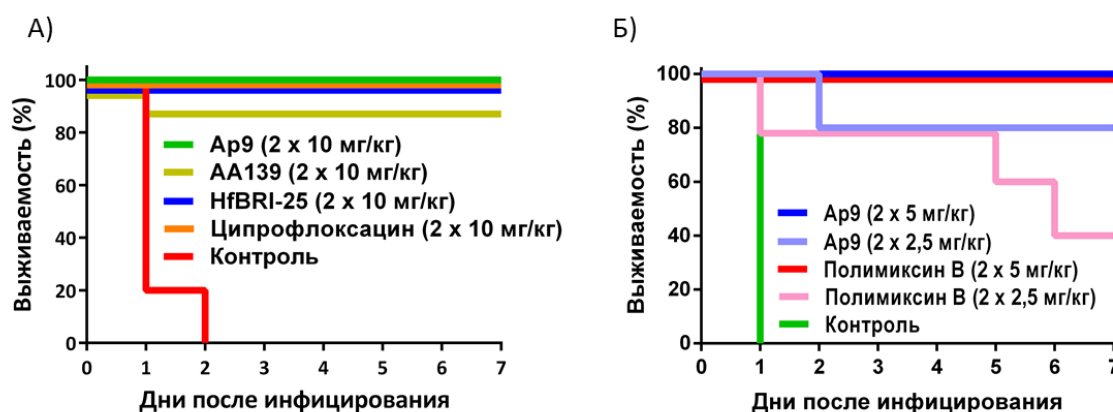


Рисунок 42. Эффективность противoinфекционного действия АМП на мышах. (А) Выживаемость мышей линии BALB/c (n=8) при лечении летальной инфекции, вызываемой *E. coli* ATCC 25922, при внутривенном введении АМП и ципрофлоксацина. Б) Терапевтическое действие Ap9 и полимиксина В при лечении инфекции у мышей линии BALB/c (n=5), вызываемой летальной дозой уropатогенного полимиксин-устойчивого штамма *E. coli* U10 (*mcr-1*-опосредованная устойчивость). Исследование проведено на базе ФБУН ГНЦ ПМБ.

С учетом растущей распространенности уropатогенных штаммов *E. coli*, в том числе несущих ген *mcr-1* [6], была исследована терапевтическая эффективность Ap9 при лечении мышей, инфицированных уropатогенным штаммом *E. coli* с *mcr-1*-опосредованной устойчивостью к полимиксинам (U10) в течение 7 суток. Двукратное введение Ap9 обеспечивало 100% выживаемость при дозах 10 и 5 мг/кг, тогда как при дозе 2,5 мг/кг защищало от гибели 80% животных (**Рисунок 42Б**). Как и ожидалось, полимиксин В оказывал менее выраженный лечебный эффект на данной модели: при 2,5 мг/кг выжили только 40% мышей. Таким образом, эксперимент по лечению летальной эшерихиозной инфекции у мышей, вызываемой уropатогенным штаммом *E. coli* со сниженной чувствительностью к полимиксинам, показал, что Ap9 обладает высокой лечебной эффективностью, превышающей таковую для полимиксина В.

Учитывая высокую *in vitro* активность Ар9 в отношении различных микроорганизмов группы ESKAPEE было принято решение оценить его эффективность в отношении бактерий *P. aeruginosa* PAO1. Было показано, что в условиях *in vitro* Ар9 более эффективно действует как на планктонную культуру этого штамма, так и на его зрелые биопленки по сравнению с полимиксином В. Активность Ар9 *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 Ар9 – 16 мг/кг (**Рисунок 43А**). Далее была проведена оценка выживаемости мышей на аналогичной модели синегнойной инфекции при лечении пептидом Ар9. Полученные результаты демонстрируют, что трёхкратное введение пептида по 15 мг/кг обеспечивало 100% выживаемость животных (**Рисунок 43Б**). Важно отметить, что у мышей из экспериментальной группы после введения Ар9 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 (мозг, сердце, почки, печень, легкие, селезенка, желудок), а также их внешних и гистологических изменений как в течение 24 ч, так и спустя две недели. Данное исследование было проведено в Лаборатории биологических испытаний (ЛБИ) ФИБХ РАН.

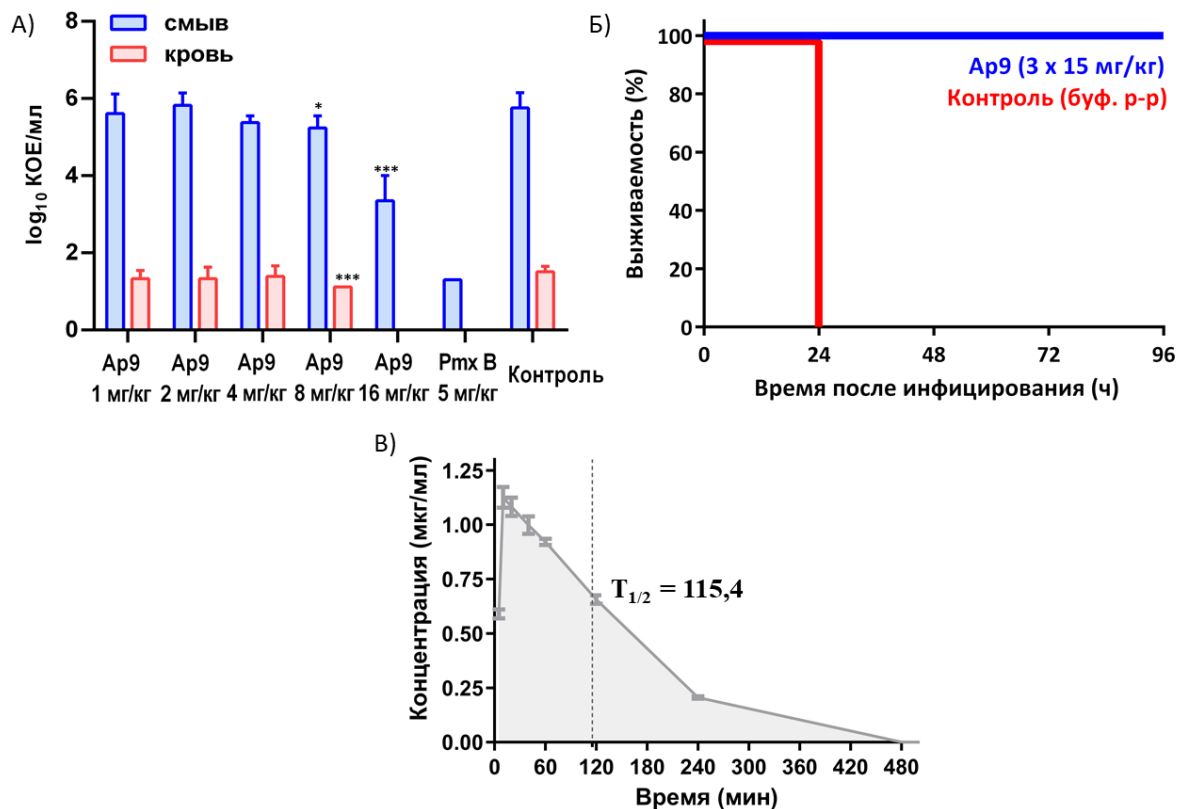


Рисунок 43. Изучение фармакокинетики Ap9 и его терапевтического потенциала при лечении инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. А) Эффективность *in vivo* Ap9 при лечении перитонита у мышей линии BALB/c (n=5) через 6 ч после внутрибрюшинного заражения штаммом *P. aeruginosa* PAO1. Б) Выживаемость мышей линии BALB/c (n=5) при лечении пептидом Ap9 летальной инфекции, вызываемой заражением штаммом *P. aeruginosa* PAO1. В) Фармакокинетический профиль пептида Ap9 в плазме крови крыс SD (n=3) при однократном внутримышечном введении в дозе 1 мг/кг. Период полувыведения препарата ($T_{1/2}$) обозначен пунктирной линией.

Следующий этап работы был направлен на определение концентрации пептида Ap9 в плазме крови грызунов. В доклинических фармакокинетических исследованиях широко используют мышей в качестве экспериментальных моделей, однако небольшой объем циркулирующей крови у мышей затрудняет отбор и нередко является недостаточным для последующего анализа. В связи с этим профиль содержания Ap9 оценивали в плазме крови крыс линии SD после однократного внутримышечного введения препарата в дозе 1 мг/кг. Данное исследование было выполнено в сотрудничестве с ЛБИ ФИБХ РАН. Предварительно было установлено, что выход твердофазной экстракции пептида составил 72,3%. Последующий расчет концентраций препарата в плазме был

выполнен с учетом коэффициента извлечения. После введения пептида кровь отбирали из латеральной хвостовой вены крыс, центрифугировали и отделяли плазму. Далее экстрагировали Ар9 и определяли его концентрацию методом хромато-масс-спектрометрии. На основании полученных данных была построена кривая «концентрация-время» и рассчитаны основные фармакокинетические показатели Ар9, такие как период полувыведения, равный 115,4 мин и площадь под кривой – 180,4 мг·мин/л (**Рисунок 43В**). Стоит отметить, что период полувыведения полимиксина В в плазме крыс составляет 87 мин после внутривенного введения в дозе 1 мг/кг [331]. Несмотря на различие путей введения, полученные значения указывают на достаточно продолжительную циркуляцию Ар9 в системном кровотоке после введения. Таким образом, полученные данные могут служить основой для предварительного выбора режима дозирования Ар9 на последующих этапах исследований, включая доклинические испытания.

Таким образом, нами был выявлен перспективный кандидат для разработки антибиотика с системным применением, эффективность которого превышает таковую для референсного пептида АА139, а также известных антибиотиков полимиксина В и ципрофлоксацина.

3.8. Исследование механизма действия Ар9 как наиболее перспективного отобранного АМП

Пептид Ар9 продемонстрировал высокий *in vivo* потенциал в отношении грамотрицательных бактерий, однако причины его повышенной селективности по сравнению с абареницином остаются не до конца ясными. На предыдущем этапе исследования механизма действия модифицированных аналогов абареницина было показано, что Ар9, как и пептид дикого типа, разрушал цитоплазматическую мембрану *E. coli* ML-35p при концентрации 4 мкМ, что соответствует 32×МИК (**Рисунок 33**). При этом влияние Ар9 на мембрану бактерий в более низком диапазоне концентраций не было исследовано. В связи с этим на следующем этапе мы оценили его действие при меньших концентрациях и показали, что заметное нарушение целостности цитоплазматической мембраны наблюдалось лишь при концентрации Ар9 выше 1 мкМ (8×МИК) (**Рисунок 44А**). Следует отметить, что для

большинства классических мембрано-активных АМП, включая и абареницин, повреждение мембраны происходит уже при концентрациях, соответствующих МИК [332,333]. Для подтверждения результатов ONPG-теста был проведен детальный анализ морфологии бактериальных клеток после воздействия Ar9 с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Эксперимент проводили в условиях, аналогичных ONPG-тесту (плотность инокулята, концентрации пептида, время инкубации), после чего образцы фиксировали, высушивали и анализировали в Лаборатории биохимических исследований канцерогенеза ФБМФ МФТИ. Как следует из полученных данных, при обработке клеток *E. coli* ML-35p пептидом в концентрациях 2 и 4 мкМ наблюдается выраженная деформация клеточной поверхности, включая появление шероховатости, вмятин и признаков повреждения, сопровождающихся утечкой цитоплазматического содержимого, что сопоставимо с действием мембранолитического АМП мелиттина (**Рисунок 44Б**). Напротив, при действии Ar9 в концентрации 0,25 мкМ ($2 \times \text{МИК}$) морфологические характеристики клеток не отличались от контрольных образцов без обработки. Таким образом, полученные изображения с помощью СЭМ хорошо согласуются с результатами ONPG-теста и свидетельствуют о дозозависимом характере Ar9 в отношении бактериальных мембран.

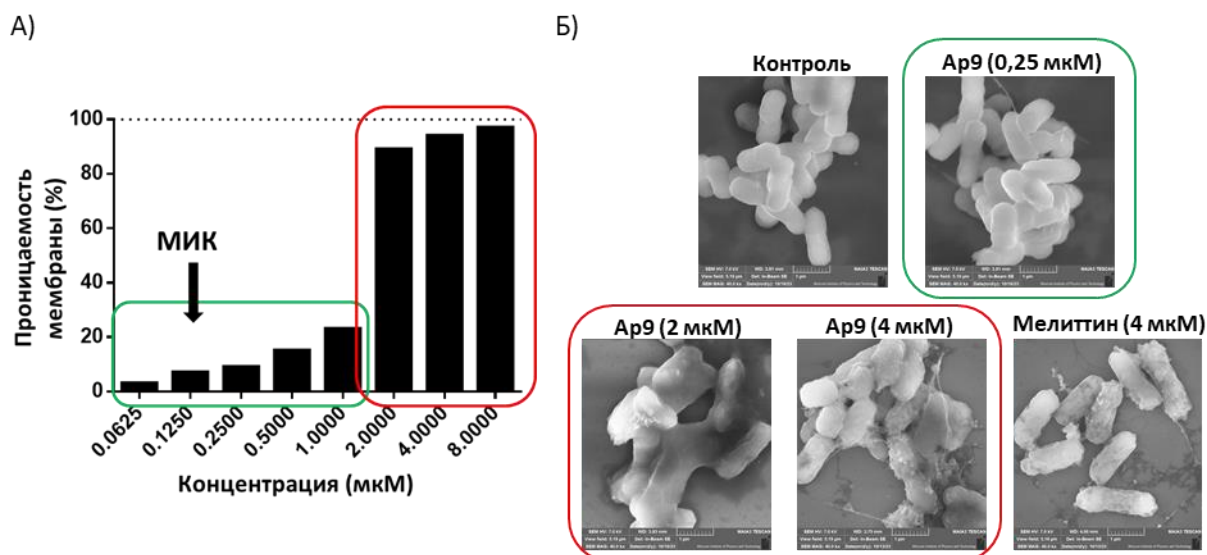


Рисунок 44. Изучение механизма действия Ap9. А) Анализ нарушения целостности цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35r под действием Ap9 (ONPG-тест) в течение 3 ч. 100% лизис обеспечивался действием мелиттина при концентрации 8 мкМ. Б) Изучение действия пептида Ap9 на клетки *E. coli* ML-35r методом сканирующей электронной микроскопии (исследование проведено совместно с Лабораторией биохимических исследований канцерогенеза ФБМФ МФТИ).

Кроме того, результаты экспериментов на БЛМ показали, что при действии пептида в концентрации 1 мкМ возникают электрические сигналы проводимости мембраны различной формы (спайк, мульти-уровневый, ступенчатый) амплитудой до 2 нСм (**Рисунок 45**), что свидетельствует о формировании пор с варьирующимися радиусом и временем жизни [334]. Эти поры являются нестабильными и постепенно закрываются, вероятно, ввиду снижения дисбаланса латерального давления и натяжения в монослоях мембраны в процессе их формирования. Однако при увеличении концентрации Ap9 до 4 мкМ наблюдаются скачки проводимости мембраны, за которыми следует их устойчивое повышение, что указывает на интенсивное формирование пептид-липидных пор, и в конечном итоге приводит к разрушению липидного бислоя.

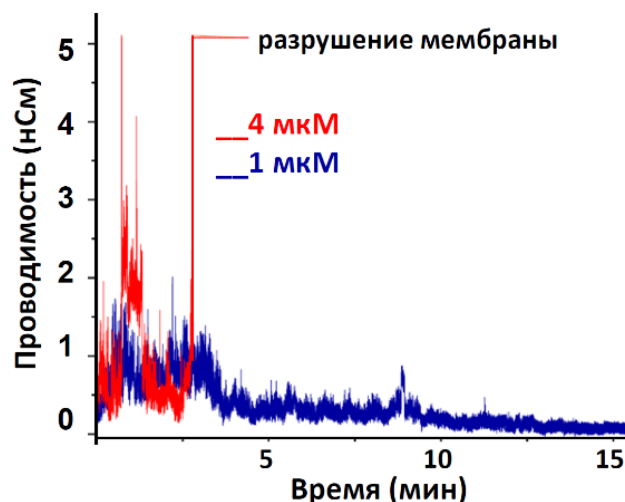


Рисунок 45. Изучение механизма действия Ar9. Измерение кинетики проводимости БЛМ [РС, РЕ, РГ, СL в соотношении 35:35:20:10 мол. %) при действии пептида Ar9 в концентрациях 1 или 4 мкМ (эксперимент выполнен совместно с коллегами из Лаборатории биоэлектрохимии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о вероятном мембранотропном механизме действия Ar9 в отношении грамотрицательных бактерий, по-видимому, сопровождающемся деполяризацией мембраны без её полного разрушения и формирования стабильных пор при концентрациях пептида, близких к значению МИК. Для проверки этого предположения мы оценили способность пептида индуцировать деполяризацию цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p. Исследование проводили на клетках в логарифмической фазе роста, поскольку в этот период их метаболическая активность и мембранный потенциал выражены сильнее, что повышает информативность методов, основанных на использовании флуоресцентных потенциал-чувствительных красителей [335–337]. Поскольку рост флуоресценции таких индикаторов может быть связан не только со снижением мембранного потенциала, но и с нарушением целостности мембраны, мы проводили одновременное окрашивание клеток пропидий йодидом (PI), проникающего в клетки при нарушении целостности мембраны и связывающегося с ДНК, а также потенциал-чувствительным красителем DiBAC4(3), накапливающимся в деполяризованных клетках (**Рисунок 46**).

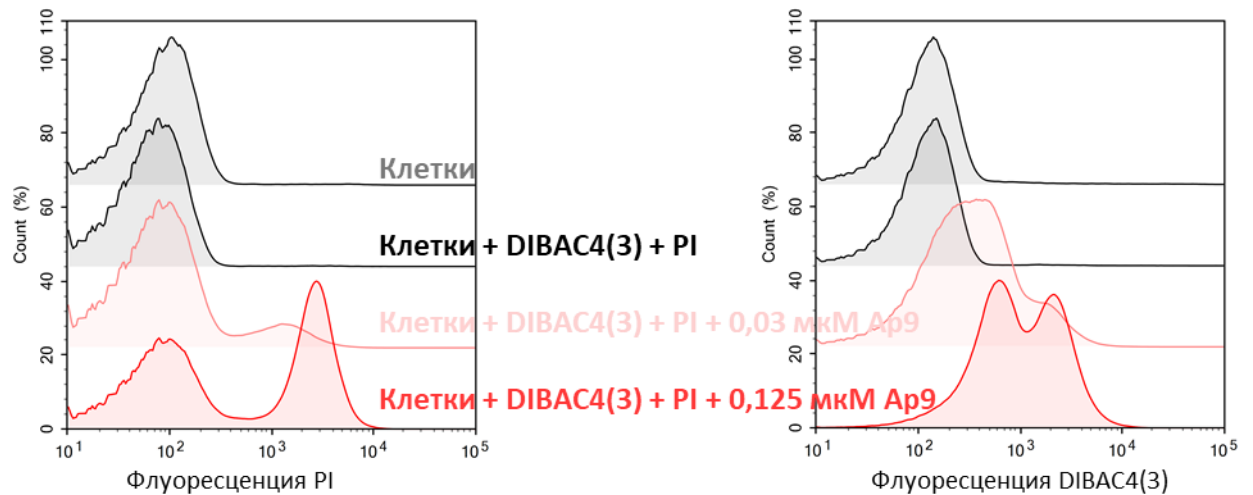


Рисунок 46. Анализ деполяризации цитоплазматической мембраны *E. coli* ML-35p после 1-часового воздействия пептида Ар9 с использованием красителей DiBAC4(3) и пропидия йодида (PI) методом проточной цитометрии.

Показано, что при действии Ар9 в концентрации 0,03 мкМ ($0,25 \times \text{МИК}$) наблюдается выраженный сдвиг флуоресценции красителя DiBAC4(3) при отсутствии клеток, проницаемых для PI, что указывает на деполяризацию цитоплазматической мембраны при сохранении её целостности. При повышении концентрации пептида до 0,125 мкМ, соответствующей МИК, происходит деполяризация всей популяции клеток и появляется PI-позитивная фракция, отражающая нарушение целостности мембраны только у части клеток.

Важно отметить, что прямое сопоставление концентраций Ар9, вызывающих деполяризацию цитоплазматической мембраны, с концентрациями, при которых в стандартных тестах выявляется повышение проницаемости мембранного барьера, не является полностью корректным. Это связано с различиями в физиологическом состоянии клеток: широко используемые методы для оценки мембранной активности соединений (ONPG-тест, окрашивание SYTOX Green или PI) обычно проводят на клетках в стационарной фазе, для которых характерны более стабильные барьерные свойства клеточной оболочки. В то же время мембранный потенциал измеряется только на активно растущих клетках в логарифмической фазе роста ($\text{OD}_{600}=0,5$), что позволяет регистрировать ранние функциональные изменения мембраны в режиме реального времени. Анализ с одновременным окрашиванием DiBAC4(3) и PI позволил показать, что Ар9 в первую очередь вызывает деполяризацию цитоплазматической мембраны, тогда как признаки нарушения ее целостности появляются лишь при более высоких концентрациях пептида.

С целью анализа вероятности развития бактериальной резистентности к Ар9 и, соответственно, возможных механизмов индуцируемой стабильной резистентности была проведена селекция устойчивых к нему клонов *E. coli* MDR CI 1057 в 7 независимых повторностях (**Рисунок 47**).

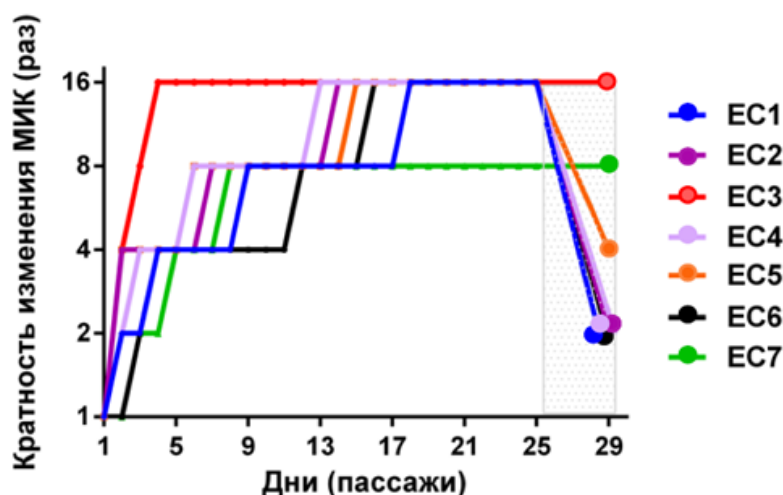


Рисунок 47. Индукция резистентности бактерий *E. coli* MDR CI 1057 к пептиду Ар9 (начальное значение МИК 0,125 мкМ, среда МН с добавлением 0,9% NaCl).

В ходе эксперимента были отобраны 3 резистентных штамма *E. coli*, демонстрирующие сниженную чувствительность к пептиду Ар9: EC3 (увеличение МИК в 16 раз), EC5 (в 4 раза) и EC7 (в 8 раз). Мутации в геномах полученных резистентных штаммов были выявлены путём полногеномного секвенирования, результаты которого представлены на **Рисунке 48А**. Штамм EC3 продемонстрировал значительное снижение скорости роста и способности к формированию биопленок, а также повышенную чувствительность к детергентам, желчным кислотам, рифампицину и эритромицину (**Рисунок 48Б, 48В, 48Г**), что в совокупности указывает на снижение барьерной функции наружной мембраны. В его геноме были выявлены мутации в генах *serS*, *mldD* и *mldA*. Поскольку точечные мутации в *serS*, кодирующем серил-тРНК-лигазу, уже выявлялись в наших предыдущих экспериментах по отбору устойчивых штаммов к другим АМП в условиях длительного селекционного давления, маловероятно, что они играют ключевую роль в формировании резистентности к пептиду Ар9. Более значимыми представляются мутации в генах шестикомпонентной системы MLA (maintenance of lipid asymmetry), которая обеспечивает ретроградный транспорт неправильно локализованных фосфолипидов из наружного слоя внешней мембраны к

цитоплазматической мембране [338]. Мутация, приводящая к инактивации гена *mldD*, была также обнаружена у штамма ЕС5 и сопровождалась незначительным снижением чувствительности к Ар9, не вызывая при этом существенных изменений в физиологии клеток. В отличие от ЕС5, штамм ЕС3 демонстрировал выраженные фенотипические изменения, что указывает на наиболее значимый вклад мутации в гене *mldA*, сопровождающейся делецией остатков F44 и N45 в N-концевой части зрелого белка MlaA. Подобная мутация (делеция остатков N41 и F42) была ранее описана в работе [339] и обозначена как *mldA**. Примечательно, что мутации как в ЕС3, так и в *mldA**, приводят к формированию одного и того же варианта зрелого белка Mla. Ранее было показано, что *mldA** характеризовался повышенной проницаемостью наружной мембраны и чувствительностью к детергентам, желчным солям и антибиотикам (рифампицин и эритромицин) как по сравнению с диким типом, так и со штаммом $\Delta mldA$, что согласуется с нашими данными. Мутация *mldA** вызывает нарушение липидного баланса наружной мембраны и сопровождается активацией экспрессии гена *pldA*, кодирующего фосфолипазу А. В результате наблюдается повышенный уровень гептаацилированного ЛПС, усиленная везикуляции внешней мембраны и истощение фосфолипидов внутренней мембраны, что приводит в конечном итоге к частичной гибели клеток в стационарной фазе. При этом введение дополнительных мутаций в компоненты системы Mla (например, $\Delta mldF$ или $\Delta mldD$) на фоне *mldA** не ослабляло наблюдаемый фенотип, что может указывать, по-видимому, на независимую функцию *mldA* в регуляции липидного состава и свойств внешней мембраны. Тем не менее, при анализе представленных авторами данных по эффективности посева можно заметить, что штаммы с двойными мутациями формируют немного больше колоний, чем *mldA**, что может свидетельствовать об активации компенсационных механизмов, частично восстанавливающих барьерные свойства наружной мембраны. В нашем случае наблюдается схожая картина: штамм ЕС3, несущий делеции в *mldA* и мутацию со сдвигом рамки считывания в *mldD*, характеризуется повышенной проницаемостью по сравнению с диким типом, но при этом сохраняет жизнеспособность, что отличает его от фенотипа, описанного для *mldA**. На основании этих данных можно предположить, что выявленные нами делеции в гене *mldA* нарушают транспорт фосфолипидов, вызывая их избыточное накопление во внешнем слое наружной

мембраны, что, в совокупности с повышенной везикуляцией внешней мембраны, вероятно, снижает эффективную концентрацию Ар9 и его способность взаимодействовать с поверхностью клетки.

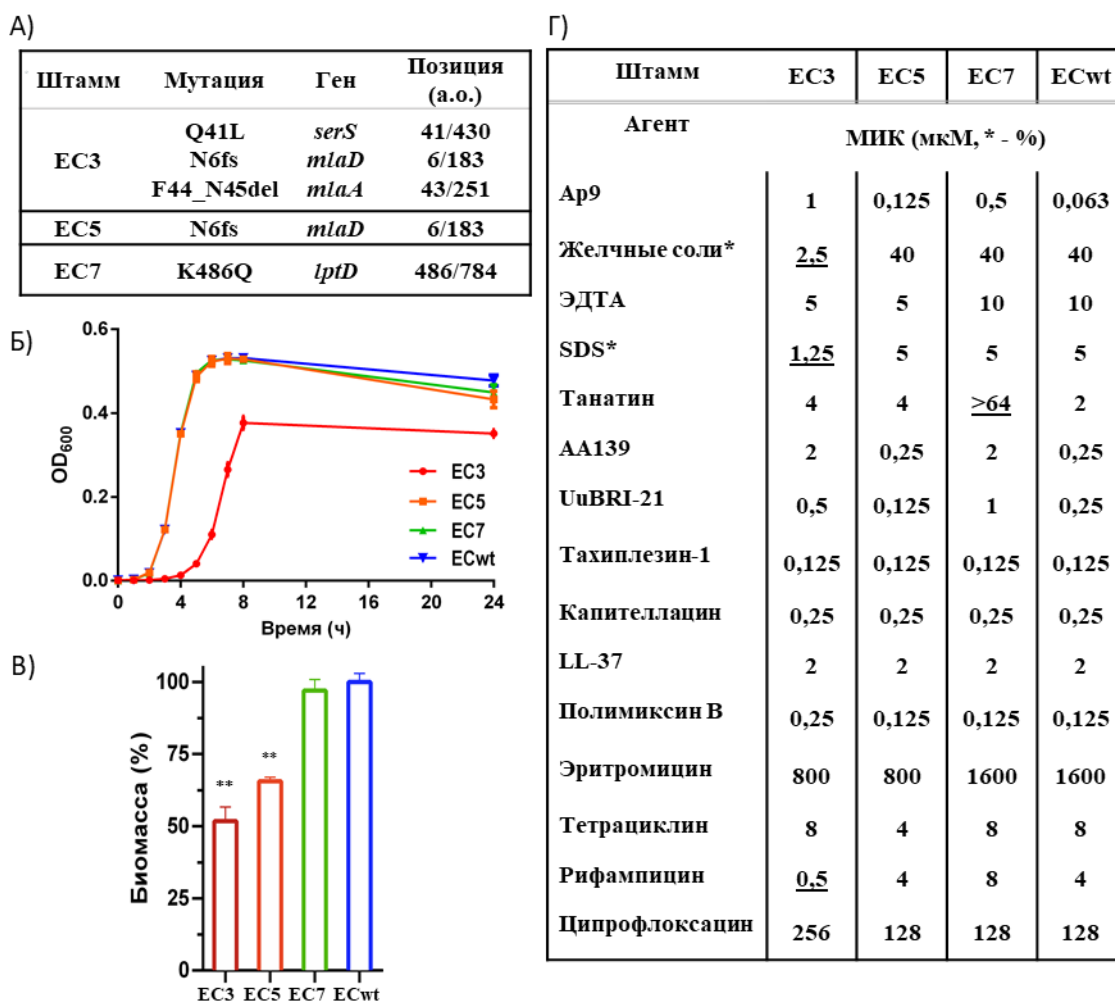


Рисунок 48 Анализ резистентных штаммов *E. coli* MDR CI 1057 к пептиду Ар9.

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.

Потенциальное снижение чувствительности грамотрицательных бактерий к пептиду Ар9 также может быть связано с мутацией в жизненно важном для бактерий трансмембранном белке LptD, входящем в состав Lpt-комплекса. Этот комплекс состоит из семи белков (LptA-LptG), формирующих непрерывную транспортную систему переноса ЛПС от внутренней мембраны к наружной. Экстракция зрелого ЛПС из внешнего листа внутренней мембраны осуществляется АВС-транспортером LptB2FG, который образует стабильный комплекс с мембранным белком LptC.

Последний, в свою очередь, обеспечивает перенос ЛПС к периплазматическому белку LptA, который выстраиваясь в линейную олигомерную структуру, формирует «мост» между внутренней и внешней мембранами. Заключительный этап встраивания ЛПС в наружный лист внешней мембраны выполняется транслоконом LptD/LptE [340,341]. Данные по скринингу активности различных АМП выявили перекрестную резистентность штамма ЕС7 к β -шпильчному АМП танатину, для которого ранее была показана способность связываться с белками LptA и LptD [342].

Благодаря своей локализации на внешней мембране грамотрицательных бактерий и доступности для взаимодействия с пептидом Ar9 белок LptD может рассматриваться в качестве потенциальной мишени его антибактериального действия. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование их возможного взаимодействия микротермофорезом (MST) – быстрым и количественным методом для оценки молекулярного связывания, основанным на измерении движения флуоресцентно меченых молекул в температурном градиенте, создаваемом инфракрасным лазером [343]. Одним из ключевых преимуществ MST является возможность проведения измерений в физиологических условиях при наличии сывороточных белков, липосом, мицелл и детергентов, что делает этот метод особенно подходящим для анализа взаимодействий с мембранными белками, в том числе и с LptD. Кроме того, MST можно использовать для анализа связывания молекул с различной молекулярной массой, поскольку термодинамическая подвижность образовавшегося комплекса определяется не только его размером, но и изменениями сольватной оболочки, заряда и даже конформации, что делает возможным исследование взаимодействия даже с низкомолекулярными лигандами [344]. Аффинность связывания количественно оценивается по изменению нормализованной флуоресценции (FNorm) по мере увеличения концентрации лиганда. Для расчета константы диссоциации (Kd) используется модель 1:1 стехиометрии, основанная на законе действующих масс [345]. Поскольку точечные модификации могут существенно изменить структуру и биологические свойства АМП, флуоресцентное мечение Ar9 могло бы повлиять на его взаимодействие с мишенью [346,347]. В связи с этим флуоресцентную метку было решено ввести в белок LptD. Однако учитывая крайне низкий уровень экспрессии белка LptD (примерно 60 молекул на клетку), а также то, что его нативная конформация

формируется исключительно при участии липопротеина LptE, который способствует образованию уникальной структуры «бочки с затычкой» («barrel and plug»), необходимой для транспорта и встраивания ЛПС в наружный слой внешней мембраны, была проведена коэкспрессия их генов в бактериальной системе *E. coli* BL21(DE3) [348]. В качестве метки был выбран зеленый флуоресцентный белок (GFP), слитый с С-концом LptE через гибкий линкер GSGS [349]. На первом этапе был получен немеченый комплекс для оценки уровня экспрессии и валидации протокола очистки (**Рисунок 49**). Выделение из клеточного лизата проводили с использованием детергентов, разрушающих как внутреннюю, так и наружную мембрану, таких как N-лаурилсаркозин натрия (SLS), оксид лаурилдиметиламин (LDAO) и октил-н-бета-D-глюкопиранозид (OG). Наличие двух белков в элюате после металлохелатной хроматографии подтверждали с помощью метода SDS-PAGE, вестерн-блота и масс-спектрометрии (LptD – 89653,2188 Да; LptE – 21685,8398 Да).

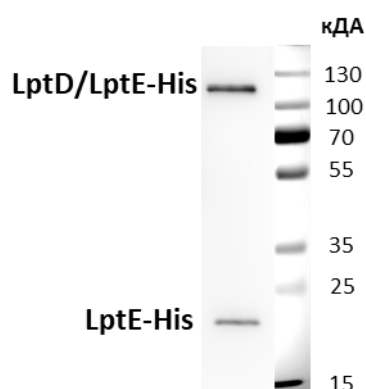


Рисунок 49. Вестерн-блот очищенного комплекса LptD/LptE-His. SDS-PAGE проводили без нагревания, в присутствии восстанавливающего агента (β -меркаптоэтанола, ВМЕ), с детекцией антителами, специфичными к His-тегу.

На втором этапе был получен меченый комплекс с использованием той же методики выделения. Наличие GFP, по-видимому, способствовало стабилизации комплекса, что подтверждается более высоким уровнем экспрессии LptD/LptE-GFP-His (DEG) по сравнению с LptD/LptE-His (DE) после индукции IPTG (**Рисунок 50**). Выход комплекса составил 200 мкг с 250 мл культуральной среды.

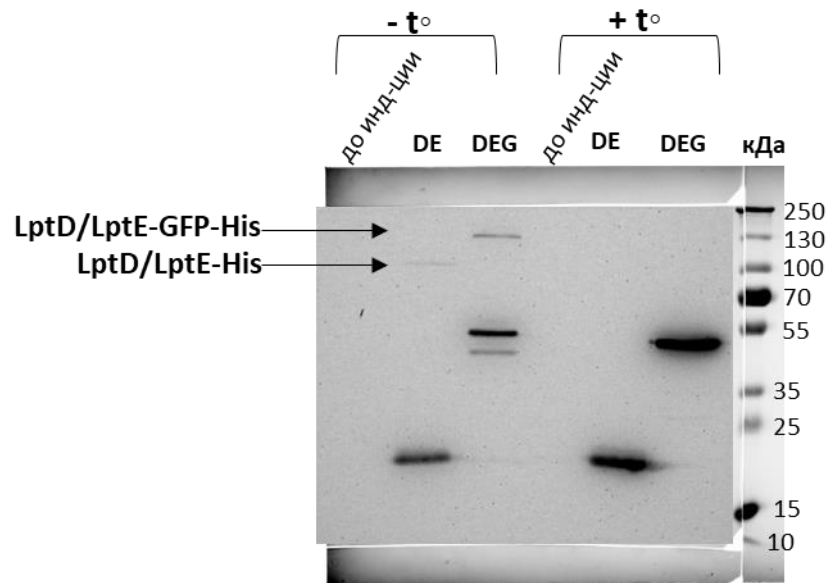


Рисунок 50. Вестерн-блот анализ экспрессии комплексов LptD/LptE-GFP-His (DEG) и LptD/LptE-His (DE) в присутствии BME, при нагревании и без.

Дополнительным преимуществом использования GFP является возможность визуализации целевого белка непосредственно на стадии очистки (**Рисунок 51**). Кроме того, укладка GFP зависит от правильной конформации белкового домена, с которым он слит, поэтому интенсивность флуоресценции может служить косвенным показателем не только уровня экспрессии, но и корректного фолдинга слитого с ним белка. Снижение сигнала, как правило, указывает на низкий уровень экспрессии или образование агрегатов [350,351].



Рисунок 51. Визуализация комплекса LptD/LptE-GFP-His при очистке методом металлохелатной хроматографии.

Чистоту фракций на каждой стадии очистки анализировали методом вестерн-блота (**Рисунок 52А**). Наличие комплекса LptD/LptE-GFP-His в элюате после металлохелатной хроматографии было подтверждено методом SDS-PAGE (**Рисунок 52Б**) и масс-спектрометрией (LptD – 89653,22 Да; LptE – 21685,84 Да; GFP – 26806,26 Да). При анализе очищенной фракции комплекса LptD/LptE-GFP-His методом вестерн-блота наблюдались двойные полосы как в области молекулярной массы полноразмерного комплекса, так и в области его фрагмента LptE, содержащего GFP-репортер (**Рисунок 52А**, полоса 7). Анализ того же образца методом SDS-PAGE выявил лишь одну видимую полосу, соответствующую целевому комплексу (**Рисунок 52Б**, условия: +ВМЕ, без нагревания). Схожее явление было описано в работе [350], где при вестерн-блот анализе различных неродственных мембранных белков с С-концевым GFP-His выявлялась дополнительная полоса с молекулярной массой, превышающей основную на 10-15 кДа, тогда как при окрашивании геля Кумасси регистрировалась только основная полоса. При этом белки без GFP мигрировали в виде единой полосы независимо от метода детекции. Авторы этой работы пришли к выводу, что медленно мигрирующая (верхняя) полоса в каждом случае соответствует формам частично денатурированных или агрегированных белков, которые менее эффективно солюбилизируются детергентами и не обладают флуоресцентной активностью. Тогда как основная (нижняя) полоса соотносится с правильно свернутой, функционально активной формой белков и коррелирует с интенсивностью флуоресценции GFP. Важно отметить, что попытки авторов минимизировать образование агрегатов путем изменения штамма-продуцента, условий экспрессии и очистки были безуспешны. Таким образом, даже если в элюате очищенного комплекса LptD/LptE-GFP-His присутствует незначительное количество его агрегированной нефлуоресцентной формы, это не должно повлиять на точность измерения связывания с помощью микротермофореза, поскольку данный метод регистрирует исключительно флуоресцирующие молекулы.

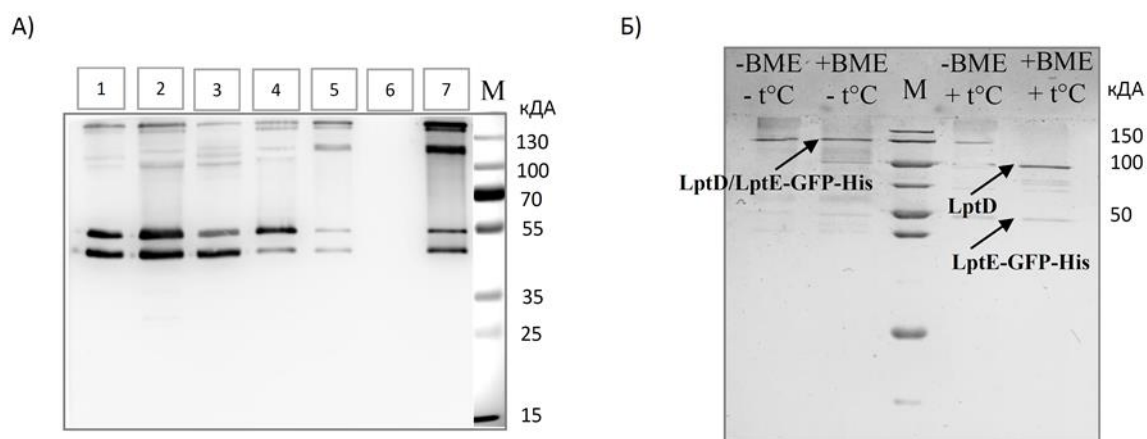


Рисунок 52. Анализ получения транслокона LptD/LptE-GFP-His в клетках *E. coli* BL21 (DE3). А) Вестерн-блот анализ фракций с использованием анти-His-тег антител: (1) клеточный лизат, (2) осадок после обработки SLS, (3) супернатант, (4) осадок, ресуспендированный в LDAO, (5) смесь, нанесённая на колонку, (6) проскок, (7) элюат. SDS-PAGE проводился без нагревания и в присутствии BME, 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.

Для проверки гипотезы о взаимодействии Ар9 с полученным комплексом была проведена количественная оценка связывания микротермофорезом, при этом танатин использовали в качестве положительного контроля. Показано, что пептид Ар9 не демонстрировал сродства к полученному комплексу даже при концентрациях, существенно превышающих МИК (**Рисунок 53А**). В то же время, пептид сравнения танатин (МИК в отношении *E. coli* 2 мкМ) проявил аффинность к комплексу LptD/LptE-GFP-His в микромолярном диапазоне ($K_d = 1,893 \pm 0,753$ мкМ).

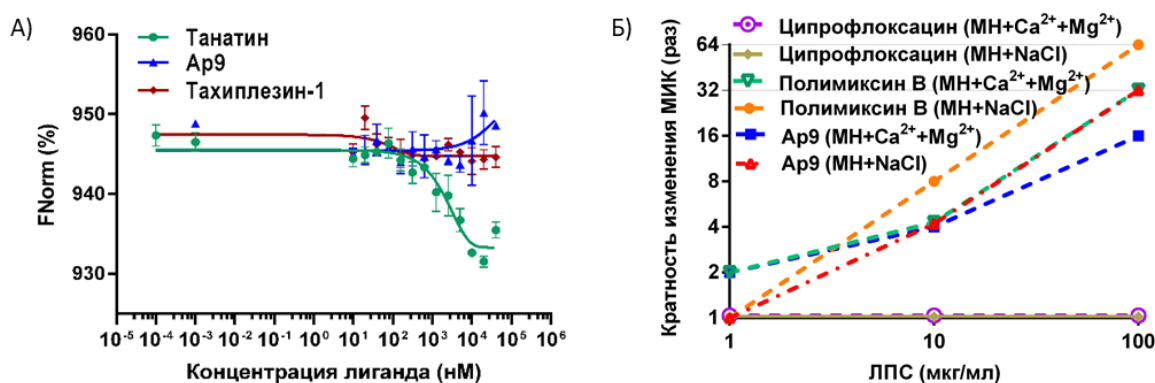


Рисунок 53. Изучение механизма действия Ap9. А) Кривые зависимости "доза-ответ", отражающие аффинность взаимодействия между танатином, Ap9, тахиipleзином-1 и комплексом LptD/LptE-GFP-His. Концентрации пептидов (лигандов) варьировались в диапазоне от 40 мкМ до 1 нМ, в то время как концентрация комплекса была постоянной и составляла 300 нМ. Б) Активность пептида Ap9, полимиксина В и ципрофлоксацина в присутствии ЛПС против *E. coli* ML-35р. Начальные значения МИК пептида Ap9 и полимиксина В составляют 0,125 мкМ, ципрофлоксацина – 0,063 мкМ.

На основании полученных данных было выдвинуто предположение, что мутация в белке LptD может влиять на чувствительность бактерий к Ap9 за счет изменений транспорта ЛПС или его избыточного накопления на поверхности клетки, а сам пептид, вероятно, взаимодействует непосредственно с ЛПС. Для подтверждения этого тезиса была изучена активность пептида в отношении *E. coli* ML-35р в присутствии экзогенной фракции ЛПС, выделенной из *E. coli*. 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 [352]. В качестве положительного контроля использовали полимиксин В, для которого показано высокое сродство к ЛПС, а в качестве отрицательного – ципрофлоксацин, ингибирующий ДНК-гиразу / топоизомеразу. Результаты, представленные на **Рисунке 53Б**, показывают, что активность Ap9 и полимиксина В значительно снижается в обеих тестовых средах, что свидетельствует о высокой и сопоставимой способности этих соединений связываться с ЛПС.

Для структурной характеристики взаимодействия Ap9 с ЛПС были проведены ЯМР-исследования пептида в присутствии ЛПС *E. coli*. Показано, что Ap9

претерпевает конформационную перестройку при добавлении ЛПС, что сопровождается формированием димерной формы пептида. При этом участок Ar9, включающий аминокислотные остатки 8–12, принимает конформацию 3_{10} -спирали вместо петлевого мотива, характерного для мономерной формы (**Рисунок 54А**). Стабилизация 3_{10} -спирального сегмента обеспечивается появлением новых внутримолекулярных водородных связей (V13–N11, G12–C7, N11–R9/A8), тогда как связи A8–I15, A6–Y17 в области β -слоя исчезают, что указывает на повышение конформационной подвижности данной области (**Рисунок 54Б, 54В**). Дополнительную устойчивость димеру также придают водородные связи (T5–R18', C3–R19').

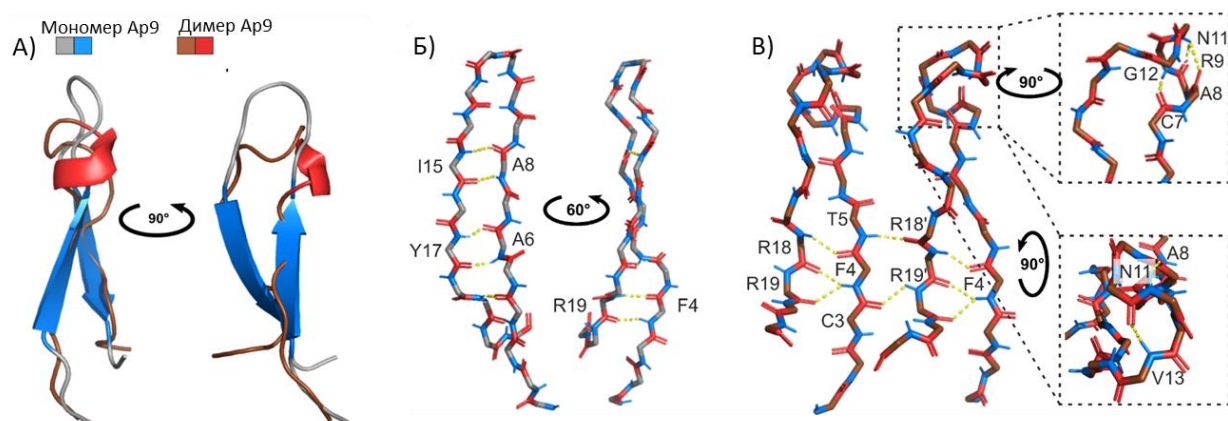


Рисунок 54. Пространственная структура Ar9 в присутствии ЛПС. **А)** Наложение пространственных структур мономерной и димерной формы Ar9. **Б)** Водородные связи в мономерной форме Ar9. **В)** Водородные связи в димерной форме Ar9. Исследование проведено в сотрудничестве с коллегами из Лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии.

ЛПС-опосредованные структурные изменения в β -повороте Ar9 сопровождаются перераспределением электростатического потенциала и формированием выраженной амфифильной организации с гидрофобным участком (остатки 15–21 обеих цепей) и протяженной положительно заряженной областью, что потенциально может способствовать его селективному взаимодействию с мембранами грамотрицательных бактерий. Таким образом, пептид Ar9 демонстрирует антибактериальное действие, схожее с полимиксином В, однако проявляет принципиально иной характер взаимодействия с ЛПС, что препятствует развитию кросс-резистентности.

4. Заключение

Быстрое появление и распространение резистентных штаммов бактерий представляет собой одну из ключевых проблем в медицине. Несмотря на то, что рынок пептидных препаратов традиционно был ориентирован на лечение онкологических и метаболических заболеваний, в настоящее время тенденция смещается в сторону инфекционных заболеваний [273,353]. В условиях роста множественной лекарственной устойчивости АМП привлекают все большее внимание как перспективные противoinфекционные агенты, механизмы действия которых отличаются от таковых у традиционных антибиотиков.

Результаты, полученные в ходе данной работы, свидетельствуют о том, что морские полихеты, благодаря своей малой изученности и эволюционной адаптации к постоянному давлению со стороны микробных сообществ, являются богатым источником для поиска и исследования новых биологически активных соединений. Современные достижения в области секвенирования ДНК/РНК (NGS) в сочетании с развитием вычислительных методов, включая алгоритмы машинного обучения, существенно расширили возможности обнаружения новых последовательностей АМП в геномах и транскриптомах животных. Одной из наиболее эффективных стратегий оказался поиск последовательностей АМП, основанный на гомологии консервативных участков в структуре их белков-предшественников. В нашем исследовании таким фрагментом служил BRICHOS-домен у различных видов полихет, что позволило обнаружить принципиально новые структурные семейства защитных пептидов. Как итог, 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 «Rana-box»; дефенсин-подобные пептиды, обогащенные остатками цистеина.

В результате углублённого изучения обнаруженных BRICHOS-ассоциированных АМП были идентифицированы 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. Один из них представляет собой природный пептид

(HfBRI-25), тогда как второй (Ap9) был получен путем рационального дизайна на основе последовательности другого природного пептида, названного нами абареницин. Следует отметить, что в данной работе была проанализирована лишь часть обнаруженных АМП, что позволяет предполагать наличие более широкого арсенала соединений с высокой антибактериальной активностью для последующего скрининга и оптимизации.

Для наиболее активного прототипа Ap9 был детально изучен механизм антимикробного действия в отношении бактерий *E. coli*, а также проведен анализ вероятности возникновения бактериальной резистентности и выявлены потенциальные пути защиты клетки-мишени. В целом, Ap9 благодаря высокой эффективности *in vitro* и *in vivo*, сравнительно низкой цитотоксичности и широкому терапевтическому окну может рассматриваться в качестве многообещающей замены полимиксинов — антибиотикам резервного ряда, применяемым для лечения осложненных инфекционных заболеваний, вызванных мультирезистентными грамотрицательными патогенами.

5. 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 «Ranabox»; 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 Ap9, обладающий повышенным терапевтическим индексом по сравнению с природным пептидом. Показано, что механизм действия Ap9, 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 Ap9, 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, зараженных уропатогенным штаммом с *mcr-1*-опосредованной устойчивостью к полимиксинам, приводит к 100% выживаемости экспериментальных животных.

6. Список литературы

1. Singh, S.B.; Barrett, J.F. Empirical Antibacterial Drug Discovery—Foundation in Natural Products. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *71*, 1006–1015, doi:10.1016/j.bcp.2005.12.016.
2. Butler, M.S.; Blaskovich, M.A.; Cooper, M.A. Antibiotics in the Clinical Pipeline in 2013. *J Antibiot* **2013**, *66*, 571–591, doi:10.1038/ja.2013.86.
3. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*; Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019;
4. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
5. *WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance*; 1st ed.; World Health Organization: Geneva, 2024; ISBN 978-92-4-009346-1.
6. Materon, I.C.; Palzkill, T. Structural Biology of MCR-1-Mediated Resistance to Polymyxin Antibiotics. *Current Opinion in Structural Biology* **2023**, *82*, 102647, doi:10.1016/j.sbi.2023.102647.
7. Shahzad, S.; Willcox, M.D.P.; Rayamajhee, B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene (Mcr) among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1597, doi:10.3390/antibiotics12111597.
8. Moffatt, J.H.; Harper, M.; Boyce, J.D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*; Li, J., Nation, R.L., Kaye, K.S., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 1145, pp. 55–71 ISBN 978-3-030-16371-6.
9. Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J.-M. Mechanisms of Polymyxin Resistance: Acquired and Intrinsic Resistance in Bacteria. *Front Microbiol* **2014**, *5*, 643, doi:10.3389/fmicb.2014.00643.
10. Ma, B.; Fang, C.; Lu, L.; Wang, M.; Xue, X.; Zhou, Y.; Li, M.; Hu, Y.; Luo, X.; Hou, Z. The Antimicrobial Peptide Thanatin Disrupts the Bacterial Outer Membrane and Inactivates the NDM-1 Metallo- β -Lactamase. *Nat Commun* **2019**, *10*, 3517, doi:10.1038/s41467-019-11503-3.
11. Austin, B. *Marine Microbiology*; Cambridge University Press: Cambridge [Cambridgeshire]; New York, 1988; ISBN 978-0-521-32252-2.
12. Nakatsuji, T.; Gallo, R.L. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology* **2012**, *132*, 887–895, doi:10.1038/jid.2011.387.
13. Kiss, G.; Michl, H. Über das Giftsekret der Gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon* **1962**, *1*, 33–34, doi:10.1016/0041-0101(62)90006-5.
14. Zasloff, M. Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 5449–5453, doi:10.1073/pnas.84.15.5449.
15. Boman, H.G.; Nilsson, I.; Rasmuson, B. Inducible Antibacterial Defence System in *Drosophila*. *Nature* **1972**, *237*, 232–235, doi:10.1038/237232a0.
16. Boman, H.G. Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 61–92, doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425.

17. Mak, A.S.; Jones, B.L. The Amino Acid Sequence of Wheat β -Purothionin. *Can. J. Biochem.* **1976**, *54*, 835–842, doi:10.1139/o76-120.
18. Machado, L.R.; Ottolini, B. An Evolutionary History of Defensins: A Role for Copy Number Variation in Maximizing Host Innate and Adaptive Immune Responses. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00115.
19. Kościuczuk, E.M.; Lisowski, P.; Jarczak, J.; Strzałkowska, N.; Jóźwik, A.; Horbańczuk, J.; Krzyżewski, J.; Zwierzchowski, L.; Bagnicka, E. Cathelicidins: Family of Antimicrobial Peptides. A Review. *Mol Biol Rep* **2012**, *39*, 10957–10970, doi:10.1007/s11033-012-1997-x.
20. Yan, H.; Hancock, R.E.W. Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 1558–1560, doi:10.1128/AAC.45.5.1558-1560.2001.
21. Nicolas, P.; El Amri, C. The Dermaseptin Superfamily: A Gene-Based Combinatorial Library of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788*, 1537–1550, doi:10.1016/j.bbamem.2008.09.006.
22. Vanhoye, D.; Bruston, F.; Nicolas, P.; Amiche, M. Antimicrobial Peptides from Hylid and Ranin Frogs Originated from a 150-million-year-old Ancestral Precursor with a Conserved Signal Peptide but a Hypermutable Antimicrobial Domain. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 2068–2081, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03584.x.
23. König, E.; Bininda-Emonds, O.R.P. Evidence for Convergent Evolution in the Antimicrobial Peptide System in Anuran Amphibians. *Peptides* **2011**, *32*, 20–25, doi:10.1016/j.peptides.2010.10.009.
24. Semple, F.; Dorin, J.R. β -Defensins: Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More? *J Innate Immun* **2012**, *4*, 337–348, doi:10.1159/000336619.
25. Lehrer, R.I.; Lu, W. α -Defensins in Human Innate Immunity. *Immunological Reviews* **2012**, *245*, 84–112, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x.
26. Hazlett, L.; Wu, M. Defensins in Innate Immunity. *Cell Tissue Res* **2011**, *343*, 175–188, doi:10.1007/s00441-010-1022-4.
27. Thevissen, K.; Kristensen, H.-H.; Thomma, B.P.H.J.; Cammue, B.P.A.; François, I.E.J.A. Therapeutic Potential of Antifungal Plant and Insect Defensins. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 966–971, doi:10.1016/j.drudis.2007.07.016.
28. Semple, C.A.; Gautier, P.; Taylor, K.; Dorin, J.R. The Changing of the Guard: Molecular Diversity and Rapid Evolution of β -Defensins. *Mol Divers* **2006**, *10*, 575–584, doi:10.1007/s11030-006-9031-7.
29. Zhu, S. Discovery of Six Families of Fungal Defensin-like Peptides Provides Insights into Origin and Evolution of the CS $\alpha\beta$ Defensins. *Molecular Immunology* **2008**, *45*, 828–838, doi:10.1016/j.molimm.2007.06.354.
30. Sagaram, U.S.; Pandurangi, R.; Kaur, J.; Smith, T.J.; Shah, D.M. Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium Graminearum*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18550, doi:10.1371/journal.pone.0018550.
31. Yount, N.Y.; Yeaman, M.R. Structural Congruence among Membrane-Active Host Defense Polypeptides of Diverse Phylogeny. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 1373–1386, doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.027.
32. Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Unifying Themes in Host Defence Effector Polypeptides. *Nat Rev Microbiol* **2007**, *5*, 727–740, doi:10.1038/nrmicro1744.

33. Zhu, S.; Gao, B. Evolutionary Origin of β -Defensins. *Developmental & Comparative Immunology* **2013**, *39*, 79–84, doi:10.1016/j.dci.2012.02.011.
34. Kouno, T.; Mizuguchi, M.; Aizawa, T.; Shinoda, H.; Demura, M.; Kawabata, S.; Kawano, K. A Novel β -Defensin Structure: Big Defensin Changes Its N-Terminal Structure To Associate with the Target Membrane. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7629–7635, doi:10.1021/bi900756y.
35. Froy, O.; Gurevitz, M. Arthropod and Mollusk Defensins – Evolution by Exon-Shuffling. *Trends in Genetics* **2003**, *19*, 684–687, doi:10.1016/j.tig.2003.10.010.
36. Xiao, Y.; Hughes, A.L.; Ando, J.; Matsuda, Y.; Cheng, J.-F.; Skinner-Noble, D.; Zhang, G. A Genome-Wide Screen Identifies a Single β -Defensin Gene Cluster in the Chicken: Implications for the Origin and Evolution of Mammalian Defensins. *BMC Genomics* **2004**, *5*, 56, doi:10.1186/1471-2164-5-56.
37. Lynn, D.J.; Lloyd, A.T.; Fares, M.A.; O’Farrelly, C. Evidence of Positively Selected Sites in Mammalian α -Defensins. *Molecular Biology and Evolution* **2004**, *21*, 819–827, doi:10.1093/molbev/msh084.
38. Lynn, D.J.; Bradley, D.G. Discovery of α -Defensins in Basal Mammals. *Developmental & Comparative Immunology* **2007**, *31*, 963–967, doi:10.1016/j.dci.2007.01.007.
39. Lynn, D.J.; Lloyd, A.T.; Fares, M.A.; O’Farrelly, C. Evidence of Positively Selected Sites in Mammalian α -Defensins. *Molecular Biology and Evolution* **2004**, *21*, 819–827, doi:10.1093/molbev/msh084.
40. Nguyen, T.X.; Cole, A.M.; Lehrer, R.I. Evolution of Primate θ -Defensins: A Serpentine Path to a Sweet Tooth. *Peptides* **2003**, *24*, 1647–1654, doi:10.1016/j.peptides.2003.07.023.
41. Wilkinson, R.D.; Steiper, M.E.; Soligo, C.; Martin, R.D.; Yang, Z.; Tavaré, S. Dating Primate Divergences through an Integrated Analysis of Palaeontological and Molecular Data. *Systematic Biology* **2011**, *60*, 16–31, doi:10.1093/sysbio/syq054.
42. Semple, C.A.; Gautier, P.; Taylor, K.; Dorin, J.R. The Changing of the Guard: Molecular Diversity and Rapid Evolution of β -Defensins. *Mol Divers* **2006**, *10*, 575–584, doi:10.1007/s11030-006-9031-7.
43. Barreiro, L.B.; Quintana-Murci, L. From Evolutionary Genetics to Human Immunology: How Selection Shapes Host Defence Genes. *Nat Rev Genet* **2010**, *11*, 17–30, doi:10.1038/nrg2698.
44. Stotz, H.U.; Thomson, J.; Wang, Y. Plant Defensins: Defense, Development and Application. *Plant Signaling & Behavior* **2009**, *4*, 1010–1012, doi:10.4161/psb.4.11.9755.
45. Carvalho, A.D.O.; Gomes, V.M. Plant Defensins—Prospects for the Biological Functions and Biotechnological Properties. *Peptides* **2009**, *30*, 1007–1020, doi:10.1016/j.peptides.2009.01.018.
46. Whittington, C.M.; Papenfuss, A.T.; Locke, D.P.; Mardis, E.R.; Wilson, R.K.; Abubucker, S.; Mitreva, M.; Wong, E.S.; Hsu, A.L.; Kuchel, P.W.; et al. Novel Venom Gene Discovery in the Platypus. *Genome Biol* **2010**, *11*, R95, doi:10.1186/gb-2010-11-9-r95.
47. Whittington, C.M.; Belov, K. Platypus Venom Genes Expressed in Non-Venom Tissues. *Aust. J. Zool.* **2009**, *57*, 199, doi:10.1071/ZO09046.
48. Arnett, E.; Seveau, S. The Multifaceted Activities of Mammalian Defensins. *CPD* **2011**, *17*, 4254–4269, doi:10.2174/138161211798999348.

49. Cardoso, M.H.; Oshiro, K.G.N.; Rezende, S.B.; Cândido, E.S.; Franco, O.L. The Structure/Function Relationship in Antimicrobial Peptides: What Can We Obtain From Structural Data? In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Elsevier, 2018; Vol. 112, pp. 359–384 ISBN 978-0-12-814340-7.
50. Vandamme, D.; Landuyt, B.; Luyten, W.; Schoofs, L. A Comprehensive Summary of LL-37, the Factotum Human Cathelicidin Peptide. *Cellular Immunology* **2012**, *280*, 22–35, doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009.
51. Nguyen, L.T.; Haney, E.F.; Vogel, H.J. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and Their Modes of Action. *Trends in Biotechnology* **2011**, *29*, 464–472, doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
52. Wiradharma, N.; Sng, M.Y.S.; Khan, M.; Ong, Z.; Yang, Y. Rationally Designed α -Helical Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides with Idealized Facial Amphiphilicity. *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 74–80, doi:10.1002/marc.201200534.
53. Bahar, A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1543–1575, doi:10.3390/ph6121543.
54. Conibear, A.C.; Rosengren, K.J.; Daly, N.L.; Henriques, S.T.; Craik, D.J. The Cyclic Cystine Ladder in θ -Defensins Is Important for Structure and Stability, but Not Antibacterial Activity. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 10830–10840, doi:10.1074/jbc.M113.451047.
55. Braffman, N.R.; Piscotta, F.J.; Hauver, J.; Campbell, E.A.; Link, A.J.; Darst, S.A. Structural Mechanism of Transcription Inhibition by Lasso Peptides Microcin J25 and Capistruin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 1273–1278, doi:10.1073/pnas.1817352116.
56. Edwards, I.A.; Elliott, A.G.; Kavanagh, A.M.; Zuegg, J.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 442–450, doi:10.1021/acsinfecdis.6b00045.
57. Conibear, A.C.; Rosengren, K.J.; Harvey, P.J.; Craik, D.J. Structural Characterization of the Cyclic Cystine Ladder Motif of θ -Defensins. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9718–9726, doi:10.1021/bi301363a.
58. Falanga, A.; Nigro, E.; De Biasi, M.; Daniele, A.; Morelli, G.; Galdiero, S.; Scudiero, O. Cyclic Peptides as Novel Therapeutic Microbicides: Engineering of Human Defensin Mimetics. *Molecules* **2017**, *22*, 1217, doi:10.3390/molecules22071217.
59. Wang, W.; Cole, A.M.; Hong, T.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I. Retrocyclin, an Antiretroviral θ -Defensin, Is a Lectin. *The Journal of Immunology* **2003**, *170*, 4708–4716, doi:10.4049/jimmunol.170.9.4708.
60. Bontems, F.; Roumestand, C.; Gilquin, B.; Ménez, A.; Toma, F. Refined Structure of Charybdotoxin: Common Motifs in Scorpion Toxins and Insect Defensins. *Science* **1991**, *254*, 1521–1523, doi:10.1126/science.1720574.
61. Zhu, S.; Gao, B.; Tytgat, J. Phylogenetic Distribution, Functional Epitopes and Evolution of the CS $\alpha\beta$ Superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2257–2269, doi:10.1007/s00018-005-5200-6.
62. Dias, R.D.O.; Franco, O.L. Cysteine-Stabilized A β Defensins: From a Common Fold to Antibacterial Activity. *Peptides* **2015**, *72*, 64–72, doi:10.1016/j.peptides.2015.04.017.

63. Yang, Y.-F. Development and Engineering of CS $\alpha\beta$ Motif for Biomedical Application. In *Biomedical Science, Engineering and Technology*; Ghista, D.N., Ed.; InTech, 2012 ISBN 978-953-307-471-9.
64. Schneider, T.; Kruse, T.; Wimmer, R.; Wiedemann, I.; Sass, V.; Pag, U.; Jansen, A.; Nielsen, A.K.; Mygind, P.H.; Raventós, D.S.; et al. Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* **2010**, *328*, 1168–1172, doi:10.1126/science.1185723.
65. Zhu, S. Discovery of Six Families of Fungal Defensin-like Peptides Provides Insights into Origin and Evolution of the CS $\alpha\beta$ Defensins. *Molecular Immunology* **2008**, *45*, 828–838, doi:10.1016/j.molimm.2007.06.354.
66. Harmouche, N.; Aisenbrey, C.; Porcelli, F.; Xia, Y.; Nelson, S.E.D.; Chen, X.; Raya, J.; Vermeer, L.; Aparicio, C.; Veglia, G.; et al. Solution and Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Structural Investigations of the Antimicrobial Designer Peptide GL13K in Membranes. *Biochemistry* **2017**, *56*, 4269–4278, doi:10.1021/acs.biochem.7b00526.
67. Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 582779, doi:10.3389/fmicb.2020.582779.
68. Seyfi, R.; Kahaki, F.A.; Ebrahimi, T.; Montazersaheb, S.; Eyvazi, S.; Babaeipour, V.; Tarhriz, V. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *Int J Pept Res Ther* **2020**, *26*, 1451–1463, doi:10.1007/s10989-019-09946-9.
69. Hazam, P.K.; Goyal, R.; Ramakrishnan, V. Peptide Based Antimicrobials: Design Strategies and Therapeutic Potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2019**, *142*, 10–22, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.006.
70. Sato, H.; Feix, J.B. Peptide–Membrane Interactions and Mechanisms of Membrane Destruction by Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 1245–1256, doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.021.
71. Ma, X.; Wang, Q.; Ren, K.; Xu, T.; Zhang, Z.; Xu, M.; Rao, Z.; Zhang, X. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. *Fermentation* **2024**, *10*, 540, doi:10.3390/fermentation10110540.
72. Kapil, S.; Sharma, V. D -Amino Acids in Antimicrobial Peptides: A Potential Approach to Treat and Combat Antimicrobial Resistance. *Can. J. Microbiol.* **2021**, *67*, 119–137, doi:10.1139/cjm-2020-0142.
73. Wu, Y.; He, K.; Ludtke, S.J.; Huang, H.W. X-Ray Diffraction Study of Lipid Bilayer Membranes Interacting with Amphiphilic Helical Peptides: Diphytanoyl Phosphatidylcholine with Alamethicin at Low Concentrations. *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 2361–2369, doi:10.1016/S0006-3495(95)80418-2.
74. Brogden, K.A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 238–250, doi:10.1038/nrmicro1098.
75. Sengupta, D.; Leontiadou, H.; Mark, A.E.; Marrink, S.-J. Toroidal Pores Formed by Antimicrobial Peptides Show Significant Disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 2308–2317, doi:10.1016/j.bbamem.2008.06.007.
76. Yoneyama, F.; Imura, Y.; Ohno, K.; Zendo, T.; Nakayama, J.; Matsuzaki, K.; Sonomoto, K. Peptide-Lipid Huge Toroidal Pore, a New Antimicrobial Mechanism Mediated by a Lactococcal Bacteriocin, Lacticin Q. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 3211–3217, doi:10.1128/AAC.00209-09.

77. Gazit, E.; Boman, A.; Boman, H.G.; Shai, Y. Interaction of the Mammalian Antibacterial Peptide Cecropin P1 with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11479–11488, doi:10.1021/bi00036a021.
78. Wimley, W.C.; Hristova, K. Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. *J Membrane Biol* **2011**, *239*, 27–34, doi:10.1007/s00232-011-9343-0.
79. Bechinger, B.; Gorr, S.-U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res* **2017**, *96*, 254–260, doi:10.1177/0022034516679973.
80. Joo, H.-S.; Fu, C.-I.; Otto, M. Bacterial Strategies of Resistance to Antimicrobial Peptides. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2016**, *371*, 20150292, doi:10.1098/rstb.2015.0292.
81. Maria-Neto, S.; de Almeida, K.C.; Macedo, M.L.R.; Franco, O.L. Understanding Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides: From the Surface to Deep Inside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 3078–3088, doi:10.1016/j.bbamem.2015.02.017.
82. Ridyard, K.E.; Overhage, J. The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent. *Antibiotics* **2021**, *10*, 650, doi:10.3390/antibiotics10060650.
83. Assoni, L.; Milani, B.; Carvalho, M.R.; Nepomuceno, L.N.; Waz, N.T.; Guerra, M.E.S.; Converso, T.R.; Darrieux, M. Resistance Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 593215, doi:10.3389/fmicb.2020.593215.
84. Li, J.; Koh, J.-J.; Liu, S.; Lakshminarayanan, R.; Verma, C.S.; Beuerman, R.W. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, doi:10.3389/fnins.2017.00073.
85. Andersson, D.I.; Hughes, D.; Kubicek-Sutherland, J.Z. Mechanisms and Consequences of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Drug Resistance Updates* **2016**, *26*, 43–57, doi:10.1016/j.drug.2016.04.002.
86. Ebenhan, T.; Gheysens, O.; Kruger, H.G.; Zeevaart, J.R.; Sathekge, M.M. Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1–15, doi:10.1155/2014/867381.
87. Park, S.-C.; Park, Y.; Hahm, K.-S. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *IJMS* **2011**, *12*, 5971–5992, doi:10.3390/ijms12095971.
88. Luo, Y.; Song, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *IJMS* **2021**, *22*, 11401, doi:10.3390/ijms222111401.
89. Elmore, D.E. Insights into Buforin II Membrane Translocation from Molecular Dynamics Simulations. *Peptides* **2012**, *38*, 357–362, doi:10.1016/j.peptides.2012.09.022.
90. Elmore, D.E. Insights into Buforin II Membrane Translocation from Molecular Dynamics Simulations. *Peptides* **2012**, *38*, 357–362, doi:10.1016/j.peptides.2012.09.022.
91. Frimodt-Møller, J.; Campion, C.; Nielsen, P.E.; Løbner-Olesen, A. Translocation of Non-Lytic Antimicrobial Peptides and Bacteria Penetrating Peptides across the Inner Membrane of the Bacterial Envelope. *Curr Genet* **2022**, *68*, 83–90, doi:10.1007/s00294-021-01217-9.

92. Le, C.-F.; Fang, C.-M.; Sekaran, S.D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e02340-16, doi:10.1128/AAC.02340-16.
93. Ghosh, A.; Kar, R.K.; Jana, J.; Saha, A.; Jana, B.; Krishnamoorthy, J.; Kumar, D.; Ghosh, S.; Chatterjee, S.; Bhunia, A. Indolicidin Targets Duplex DNA: Structural and Mechanistic Insight through a Combination of Spectroscopy and Microscopy. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2052–2058, doi:10.1002/cmdc.201402215.
94. Cardoso, M.H.; Meneguetti, B.T.; Costa, B.O.; Buccini, D.F.; Oshiro, K.G.N.; Preza, S.L.E.; Carvalho, C.M.E.; Migliolo, L.; Franco, O.L. Non-Lytic Antibacterial Peptides That Translocate Through Bacterial Membranes to Act on Intracellular Targets. *IJMS* **2019**, *20*, 4877, doi:10.3390/ijms20194877.
95. Li, X.; Zuo, S.; Wang, B.; Zhang, K.; Wang, Y. Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules* **2022**, *27*, 2675, doi:10.3390/molecules27092675.
96. Marchand, C.; Krajewski, K.; Lee, H.-F.; Antony, S.; Johnson, A.A.; Amin, R.; Roller, P.; Kvaratskhelia, M.; Pommier, Y. Covalent Binding of the Natural Antimicrobial Peptide Indolicidin to DNA Abasic Sites. *Nucleic Acids Research* **2006**, *34*, 5157–5165, doi:10.1093/nar/gkl667.
97. Braffman, N.R.; Piscotta, F.J.; Hauver, J.; Campbell, E.A.; Link, A.J.; Darst, S.A. Structural Mechanism of Transcription Inhibition by Lasso Peptides Microcin J25 and Capistruin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 1273–1278, doi:10.1073/pnas.1817352116.
98. Yang, H.; Fu, J.; Zhao, Y.; Shi, H.; Hu, H.; Wang, H. Escherichia Coli PagP Enzyme-Based De Novo Design and In Vitro Activity of Antibacterial Peptide LL-37. *Med Sci Monit* **2017**, *23*, 2558–2564, doi:10.12659/MSM.902095.
99. Le, C.-F.; Fang, C.-M.; Sekaran, S.D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61*, e02340-16, doi:10.1128/AAC.02340-16.
100. Otvos, L.; O, I.; Rogers, M.E.; Consolvo, P.J.; Condie, B.A.; Lovas, S.; Bulet, P.; Blaszczyk-Thurin, M. Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14150–14159, doi:10.1021/bi0012843.
101. Di Somma, A.; Avitabile, C.; Cirillo, A.; Moretta, A.; Merlino, A.; Paduano, L.; Duilio, A.; Romanelli, A. The Antimicrobial Peptide Temporin L Impairs E. Coli Cell Division by Interacting with FtsZ and the Divisome Complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2020**, *1864*, 129606, doi:10.1016/j.bbagen.2020.129606.
102. Di Somma, A.; Canè, C.; Moretta, A.; Duilio, A. Interaction of Temporin-L Analogues with the E. Coli FtsZ Protein. *Antibiotics* **2021**, *10*, 704, doi:10.3390/antibiotics10060704.
103. Yadavalli, S.S.; Carey, J.N.; Leibman, R.S.; Chen, A.I.; Stern, A.M.; Roggiani, M.; Lippa, A.M.; Goulian, M. Antimicrobial Peptides Trigger a Division Block in Escherichia Coli through Stimulation of a Signalling System. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12340, doi:10.1038/ncomms12340.
104. Malanovic, N.; Lohner, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 59, doi:10.3390/ph9030059.
105. Neelay, O.P.; Peterson, C.A.; Snavely, M.E.; Brown, T.C.; TecleMariam, A.F.; Campbell, J.A.; Blake, A.M.; Schneider, S.C.; Cremeens, M.E. Antimicrobial

- Peptides Interact with Peptidoglycan. *Journal of Molecular Structure* **2017**, *1146*, 329–336, doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.018.
106. Münch, D.; Sahl, H.-G. Structural Variations of the Cell Wall Precursor Lipid II in Gram-Positive Bacteria — Impact on Binding and Efficacy of Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 3062–3071, doi:10.1016/j.bbamem.2015.04.014.
 107. Band, V.; Weiss, D. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2014**, *4*, 18–41, doi:10.3390/antibiotics4010018.
 108. Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 539, doi:10.3389/fmicb.2019.00539.
 109. Shrestha, L.; Fan, H.-M.; Tao, H.-R.; Huang, J.-D. Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches. *Pathogens* **2022**, *11*, 292, doi:10.3390/pathogens11030292.
 110. Luo, Y.; Song, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *IJMS* **2021**, *22*, 11401, doi:10.3390/ijms222111401.
 111. Okuda, K.; Zendo, T.; Sugimoto, S.; Iwase, T.; Tajima, A.; Yamada, S.; Sonomoto, K.; Mizunoe, Y. Effects of Bacteriocins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 5572–5579, doi:10.1128/AAC.00888-13.
 112. Overhage, J.; Campisano, A.; Bains, M.; Torfs, E.C.W.; Rehm, B.H.A.; Hancock, R.E.W. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infect Immun* **2008**, *76*, 4176–4182, doi:10.1128/IAI.00318-08.
 113. Brancatisano, F.L.; Maisetta, G.; Di Luca, M.; Esin, S.; Bottai, D.; Bizzarri, R.; Campa, M.; Batoni, G. Inhibitory Effect of the Human Liver-Derived Antimicrobial Peptide Hepcidin 20 on Biofilms of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA)-Positive and PIA-Negative Strains of *Staphylococcus Epidermidis*. *Biofouling* **2014**, *30*, 435–446, doi:10.1080/08927014.2014.888062.
 114. Wolz, C.; Geiger, T.; Goerke, C. The Synthesis and Function of the Alarmone (p)ppGpp in Firmicutes. *International Journal of Medical Microbiology* **2010**, *300*, 142–147, doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.017.
 115. De La Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Haney, E.F.; Straus, S.K.; Hancock, R.E.W. Broad-Spectrum Anti-Biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. *PLoS Pathog* **2014**, *10*, e1004152, doi:10.1371/journal.ppat.1004152.
 116. Dowhan, W. MOLECULAR BASIS FOR MEMBRANE PHOSPHOLIPID DIVERSITY: Why Are There So Many Lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199–232, doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.199.
 117. Sohlenkamp, C.; Geiger, O. Bacterial Membrane Lipids: Diversity in Structures and Pathways. *FEMS Microbiology Reviews* **2016**, *40*, 133–159, doi:10.1093/femsre/fuv008.
 118. Montigny, C.; Lyons, J.; Champeil, P.; Nissen, P.; Lenoir, G. On the Molecular Mechanism of Flippase- and Scramblase-Mediated Phospholipid Transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2016**, *1861*, 767–783, doi:10.1016/j.bbalip.2015.12.020.
 119. Zachowski, A. Phospholipids in Animal Eukaryotic Membranes: Transverse Asymmetry and Movement. *Biochemical Journal* **1993**, *294*, 1–14, doi:10.1042/bj2940001.

120. Greco, I.; Molchanova, N.; Holmedal, E.; Jenssen, H.; Hummel, B.D.; Watts, J.L.; Håkansson, J.; Hansen, P.R.; Svenson, J. Correlation between Hemolytic Activity, Cytotoxicity and Systemic in Vivo Toxicity of Synthetic Antimicrobial Peptides. *Sci Rep* **2020**, *10*, 13206, doi:10.1038/s41598-020-69995-9.
121. Andoh, Y.; Kitou, S.; Okazaki, S. Difference in Molecular Mechanisms Governing Changes in Membrane Properties of Phospholipid Bilayers Induced by Addition of Nonionic and Zwitterionic Surfactants. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *271*, 933–941, doi:10.1016/j.molliq.2018.09.018.
122. Lopez, D. Molecular Composition of Functional Microdomains in Bacterial Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**, *192*, 3–11, doi:10.1016/j.chemphyslip.2015.08.015.
123. Radek, K.; Gallo, R. Antimicrobial Peptides: Natural Effectors of the Innate Immune System. *Semin Immunopathol* **2007**, *29*, 27–43, doi:10.1007/s00281-007-0064-5.
124. Kumar, S.; Ingle, H.; Prasad, D.V.R.; Kumar, H. Recognition of Bacterial Infection by Innate Immune Sensors. *Critical Reviews in Microbiology* **2013**, *39*, 229–246, doi:10.3109/1040841X.2012.706249.
125. Opal, S.M. Endotoxins and Other Sepsis Triggers. In *Contributions to Nephrology*; Ronco, C., Piccinni, P., Rosner, M.H., Eds.; S. Karger AG, 2010; Vol. 167, pp. 14–24 ISBN 978-3-8055-9484-4.
126. Caroff, M.; Karibian, D.; Cavaillon, J.-M.; Haeffner-Cavaillon, N. Structural and Functional Analyses of Bacterial Lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* **2002**, *4*, 915–926, doi:10.1016/S1286-4579(02)01612-X.
127. Raetz, C.R.H.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635–700, doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
128. Lu, Y.-C.; Yeh, W.-C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145–151, doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006.
129. Pfalzgraff, A.; Brandenburg, K.; Weindl, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 281, doi:10.3389/fphar.2018.00281.
130. Umnyakova, E.S.; Gorbunov, N.P.; Zhakhov, A.V.; Krenev, I.A.; Ovchinnikova, T.V.; Kokryakov, V.N.; Berlov, M.N. Modulation of Human Complement System by Antimicrobial Peptide Arenicin-1 from *Arenicola Marina*. *Marine Drugs* **2018**, *16*, 480, doi:10.3390/md16120480.
131. Dürr, M.; Peschel, A. Chemokines Meet Defensins: The Merging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. *Infect Immun* **2002**, *70*, 6515–6517, doi:10.1128/IAI.70.12.6515-6517.2002.
132. Nagaoka, I.; Tamura, H.; Reich, J. Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model. *IJMS* **2020**, *21*, 5973, doi:10.3390/ijms21175973.
133. Pulido, D.; Nogués, M.V.; Boix, E.; Torrent, M. Lipopolysaccharide Neutralization by Antimicrobial Peptides: A Gambit in the Innate Host Defense Strategy. *J Innate Immun* **2012**, *4*, 327–336, doi:10.1159/000336713.
134. Martin, L.; Van Meegern, A.; Doemming, S.; Schuerholz, T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00404.
135. Van Harten, R.M.; Van Woudenberg, E.; Van Dijk, A.; Haagsman, H.P. Cathelicidins: Immunomodulatory Antimicrobials. *Vaccines* **2018**, *6*, 63, doi:10.3390/vaccines6030063.

136. Li, L.-H.; Ju, T.-C.; Hsieh, C.-Y.; Dong, W.-C.; Chen, W.-T.; Hua, K.-F.; Chen, W.-J. A Synthetic Cationic Antimicrobial Peptide Inhibits Inflammatory Response and the NLRP3 Inflammasome by Neutralizing LPS and ATP. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182057, doi:10.1371/journal.pone.0182057.
137. Mangoni, M.L.; Epand, R.F.; Rosenfeld, Y.; Peleg, A.; Barra, D.; Epand, R.M.; Shai, Y. Lipopolysaccharide, a Key Molecule Involved in the Synergism between Temporins in Inhibiting Bacterial Growth and in Endotoxin Neutralization. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 22907–22917, doi:10.1074/jbc.M800495200.
138. Srivastava, S.; Ghosh, J.K. Introduction of a Lysine Residue Promotes Aggregation of Temporin L in Lipopolysaccharides and Augmentation of Its Antiendotoxin Property. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57*, 2457–2466, doi:10.1128/AAC.00169-13.
139. Moretta, A.; Scieuzo, C.; Petrone, A.M.; Salvia, R.; Manniello, M.D.; Franco, A.; Lucchetti, D.; Vassallo, A.; Vogel, H.; Sgambato, A.; et al. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front Cell Infect Microbiol* **2021**, *11*, 668632, doi:10.3389/fcimb.2021.668632.
140. Fu, J.; Zong, X.; Jin, M.; Min, J.; Wang, F.; Wang, Y. Mechanisms and Regulation of Defensins in Host Defense. *Signal Transduct Target Ther* **2023**, *8*, 300, doi:10.1038/s41392-023-01553-x.
141. Harwig, S.S.; Park, A.S.; Lehrer, R.I. Characterization of Defensin Precursors in Mature Human Neutrophils. *Blood* **1992**, *79*, 1532–1537.
142. Valore, E.V.; Ganz, T. Posttranslational Processing of Defensins in Immature Human Myeloid Cells. *Blood* **1992**, *79*, 1538–1544.
143. Ghosh, D.; Porter, E.; Shen, B.; Lee, S.K.; Wilk, D.; Drazba, J.; Yadav, S.P.; Crabb, J.W.; Ganz, T.; Bevins, C.L. Paneth Cell Trypsin Is the Processing Enzyme for Human Defensin-5. *Nat Immunol* **2002**, *3*, 583–590, doi:10.1038/ni797.
144. Tongaonkar, P.; Selsted, M.E. SDF2L1, a Component of the Endoplasmic Reticulum Chaperone Complex, Differentially Interacts with α -, β -, and θ -Defensin Propeptides. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 5602–5609, doi:10.1074/jbc.M806664200.
145. Kelly, C.J.; Glover, L.E.; Campbell, E.L.; Kominsky, D.J.; Ehrentraut, S.F.; Bowers, B.E.; Bayless, A.J.; Saeedi, B.J.; Colgan, S.P. Fundamental Role for HIF-1 α in Constitutive Expression of Human β Defensin-1. *Mucosal Immunology* **2013**, *6*, 1110–1118, doi:10.1038/mi.2013.6.
146. Tollner, T.L.; Bevins, C.L.; Cherr, G.N. Multifunctional Glycoprotein DEFB126—a Curious Story of Defensin-Clad Spermatozoa. *Nat Rev Urol* **2012**, *9*, 365–375, doi:10.1038/nrurol.2012.109.
147. Zhu, S. Did Cathelicidins, a Family of Multifunctional Host-Defense Peptides, Arise from a Cysteine Protease Inhibitor? *Trends in Microbiology* **2008**, *16*, 353–360, doi:10.1016/j.tim.2008.05.007.
148. Zaïou, M.; Nizet, V.; Gallo, R.L. Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence. *Journal of Investigative Dermatology* **2003**, *120*, 810–816, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12132.x.
149. Hsieh, C.-S.; deRoos, P.; Honey, K.; Beers, C.; Rudensky, A.Y. A Role for Cathepsin L and Cathepsin S in Peptide Generation for MHC Class II Presentation. *The Journal of Immunology* **2002**, *168*, 2618–2625, doi:10.4049/jimmunol.168.6.2618.

150. Pazgier, M.; Ericksen, B.; Ling, M.; Toth, E.; Shi, J.; Li, X.; Galliher-Beckley, A.; Lan, L.; Zou, G.; Zhan, C.; et al. Structural and Functional Analysis of the Pro-Domain of Human Cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* **2013**, *52*, 1547–1558, doi:10.1021/bi301008r.
151. Zhu, S.; Wei, L.; Yamasaki, K.; Gallo, R.L. Activation of Cathepsin L by the Cathelin-like Domain of Protegrin-3. *Molecular Immunology* **2008**, *45*, 2531–2536, doi:10.1016/j.molimm.2008.01.007.
152. Tossi, A.; Gerdol, M.; Caporale, A.; Pacor, S.; Mardirossian, M.; Scocchi, M.; Prickett, M.D.; Manzini, G.; Gennaro, R. Cathelicidins—a Rich Seam of Antimicrobial Peptides Waiting for Exploitation. *Front. Drug Discov.* **2024**, *4*, 1458057, doi:10.3389/fddsv.2024.1458057.
153. Alford, M.A.; Baquir, B.; Santana, F.L.; Haney, E.F.; Hancock, R.E.W. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1902, doi:10.3389/fmicb.2020.01902.
154. Van Der Does, A.M.; Bergman, P.; Agerberth, B.; Lindbom, L. Induction of the Human Cathelicidin LL-37 as a Novel Treatment against Bacterial Infections. *Journal of Leukocyte Biology* **2012**, *92*, 735–742, doi:10.1189/jlb.0412178.
155. Shi, J.; Ganz, T. The Role of Protegrins and Other Elastase-Activated Polypeptides in the Bactericidal Properties of Porcine Inflammatory Fluids. *Infect Immun* **1998**, *66*, 3611–3617, doi:10.1128/IAI.66.8.3611-3617.1998.
156. Sørensen, O.E.; Follin, P.; Johnsen, A.H.; Calafat, J.; Tjabringa, G.S.; Hiemstra, P.S.; Borregaard, N. Human Cathelicidin, hCAP-18, Is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3. *Blood* **2001**, *97*, 3951–3959, doi:10.1182/blood.V97.12.3951.
157. Yamasaki, K.; Schaubert, J.; Coda, A.; Lin, H.; Dorschner, R.A.; Schechter, N.M.; Bonnard, C.; Descargues, P.; Hovnanian, A.; Gallo, R.L. Kallikrein-mediated Proteolysis Regulates the Antimicrobial Effects of Cathelicidins in Skin. *The FASEB Journal* **2006**, *20*, 2068–2080, doi:10.1096/fj.06-6075com.
158. Bulet, P.; Stöcklin, R.; Menin, L. Anti-microbial Peptides: From Invertebrates to Vertebrates. *Immunological Reviews* **2004**, *198*, 169–184, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x.
159. Shigenaga, T.; Muta, T.; Toh, Y.; Tokunaga, F.; Iwanaga, S. Antimicrobial Tachyplesin Peptide Precursor. cDNA Cloning and Cellular Localization in the Horseshoe Crab (*Tachypleus Tridentatus*). *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 21350–21354, doi:10.1016/S0021-9258(17)45367-1.
160. Casteels-Josson, K.; Capaci, T.; Casteels, P.; Tempst, P. Apidaecin Multi-peptide Precursor Structure: A Putative Mechanism for Amplification of the Insect Antibacterial Response. *The EMBO Journal* **1993**, *12*, 1569–1578, doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05801.x.
161. Destoumieux, D.; Bulet, P.; Loew, D.; Van Dorsselaer, A.; Rodriguez, J.; Bachère, E. Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus Vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 28398–28406, doi:10.1074/jbc.272.45.28398.
162. Fu, P.; Wu, J.; Guo, G. Purification and Molecular Identification of an Antifungal Peptide from the Hemolymph of *Musca Domestica* (Housefly). *Cell Mol Immunol* **2009**, *6*, 245–251, doi:10.1038/cmi.2009.33.
163. Kim, I.-W.; Lee, J.H.; Subramaniam, S.; Yun, E.-Y.; Kim, I.; Park, J.; Hwang, J.S. De Novo Transcriptome Analysis and Detection of Antimicrobial Peptides of the

- American Cockroach *Periplaneta Americana* (Linnaeus). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155304, doi:10.1371/journal.pone.0155304.
164. King, J.G. Developmental and Comparative Perspectives on Mosquito Immunity. *Developmental & Comparative Immunology* **2020**, *103*, 103458, doi:10.1016/j.dci.2019.103458.
 165. Lemaitre, B.; Hoffmann, J. The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 697–743, doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615.
 166. Bulet, P.; Stocklin, R. Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. *PPL* **2005**, *12*, 3–11, doi:10.2174/0929866053406011.
 167. Uvell, H.; Engström, Y. A Multilayered Defense against Infection: Combinatorial Control of Insect Immune Genes. *Trends in Genetics* **2007**, *23*, 342–349, doi:10.1016/j.tig.2007.05.003.
 168. Lamberty, M.; Zachary, D.; Lanot, R.; Bordereau, C.; Robert, A.; Hoffmann, J.A.; Bulet, P. Insect Immunity. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 4085–4092, doi:10.1074/jbc.M002998200.
 169. Lee, S.; Siddiqui, R.; Khan, N.A. Animals Living in Polluted Environments Are Potential Source of Antimicrobials against Infectious Agents. *Pathogens and Global Health* **2012**, *106*, 218–223, doi:10.1179/2047773212Y.0000000033.
 170. Zhou, L.; Meng, G.; Zhu, L.; Ma, L.; Chen, K. Insect Antimicrobial Peptides as Guardians of Immunity and Beyond: A Review. *IJMS* **2024**, *25*, 3835, doi:10.3390/ijms25073835.
 171. Aguzzi, A.; O'Connor, T. Protein Aggregation Diseases: Pathogenicity and Therapeutic Perspectives. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 237–248, doi:10.1038/nrd3050.
 172. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27–68, doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
 173. Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis. *Nature* **2011**, *475*, 324–332, doi:10.1038/nature10317.
 174. Kim, Y.E.; Hipp, M.S.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M.; Ulrich Hartl, F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 323–355, doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
 175. Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurter, D.; Buchner, J. Some like It Hot: The Structure and Function of Small Heat-Shock Proteins. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, *12*, 842–846, doi:10.1038/nsmb993.
 176. Leppert, A.; Poska, H.; Landreh, M.; Abelein, A.; Chen, G.; Johansson, J. A New Kid in the Folding Funnel: Molecular Chaperone Activities of the BRICHOS Domain. *Protein Science* **2023**, *32*, e4645, doi:10.1002/pro.4645.
 177. Beers, M.F.; Kim, C.Y.; Dodia, C.; Fisher, A.B. Localization, Synthesis, and Processing of Surfactant Protein SP-C in Rat Lung Analyzed by Epitope-Specific Antipeptide Antibodies. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 20318–20328.
 178. Martin, L.; Fluhrer, R.; Reiss, K.; Kremmer, E.; Saftig, P.; Haass, C. Regulated Intramembrane Proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 1644–1652, doi:10.1074/jbc.M706661200.
 179. Chen, G.; Abelein, A.; Nilsson, H.E.; Leppert, A.; Andrade-Talavera, Y.; Tambaro, S.; Hemmingsson, L.; Roshan, F.; Landreh, M.; Biverstål, H.; et al. Bri2 BRICHOS

- Client Specificity and Chaperone Activity Are Governed by Assembly State. *Nat Commun* **2017**, 8, 2081, doi:10.1038/s41467-017-02056-4.
180. Ahmad, W.; Zhao, T.; He, K.; Luo, S.-Z. Exploring the Role of British Dementia Protein-2 (Bri2) and Its BRICHOS Domain in Neurodegenerative Disorders. *Supramolecular Materials* **2024**, 3, 100050, doi:10.1016/j.supmat.2023.100050.
 181. Tigro, H.; Kronqvist, N.; Abelein, A.; Galan-Acosta, L.; Chen, G.; Landreh, M.; Lyashkov, A.; Aon, M.A.; Ferrucci, L.; Shimmo, R.; et al. The Synthesis and Characterization of Bri2 BRICHOS Coated Magnetic Particles and Their Application to Protein Fishing: Identification of Novel Binding Proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2021**, 198, 113996, doi:10.1016/j.jpba.2021.113996.
 182. Hedlund, J.; Johansson, J.; Persson, B. BRICHOS - a Superfamily of Multidomain Proteins with Diverse Functions. *BMC Res Notes* **2009**, 2, 180, doi:10.1186/1756-0500-2-180.
 183. Sánchez-Pulido, L.; Devos, D.; Valencia, A. BRICHOS: A Conserved Domain in Proteins Associated with Dementia, Respiratory Distress and Cancer. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, 27, 329–332, doi:10.1016/S0968-0004(02)02134-5.
 184. Gustafsson, M.; Thyberg, J.; Näslund, J.; Eliasson, E.; Johansson, J. Amyloid Fibril Formation by Pulmonary Surfactant Protein C. *FEBS Letters* **1999**, 464, 138–142, doi:10.1016/S0014-5793(99)01692-0.
 185. Szyperski, T.; Wüthrich, K.; Vandenbussche, G.; Ruyschaert, J.; Curstedt, T.; Johansson, J. Pulmonary Surfactant-associated Polypeptide C in a Mixed Organic Solvent Transforms from a Monomeric A-helical State into Insoluble B-sheet Aggregates. *Protein Science* **1998**, 7, 2533–2540, doi:10.1002/pro.5560071206.
 186. Gustafsson, M.; Thyberg, J.; Näslund, J.; Eliasson, E.; Johansson, J. Amyloid Fibril Formation by Pulmonary Surfactant Protein C. *FEBS Letters* **1999**, 464, 138–142, doi:10.1016/S0014-5793(99)01692-0.
 187. Sáenz, A.; Presto, J.; Lara, P.; Akinyi-Oloo, L.; García-Fojeda, B.; Nilsson, I.; Johansson, J.; Casals, C. Folding and Intramembraneous BRICHOS Binding of the Prosurfactant Protein C Transmembrane Segment. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290, 17628–17641, doi:10.1074/jbc.M114.630343.
 188. Chen, G.; Andrade-Talavera, Y.; Tambaro, S.; Leppert, A.; Nilsson, H.E.; Zhong, X.; Landreh, M.; Nilsson, P.; Hebert, H.; Biverstål, H.; et al. Augmentation of Bri2 Molecular Chaperone Activity against Amyloid- β Reduces Neurotoxicity in Mouse Hippocampus in Vitro. *Commun Biol* **2020**, 3, 32, doi:10.1038/s42003-020-0757-z.
 189. Chen, G.; Andrade-Talavera, Y.; Zhong, X.; Hassan, S.; Biverstål, H.; Poska, H.; Abelein, A.; Leppert, A.; Kronqvist, N.; Rising, A.; et al. Abilities of the BRICHOS Domain to Prevent Neurotoxicity and Fibril Formation Are Dependent on a Highly Conserved Asp Residue. *RSC Chem. Biol.* **2022**, 3, 1342–1358, doi:10.1039/D2CB00187J.
 190. Chen, G.; Andrade-Talavera, Y.; Zhong, X.; Hassan, S.; Biverstål, H.; Poska, H.; Abelein, A.; Leppert, A.; Kronqvist, N.; Rising, A.; et al. Abilities of the BRICHOS Domain to Prevent Neurotoxicity and Fibril Formation Are Dependent on a Highly Conserved Asp Residue. *RSC Chem. Biol.* **2022**, 3, 1342–1358, doi:10.1039/D2CB00187J.
 191. Chen, G.; Abelein, A.; Nilsson, H.E.; Leppert, A.; Andrade-Talavera, Y.; Tambaro, S.; Hemmingsson, L.; Roshan, F.; Landreh, M.; Biverstål, H.; et al. Bri2 BRICHOS

- Client Specificity and Chaperone Activity Are Governed by Assembly State. *Nat Commun* **2017**, 8, 2081, doi:10.1038/s41467-017-02056-4.
192. Chen, G.; Leppert, A.; Poska, H.; Nilsson, H.E.; Alvira, C.P.; Zhong, X.; Koeck, P.; Jegerschöld, C.; Abelein, A.; Hebert, H.; et al. Short Hydrophobic Loop Motifs in BRICHOS Domains Determine Chaperone Activity against Amorphous Protein Aggregation but Not against Amyloid Formation. *Commun Biol* **2023**, 6, 497, doi:10.1038/s42003-023-04883-2.
 193. Poska, H.; Leppert, A.; Tigro, H.; Zhong, X.; Kaldmäe, M.; Nilsson, H.E.; Hebert, H.; Chen, G.; Johansson, J. Recombinant Bri3 BRICHOS Domain Is a Molecular Chaperone with Effect against Amyloid Formation and Non-Fibrillar Protein Aggregation. *Sci Rep* **2020**, 10, 9817, doi:10.1038/s41598-020-66718-y.
 194. Willander, H.; Askarieh, G.; Landreh, M.; Westermarck, P.; Nordling, K.; Keränen, H.; Hermansson, E.; Hamvas, A.; Nogee, L.M.; Bergman, T.; et al. High-Resolution Structure of a BRICHOS Domain and Its Implications for Anti-Amyloid Chaperone Activity on Lung Surfactant Protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109, 2325–2329, doi:10.1073/pnas.1114740109.
 195. Johansson, J.; Curstedt, T. Synthetic Surfactants with SP -B and SP -C Analogues to Enable Worldwide Treatment of Neonatal Respiratory Distress Syndrome and Other Lung Diseases. *J Intern Med* **2019**, 285, 165–186, doi:10.1111/joim.12845.
 196. Martins, F.; Marafona, A.M.; Pereira, C.D.; Müller, T.; Loosse, C.; Kolbe, K.; Da Cruz E Silva, O.A.B.; Rebelo, S. Identification and Characterization of the BRI2 Interactome in the Brain. *Sci Rep* **2018**, 8, 3548, doi:10.1038/s41598-018-21453-3.
 197. Tasiemski, A.; Jung, S.; Boidin-Wichlacz, C.; Jollivet, D.; Cuvillier-Hot, V.; Pradillon, F.; Vetriani, C.; Hecht, O.; Sönnichsen, F.D.; Gelhaus, C.; et al. Characterization and Function of the First Antibiotic Isolated from a Vent Organism: The Extremophile Metazoan *Alvinella Pompejana*. *PLoS ONE* **2014**, 9, e95737, doi:10.1371/journal.pone.0095737.
 198. Salzet, M.; Tasiemski, A.; Cooper, E. Innate Immunity in Lophotrochozoans: The Annelids. *CPD* **2006**, 12, 3043–3050, doi:10.2174/138161206777947551.
 199. Ovchinnikova, T.V.; Aleshina, G.M.; Balandin, S.V.; Krasnodembskaya, A.D.; Markelov, M.L.; Frolova, E.I.; Leonova, Y.F.; Tagaev, A.A.; Krasnodembsky, E.G.; Kokryakov, V.N. Purification and Primary Structure of Two Isoforms of Arenicin, a Novel Antimicrobial Peptide from Marine Polychaeta *Arenicola Marina*. *FEBS Letters* **2004**, 577, 209–214, doi:10.1016/j.febslet.2004.10.012.
 200. Maltseva, A.L.; Kotenko, O.N.; Kokryakov, V.N.; Starunov, V.V.; Krasnodembskaya, A.D. Expression Pattern of Arenicins—the Antimicrobial Peptides of Polychaete *Arenicola Marina*. *Front. Physiol.* **2014**, 5, doi:10.3389/fphys.2014.00497.
 201. Ovchinnikova, T.V.; Shenkarev, Z.O.; Nadezhdin, K.D.; Balandin, S.V.; Zhmak, M.N.; Kudelina, I.A.; Finkina, E.I.; Kokryakov, V.N.; Arseniev, A.S. Recombinant Expression, Synthesis, Purification, and Solution Structure of Arenicin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 360, 156–162, doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.029.
 202. Ovchinnikova, T.V.; Shenkarev, Z.O.; Balandin, S.V.; Nadezhdin, K.D.; Paramonov, A.S.; Kokryakov, V.N.; Arseniev, A.S. Molecular Insight into Mechanism of Antimicrobial Action of the B-hairpin Peptide Arenicin: Specific Oligomerization in Detergent Micelles. *Biopolymers* **2008**, 89, 455–464, doi:10.1002/bip.20865.

203. Shenkarev, Z.O.; Balandin, S.V.; Trunov, K.I.; Paramonov, A.S.; Sukhanov, S.V.; Barsukov, L.I.; Arseniev, A.S.; Ovchinnikova, T.V. Molecular Mechanism of Action of β -Hairpin Antimicrobial Peptide Arenicin: Oligomeric Structure in Dodecylphosphocholine Micelles and Pore Formation in Planar Lipid Bilayers. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6255–6265, doi:10.1021/bi200746t.
204. Panteleev, P.V.; Myshkin, M.Yu.; Shenkarev, Z.O.; Ovchinnikova, T.V. Dimerization of the Antimicrobial Peptide Arenicin Plays a Key Role in the Cytotoxicity but Not in the Antibacterial Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *482*, 1320–1326, doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.035.
205. Andrä, J.; Jakovkin, I.; Grötzinger, J.; Hecht, O.; Krasnosdembaskaya, A.D.; Goldmann, T.; Gutschmann, T.; Leippe, M. Structure and Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Arenicin. *Biochemical Journal* **2008**, *410*, 113–122, doi:10.1042/BJ20071051.
206. Cho, J.; Lee, D.G. The Antimicrobial Peptide Arenicin-1 Promotes Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of Apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2011**, *1810*, 1246–1251, doi:10.1016/j.bbagen.2011.08.011.
207. Panteleev, P.V.; Bolosov, I.A.; Balandin, S.V.; Ovchinnikova, T.V. Design of Antimicrobial Peptide Arenicin Analogs with Improved Therapeutic Indices: DESIGN OF ARENICIN ANALOGS WITH IMPROVED THERAPEUTIC INDICES. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 105–113, doi:10.1002/psc.2732.
208. Panteleev, P.V.; Bolosov, I.A.; Ovchinnikova, T.V. Bioengineering and Functional Characterization of Arenicin Shortened Analogs with Enhanced Antibacterial Activity and Cell Selectivity. *Journal of Peptide Science* **2016**, *22*, 82–91, doi:10.1002/psc.2843.
209. Casanova, M.; Maresca, M.; Poncin, I.; Point, V.; Olleik, H.; Boidin-Wichlacz, C.; Tasiemski, A.; Mabrouk, K.; Cavalier, J.-F.; Canaan, S. Promising Antibacterial Efficacy of Arenicin Peptides against the Emerging Opportunistic Pathogen *Mycobacterium Abscessus*. *J Biomed Sci* **2024**, *31*, 18, doi:10.1186/s12929-024-01007-8.
210. Lee, Ju-Un; Park, Ka-Hyon; Lee, Jee-Young; Kim, Jin-Kyoung; Shin, Song Yub; Park, Yoonkyung; Hahm, Kyung-Soo; 김양미 Cell Selectivity of Arenicin-1 and Its Derivative with Two Disulfide Bonds. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2008**, *29*, 1190–1194, doi:10.5012/BKCS.2008.29.6.1190.
211. Andrä, J.; Hammer, M.U.; Grötzinger, J.; Jakovkin, I.; Lindner, B.; Vollmer, E.; Fedders, H.; Leippe, M.; Gutschmann, T. Significance of the Cyclic Structure and of Arginine Residues for the Antibacterial Activity of Arenicin-1 and Its Interaction with Phospholipid and Lipopolysaccharide Model Membranes. *bchm* **2009**, *390*, 337–349, doi:10.1515/BC.2009.039.
212. Edwards, I.A.; Elliott, A.G.; Kavanagh, A.M.; Zuegg, J.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of β -Hairpin Peptides. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 442–450, doi:10.1021/acsinfecdis.6b00045.
213. Elliott, A.G.; Huang, J.X.; Neve, S.; Zuegg, J.; Edwards, I.A.; Cain, A.K.; Boinett, C.J.; Barquist, L.; Lundberg, C.V.; Steen, J.; et al. An Amphipathic Peptide with Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3184, doi:10.1038/s41467-020-16950-x.

214. Edwards, I.A.; Henriques, S.T.; Blaskovich, M.A.T.; Elliott, A.G.; Cooper, M.A. Investigations into the Membrane Activity of Arenicin Antimicrobial Peptide AA139. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2022**, *1866*, 130156, doi:10.1016/j.bbagen.2022.130156.
215. Desbruyères, D.; Chevaldonné, P.; Alayse, A.-M.; Jollivet, D.; Lallier, F.H.; Jouin-Toulmond, C.; Zal, F.; Sarradin, P.-M.; Cosson, R.; Caprais, J.-C.; et al. Biology and Ecology of the “Pompeii Worm” (*Alvinella Pompejana* Desbruyères and Laubier), a Normal Dweller of an Extreme Deep-Sea Environment: A Synthesis of Current Knowledge and Recent Developments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **1998**, *45*, 383–422, doi:10.1016/S0967-0645(97)00083-0.
216. Cary, S.C.; Cottrell, M.T.; Stein, J.L.; Camacho, F.; Desbruyeres, D. Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella Pompejana*. *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 1124–1130, doi:10.1128/aem.63.3.1124-1130.1997.
217. Grzymalski, J.J.; Murray, A.E.; Campbell, B.J.; Kaplarevic, M.; Gao, G.R.; Lee, C.; Daniel, R.; Ghadiri, A.; Feldman, R.A.; Cary, S.C. Metagenome Analysis of an Extreme Microbial Symbiosis Reveals Eurythermal Adaptation and Metabolic Flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17516–17521, doi:10.1073/pnas.0802782105.
218. Papot, C.; Massol, F.; Jollivet, D.; Tasiemski, A. Antagonistic Evolution of an Antibiotic and Its Molecular Chaperone: How to Maintain a Vital Ectosymbiosis in a Highly Fluctuating Habitat. *Sci Rep* **2017**, *7*, 1454, doi:10.1038/s41598-017-01626-2.
219. Panteleev, P.; Tsarev, A.; Bolosov, I.; Paramonov, A.; Marggraf, M.; Sychev, S.; Shenkarev, Z.; Ovchinnikova, T. Novel Antimicrobial Peptides from the Arctic Polychaeta *Nicomache Minor* Provide New Molecular Insight into Biological Role of the BRICHOS Domain. *Marine Drugs* **2018**, *16*, 401, doi:10.3390/md16110401.
220. Bruno, R.; Boidin-Wichlacz, C.; Melnyk, O.; Zeppilli, D.; Landon, C.; Thomas, F.; Cambon, M.-A.; Lafond, M.; Mabrouk, K.; Massol, F.; et al. The Diversification of the Antimicrobial Peptides from Marine Worms Is Driven by Environmental Conditions. *Science of The Total Environment* **2023**, *879*, 162875, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162875.
221. Yeung, A.T.Y.; Gellatly, S.L.; Hancock, R.E.W. Multifunctional Cationic Host Defence Peptides and Their Clinical Applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2161–2176, doi:10.1007/s00018-011-0710-x.
222. Srivastava, S.; Dashora, K.; Ameta, K.L.; Singh, N.P.; El-Enshasy, H.A.; Pagano, M.C.; Hesham, A.E.; Sharma, G.D.; Sharma, M.; Bhargava, A. Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Plants: The Future of Antimicrobial Therapy. *Phytotherapy Research* **2021**, *35*, 256–277, doi:10.1002/ptr.6823.
223. Dijksteel, G.S.; Ulrich, M.M.W.; Middelkoop, E.; Boekema, B.K.H.L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 616979, doi:10.3389/fmicb.2021.616979.
224. Divyashree, M.; Mani, M.K.; Reddy, D.; Kumavath, R.; Ghosh, P.; Azevedo, V.; Barh, D. Clinical Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): Where Do We Stand Now? *PPL* **2020**, *27*, 120–134, doi:10.2174/0929866526666190925152957.
225. Browne, K.; Chakraborty, S.; Chen, R.; Willcox, M.D.; Black, D.S.; Walsh, W.R.; Kumar, N. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *IJMS* **2020**, *21*, 7047, doi:10.3390/ijms21197047.

226. Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A.L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M.A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A.L.; et al. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *The Lancet Infectious Diseases* **2020**, *20*, e216–e230, doi:10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
227. Erdem Büyükkiraz, M.; Kesmen, Z. Antimicrobial Peptides (AMPs): A Promising Class of Antimicrobial Compounds. *J of Applied Microbiology* **2022**, *132*, 1573–1596, doi:10.1111/jam.15314.
228. Mercer, D.K.; O'Neil, D.A. Innate Inspiration: Antifungal Peptides and Other Immunotherapeutics From the Host Immune Response. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2177, doi:10.3389/fimmu.2020.02177.
229. Mookherjee, N.; Anderson, M.A.; Haagsman, H.P.; Davidson, D.J. Antimicrobial Host Defence Peptides: Functions and Clinical Potential. *Nat Rev Drug Discov* **2020**, *19*, 311–332, doi:10.1038/s41573-019-0058-8.
230. Jiang, Y.; Chen, Y.; Song, Z.; Tan, Z.; Cheng, J. Recent Advances in Design of Antimicrobial Peptides and Polypeptides toward Clinical Translation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *170*, 261–280, doi:10.1016/j.addr.2020.12.016.
231. Lesiuk, M.; Paduszyńska, M.; Greber, K.E. Synthetic Antimicrobial Immunomodulatory Peptides: Ongoing Studies and Clinical Trials. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1062, doi:10.3390/antibiotics11081062.
232. Moretta, A.; Scieuzo, C.; Petrone, A.M.; Salvia, R.; Manniello, M.D.; Franco, A.; Lucchetti, D.; Vassallo, A.; Vogel, H.; Sgambato, A.; et al. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 668632, doi:10.3389/fcimb.2021.668632.
233. Aloush, V.; Navon-Venezia, S.; Seigman-Igra, Y.; Cabili, S.; Carmeli, Y. Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* : Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 43–48, doi:10.1128/AAC.50.1.43-48.2006.
234. Porcelli, F.; Buck-Koehntop, B.A.; Thennarasu, S.; Ramamoorthy, A.; Veglia, G. Structures of the Dimeric and Monomeric Variants of Magainin Antimicrobial Peptides (MSI-78 and MSI-594) in Micelles and Bilayers, Determined by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5793–5799, doi:10.1021/bi0601813.
235. Law Whyte, L.; David, G.; Rothery, B. Organisms. In *The Universe of Experience*; Routledge, 2017; pp. 63–74 ISBN 978-1-351-30228-9.
236. Gottler, L.M.; Ramamoorthy, A. Structure, Membrane Orientation, Mechanism, and Function of Pexiganan — A Highly Potent Antimicrobial Peptide Designed from Magainin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, *1788*, 1680–1686, doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.009.
237. E. Greber, K.; Dawgul, M. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *CTMC* **2016**, *17*, 620–628, doi:10.2174/1568026616666160713143331.
238. Bhattacharjya, S.; Mohid, S.A.; Bhunia, A. Atomic-Resolution Structures and Mode of Action of Clinically Relevant Antimicrobial Peptides. *IJMS* **2022**, *23*, 4558, doi:10.3390/ijms23094558.
239. Dijksteel, G.S.; Ulrich, M.M.W.; Middelkoop, E.; Boekema, B.K.H.L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front Microbiol* **2021**, *12*, 616979, doi:10.3389/fmicb.2021.616979.
240. Cresti, L.; Cappello, G.; Pini, A. Antimicrobial Peptides towards Clinical Application-A Long History to Be Concluded. *Int J Mol Sci* **2024**, *25*, 4870, doi:10.3390/ijms25094870.

241. Toney, J.H. Isegran (IntraBiotics Pharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs* **2002**, *3*, 225–228.
242. Mosca, D.A.; Hurst, M.A.; So, W.; Viajar, B.S.C.; Fujii, C.A.; Falla, T.J. IB-367, a Protegrin Peptide with In Vitro and In Vivo Activities against the Microflora Associated with Oral Mucositis. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, *44*, 1803–1808, doi:10.1128/AAC.44.7.1803-1808.2000.
243. Kollef, M.; Pittet, D.; Sánchez García, M.; Chastre, J.; Fagon, J.-Y.; Bonten, M.; Hyzy, R.; Fleming, T.R.; Fuchs, H.; Bellm, L.; et al. A Randomized Double-Blind Trial of Isegran in Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**, *173*, 91–97, doi:10.1164/rccm.200504-656OC.
244. Donnelly, J.P.; Bellm, L.A.; Epstein, J.B.; Sonis, S.T.; Symonds, R.P. Antimicrobial Therapy to Prevent or Treat Oral Mucositis. *The Lancet Infectious Diseases* **2003**, *3*, 405–412, doi:10.1016/S1473-3099(03)00668-6.
245. Boakes, S.; Appleyard, A.N.; Cortés, J.; Dawson, M.J. Organization of the Biosynthetic Genes Encoding Deoxyactagardine B (DAB), a New Lantibiotic Produced by *Actinoplanes Liguriae* NCIMB41362. *J Antibiot* **2010**, *63*, 351–358, doi:10.1038/ja.2010.48.
246. Kong, Q.; Yang, Y. Recent Advances in Antibacterial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *35*, 127799, doi:10.1016/j.bmcl.2021.127799.
247. Sader, H.S.; Dale, G.E.; Rhomberg, P.R.; Flamm, R.K. Antimicrobial Activity of Murepavadin Tested against Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* from the United States, Europe, and China. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62*, e00311-18, doi:10.1128/AAC.00311-18.
248. Sader, H.S.; Flamm, R.K.; Dale, G.E.; Rhomberg, P.R.; Castanheira, M. Murepavadin Activity Tested against Contemporary (2016–17) Clinical Isolates of XDR *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2018**, *73*, 2400–2404, doi:10.1093/jac/dky227.
249. Martin-Loeches, I.; Dale, G.E.; Torres, A. Murepavadin: A New Antibiotic Class in the Pipeline. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2018**, *16*, 259–268, doi:10.1080/14787210.2018.1441024.
250. Srinivas, N.; Jetter, P.; Ueberbacher, B.J.; Werneburg, M.; Zerbe, K.; Steinmann, J.; Van der Meijden, B.; Bernardini, F.; Lederer, A.; Dias, R.L.A.; et al. Peptidomimetic Antibiotics Target Outer-Membrane Biogenesis in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Science* **2010**, *327*, 1010–1013, doi:10.1126/science.1182749.
251. Romano, K.P.; Warrier, T.; Poulsen, B.E.; Nguyen, P.H.; Loftis, A.R.; Saebi, A.; Pentelute, B.L.; Hung, D.T. *Mutations in pmrB Confer Cross-Resistance to the LptD Inhibitor POL7080 and Colistin in Pseudomonas Aeruginosa*; Microbiology, 2019;
252. Prasad, N.K.; Seiple, I.B.; Cirz, R.T.; Rosenberg, O.S. Leaks in the Pipeline: A Failure Analysis of Gram-Negative Antibiotic Development from 2010 to 2020. *Antimicrob Agents Chemother* **2022**, *66*, e00054-22, doi:10.1128/aac.00054-22.
253. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, *399*, 629–655, doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
254. Bernardini, F.; Dale, G.E.; Wach, A.; Obrecht, D. WS01-4 Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Murepavadin (POL7080) in Neutropenic Lung Infection Models When Evaluated by Aerosol Administration. *Journal of Cystic Fibrosis* **2019**, *18*, S2, doi:10.1016/S1569-1993(19)30120-1.

255. Heimann, D.; Kohnhäuser, D.; Kohnhäuser, A.J.; Brönstrup, M. Antibacterials with Novel Chemical Scaffolds in Clinical Development. *Drugs* **2025**, *85*, 293–323, doi:10.1007/s40265-024-02137-x.
256. Tsai, H.; Bobek, L.A. Human Salivary Histatin-5 Exerts Potent Fungicidal Activity against *Cryptococcus Neoformans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1997**, *1336*, 367–369, doi:10.1016/S0304-4165(97)00076-7.
257. Tsai, H.; Bobek, L.A. Studies of the Mechanism of Human Salivary Histatin-5 Candidacidal Activity with Histatin-5 Variants and Azole-Sensitive and -Resistant *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, *41*, 2224–2228, doi:10.1128/AAC.41.10.2224.
258. Li, X.S.; Reddy, M.S.; Baev, D.; Edgerton, M. *Candida Albicans* Ssa1/2p Is the Cell Envelope Binding Protein for Human Salivary Histatin 5. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 28553–28561, doi:10.1074/jbc.M300680200.
259. Jang, W.S.; Li, X.S.; Sun, J.N.; Edgerton, M. The P-113 Fragment of Histatin 5 Requires a Specific Peptide Sequence for Intracellular Translocation in *Candida Albicans*, Which Is Independent of Cell Wall Binding. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, *52*, 497–504, doi:10.1128/AAC.01199-07.
260. Cheng, K.-T.; Wu, C.-L.; Yip, B.-S.; Chih, Y.-H.; Peng, K.-L.; Hsu, S.-Y.; Yu, H.-Y.; Cheng, J.-W. The Interactions between the Antimicrobial Peptide P-113 and Living *Candida Albicans* Cells Shed Light on Mechanisms of Antifungal Activity and Resistance. *IJMS* **2020**, *21*, 2654, doi:10.3390/ijms21072654.
261. Mercer, D.K.; Robertson, J.C.; Miller, L.; Stewart, C.S.; O’Neil, D.A. NP213 (Novexatin®): A Unique Therapy Candidate for Onychomycosis with a Differentiated Safety and Efficacy Profile. *Medical Mycology* **2020**, *58*, 1064–1072, doi:10.1093/mmy/myaa015.
262. Mensa, B.; Howell, G.L.; Scott, R.; DeGrado, W.F. Comparative Mechanistic Studies of Brilacidin, Daptomycin, and the Antimicrobial Peptide LL16. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58*, 5136–5145, doi:10.1128/AAC.02955-14.
263. Isaksson, J.; Brandsdal, B.O.; Engqvist, M.; Flaten, G.E.; Svendsen, J.S.M.; Stensen, W. A Synthetic Antimicrobial Peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical Impact on Membrane Disruption. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5786–5795, doi:10.1021/jm200450h.
264. Kowalski, R.P.; Romanowski, E.G.; Yates, K.A.; Mah, F.S. An Independent Evaluation of a Novel Peptide Mimetic, Brilacidin (PMX30063), for Ocular Anti-Infective. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **2016**, *32*, 23–27, doi:10.1089/jop.2015.0098.
265. Tew, G.N.; Liu, D.; Chen, B.; Doerksen, R.J.; Kaplan, J.; Carroll, P.J.; Klein, M.L.; DeGrado, W.F. *De Novo* Design of Biomimetic Antimicrobial Polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5110–5114, doi:10.1073/pnas.082046199.
266. Saravolatz, L.D.; Pawlak, J.; Johnson, L.; Bonilla, H.; Saravolatz, L.D.; Fakih, M.G.; Fugelli, A.; Olsen, W.M. *In Vitro* Activities of LTX-109, a Synthetic Antimicrobial Peptide, against Methicillin-Resistant, Vancomycin-Intermediate, Vancomycin-Resistant, Daptomycin-Nonsusceptible, and Linezolid-Nonsusceptible *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56*, 4478–4482, doi:10.1128/AAC.00194-12.
267. Saravolatz, L.D.; Pawlak, J.; Martin, H.; Saravolatz, S.; Johnson, L.; Wold, H.; Husbyn, M.; Olsen, W.M. Postantibiotic Effect and Postantibiotic Sub-MIC Effect of

- LTX-109 and Mupirocin on *Staphylococcus Aureus* Blood Isolates. *Lett Appl Microbiol* **2017**, *65*, 410–413, doi:10.1111/lam.12792.
268. Bojsen, R.; Torbensen, R.; Larsen, C.E.; Folkesson, A.; Regenber, B. The Synthetic Amphipathic Peptidomimetic LTX109 Is a Potent Fungicide That Disturbs Plasma Membrane Integrity in a Sphingolipid Dependent Manner. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69483, doi:10.1371/journal.pone.0069483.
 269. Bojsen, R.; Torbensen, R.; Larsen, C.E.; Folkesson, A.; Regenber, B. The Synthetic Amphipathic Peptidomimetic LTX109 Is a Potent Fungicide That Disturbs Plasma Membrane Integrity in a Sphingolipid Dependent Manner. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69483, doi:10.1371/journal.pone.0069483.
 270. Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, doi:10.3389/fcimb.2016.00194.
 271. Atefyekta, S.; Blomstrand, E.; Rajasekharan, A.K.; Svensson, S.; Trobos, M.; Hong, J.; Webster, T.J.; Thomsen, P.; Andersson, M. Antimicrobial Peptide-Functionalized Mesoporous Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1693–1702, doi:10.1021/acsbiomaterials.1c00029.
 272. Luong, H.X.; Thanh, T.T.; Tran, T.H. Antimicrobial Peptides – Advances in Development of Therapeutic Applications. *Life Sciences* **2020**, *260*, 118407, doi:10.1016/j.lfs.2020.118407.
 273. Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122–128, doi:10.1016/j.drudis.2014.10.003.
 274. Kosikowska, P.; Lesner, A. Antimicrobial Peptides (AMPs) as Drug Candidates: A Patent Review (2003–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2016**, *26*, 689–702, doi:10.1080/13543776.2016.1176149.
 275. Falanga, A.; Lombardi, L.; Franci, G.; Vitiello, M.; Iovene, M.; Morelli, G.; Galdiero, M.; Galdiero, S. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. *IJMS* **2016**, *17*, 785, doi:10.3390/ijms17050785.
 276. Arenas, I.; Villegas, E.; Walls, O.; Barrios, H.; Rodríguez, R.; Corzo, G. Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics. *Molecules* **2016**, *21*, 225, doi:10.3390/molecules21020225.
 277. da Cunha, N.B.; Cobacho, N.B.; Viana, J.F.C.; Lima, L.A.; Sampaio, K.B.O.; Dohms, S.S.M.; Ferreira, A.C.R.; de la Fuente-Núñez, C.; Costa, F.F.; Franco, O.L.; et al. The next Generation of Antimicrobial Peptides (AMPs) as Molecular Therapeutic Tools for the Treatment of Diseases with Social and Economic Impacts. *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 234–248, doi:10.1016/j.drudis.2016.10.017.
 278. Schiffter, H.A. The Delivery of Drugs – Peptides and Proteins. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, 2011; pp. 587–604 ISBN 978-0-08-088504-9.
 279. Aguirre, T.A.S.; Teijeiro-Osorio, D.; Rosa, M.; Coulter, I.S.; Alonso, M.J.; Brayden, D.J. Current Status of Selected Oral Peptide Technologies in Advanced Preclinical Development and in Clinical Trials. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *106*, 223–241, doi:10.1016/j.addr.2016.02.004.
 280. de la Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Mansour, S.C.; Reckseidler-Zenteno, S.L.; Hernández, D.; Brackman, G.; Coenye, T.; Hancock, R.E.W. D-Enantiomeric Peptides That Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect

- against Lethal *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Chemistry & Biology* **2015**, *22*, 196–205, doi:10.1016/j.chembiol.2015.01.002.
281. Han, Y.; Zhang, M.; Lai, R.; Zhang, Z. Chemical Modifications to Increase the Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides. *Peptides* **2021**, *146*, 170666, doi:10.1016/j.peptides.2021.170666.
 282. De La Fuente-Núñez, C.; Reffuveille, F.; Mansour, S.C.; Reckseidler-Zenteno, S.L.; Hernández, D.; Brackman, G.; Coenye, T.; Hancock, R.E.W. D-Enantiomeric Peptides That Eradicate Wild-Type and Multidrug-Resistant Biofilms and Protect against Lethal *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Chemistry & Biology* **2015**, *22*, 196–205, doi:10.1016/j.chembiol.2015.01.002.
 283. Boto, A.; Pérez de la Lastra, J.; González, C. The Road from Host-Defense Peptides to a New Generation of Antimicrobial Drugs. *Molecules* **2018**, *23*, 311, doi:10.3390/molecules23020311.
 284. Lavery, G.; Gorman, S.; Gilmore, B. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Escherichia Coli* Biofilm Formation. *Pathogens* **2014**, *3*, 596–632, doi:10.3390/pathogens3030596.
 285. Bacalum, M.; Radu, M. Cationic Antimicrobial Peptides Cytotoxicity on Mammalian Cells: An Analysis Using Therapeutic Index Integrative Concept. *Int J Pept Res Ther* **2015**, *21*, 47–55, doi:10.1007/s10989-014-9430-z.
 286. Falagas, M.; Kasiakou, S. [No Title Found]. *Crit Care* **2006**, *10*, R27, doi:10.1186/cc3995.
 287. Michalopoulos, A.S.; Tsiodras, S.; Rellos, K.; Mentzelopoulos, S.; Falagas, M.E. Colistin Treatment in Patients with ICU-Acquired Infections Caused by Multiresistant Gram-Negative Bacteria: The Renaissance of an Old Antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection* **2005**, *11*, 115–121, doi:10.1111/j.1469-0691.2004.01043.x.
 288. Marr, A.; Gooderham, W.; Hancock, R. Antibacterial Peptides for Therapeutic Use: Obstacles and Realistic Outlook. *Current Opinion in Pharmacology* **2006**, *6*, 468–472, doi:10.1016/j.coph.2006.04.006.
 289. Cao, J.; de la Fuente-Nunez, C.; Ou, R.W.; Torres, M.D.T.; Pande, S.G.; Sinskey, A.J.; Lu, T.K. Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 896–902, doi:10.1021/acssynbio.7b00396.
 290. Sinha, R.; Shukla, P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. *PPL* **2019**, *26*, 79–87, doi:10.2174/0929866525666181026160852.
 291. Gupta, S.K.; Shukla, P. Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production: A Review. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 419, doi:10.3389/fphar.2017.00419.
 292. Gaglione, R.; Pane, K.; Dell’Olmo, E.; Cafaro, V.; Pizzo, E.; Olivieri, G.; Notomista, E.; Arciello, A. Cost-Effective Production of Recombinant Peptides in *Escherichia Coli*. *New Biotechnology* **2019**, *51*, 39–48, doi:10.1016/j.nbt.2019.02.004.
 293. Aslanidis, C.; De Jong, P.J. Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-PCR). *Nucl Acids Res* **1990**, *18*, 6069–6074, doi:10.1093/nar/18.20.6069.
 294. Panteleev, P.V.; Pichkur, E.B.; Kruglikov, R.N.; Paleskava, A.; Shulenina, O.V.; Bolosov, I.A.; Bogdanov, I.V.; Safronova, V.N.; Balandin, S.V.; Marina, V.I.; et al. Rumicidins Are a Family of Mammalian Host-Defense Peptides Plugging the 70S

- Ribosome Exit Tunnel. *Nat Commun* **2024**, *15*, 8925, doi:10.1038/s41467-024-53309-y.
295. Abramson, J.; Adler, J.; Dunger, J.; Evans, R.; Green, T.; Pritzel, A.; Ronneberger, O.; Willmore, L.; Ballard, A.J.; Bambrick, J.; et al. Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3. *Nature* **2024**, *630*, 493–500, doi:10.1038/s41586-024-07487-w.
 296. Shi, Y.; Li, C.; Wang, M.; Chen, Z.; Luo, Y.; Xia, X.; Song, Y.; Sun, Y.; Zhang, A.-M. Cathelicidin-DM Is an Antimicrobial Peptide from *Duttaphrynus Melanostictus* and Has Wound-Healing Therapeutic Potential. *ACS Omega* **2020**, *5*, 9301–9310, doi:10.1021/acsomega.0c00189.
 297. Zhang, L.; Gallo, R.L. Antimicrobial Peptides. *Current Biology* **2016**, *26*, R14–R19, doi:10.1016/j.cub.2015.11.017.
 298. Ahmed, T.A.E.; Hammami, R. Recent Insights into Structure-Function Relationships of Antimicrobial Peptides. *J Food Biochem* **2019**, *43*, e12546, doi:10.1111/jfbc.12546.
 299. Deo, S.; Turton, K.L.; Kainth, T.; Kumar, A.; Wieden, H.-J. Strategies for Improving Antimicrobial Peptide Production. *Biotechnology Advances* **2022**, *59*, 107968, doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107968.
 300. Zhou, X.; Liu, Y.; Gao, Y.; Wang, Y.; Xia, Q.; Zhong, R.; Ma, C.; Zhou, M.; Xi, X.; Shaw, C.; et al. Enhanced Antimicrobial Activity of N-Terminal Derivatives of a Novel Brevinin-1 Peptide from The Skin Secretion of *Odorrana Schmackeri*. *Toxins* **2020**, *12*, 484, doi:10.3390/toxins12080484.
 301. Zhao, Y.; Wang, X.; Sun, Y.; Li, Z.; Liu, T.; Liu, Q.; Chen, J. Truncated Analog Brevinin2-CE-N26V5K: Revelation the Augmentation of Antimicrobial Activity. *World J Microbiol Biotechnol* **2022**, *38*, 162, doi:10.1007/s11274-022-03333-1.
 302. Bao, K.; Yuan, W.; Ma, C.; Yu, X.; Wang, L.; Hong, M.; Xi, X.; Zhou, M.; Chen, T. Modification Targeting the “Rana Box” Motif of a Novel Nigrocin Peptide From *Hylarana Latouchii* Enhances and Broadens Its Potency Against Multiple Bacteria. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2846, doi:10.3389/fmicb.2018.02846.
 303. Lekshmipriya, P.; Vineethkumar, T.V.; Joseph, J.; Asha, R.; Thomas, S.; George, S. Synergistic Effect of Frog Skin Antimicrobial Peptides in Combination with Antibiotics Against Multi Host Gram-Negative Pathogens. *Int J Pept Res Ther* **2021**, *27*, 1529–1540, doi:10.1007/s10989-021-10189-w.
 304. Chen, S.-P.; Chen, E.H.-L.; Yang, S.-Y.; Kuo, P.-S.; Jan, H.-M.; Yang, T.-C.; Hsieh, M.-Y.; Lee, K.-T.; Lin, C.-H.; Chen, R.P.-Y. A Systematic Study of the Stability, Safety, and Efficacy of the de Novo Designed Antimicrobial Peptide PepD2 and Its Modified Derivatives Against *Acinetobacter Baumannii*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 678330, doi:10.3389/fmicb.2021.678330.
 305. Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Escherichia Coli* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *J Appl Microbiol* **2016**, *121*, 309–319, doi:10.1111/jam.13078.
 306. Niranjana, V.; Malini, A. Antimicrobial Resistance Pattern in *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infection among Inpatients. *Indian J Med Res* **2014**, *139*, 945–948.
 307. Gastaldi Guerrieri, C.; Teixeira Gonçalves, M.; Ferreira Da Silva, A.; Souza Dos Santos, A.L.; Dos Santos, K.V.; Cruz Spano, L. Remarkable Antibiofilm Activity of Ciprofloxacin, Cefoxitin, and Tobramycin, by Themselves or in Combination, against

- Enterocoagulative Escherichia Coli in Vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2023**, *107*, 116048, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2023.116048.
308. Fasugba, O.; Gardner, A.; Mitchell, B.G.; Mnatzaganian, G. Ciprofloxacin Resistance in Community- and Hospital-Acquired Escherichia Coli Urinary Tract Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *BMC Infect Dis* **2015**, *15*, 545, doi:10.1186/s12879-015-1282-4.
 309. Nesse, L.L.; Osland, A.M.; Asal, B.; Mo, S.S. Evolution of Antimicrobial Resistance in E. Coli Biofilm Treated with High Doses of Ciprofloxacin. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1246895, doi:10.3389/fmicb.2023.1246895.
 310. Stanovova, M.V.; Gazizova, G.R.; Gorbushin, A.M. Transcriptomic Profiling of Immune-associated Molecules in the Coelomocytes of Lugworm *Arenicola Marina* (Linnaeus, 1758). *J Exp Zool Pt B* **2023**, *340*, 34–55, doi:10.1002/jez.b.23135.
 311. Slezina, M.P.; Odintsova, T.I. Plant Antimicrobial Peptides: Insights into Structure-Function Relationships for Practical Applications. *CIMB* **2023**, *45*, 3674–3704, doi:10.3390/cimb45040239.
 312. Bruno, R.; Maresca, M.; Canaan, S.; Cavalier, J.-F.; Mabrouk, K.; Boidin-Wichlacz, C.; Olleik, H.; Zeppilli, D.; Brodin, P.; Massol, F.; et al. Worms' Antimicrobial Peptides. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 512, doi:10.3390/md17090512.
 313. Eriksson, M.; Nielsen, P.E.; Good, L. Cell Permeabilization and Uptake of Antisense Peptide-Peptide Nucleic Acid (PNA) into Escherichia Coli. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 7144–7147, doi:10.1074/jbc.M106624200.
 314. Komp Lindgren, P.; Karlsson, Å.; Hughes, D. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia Coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, 3222–3232, doi:10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003.
 315. Hirakawa, H.; Kurushima, J.; Hashimoto, Y.; Tomita, H. Progress Overview of Bacterial Two-Component Regulatory Systems as Potential Targets for Antimicrobial Chemotherapy. *Antibiotics* **2020**, *9*, 635, doi:10.3390/antibiotics9100635.
 316. Klubthawee, N.; Adisakwattana, P.; Hanpithakpong, W.; Somsri, S.; Aunpad, R. A Novel, Rationally Designed, Hybrid Antimicrobial Peptide, Inspired by Cathelicidin and Aurein, Exhibits Membrane-Active Mechanisms against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sci Rep* **2020**, *10*, 9117, doi:10.1038/s41598-020-65688-5.
 317. Yazmin, J.; Saab-Rinco, G. Site-Directed Mutagenesis as Applied to Biocatalysts. In *Genetic Manipulation of DNA and Protein - Examples from Current Research*; Figurski, D., Ed.; InTech, 2013 ISBN 978-953-51-0994-5.
 318. Berdugo, E. High-Throughput Alanine Scanning: Epitope Mapping and Engineering Complex Membrane Proteins by Comprehensive Mutagenesis. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **2012**, *32*, 30–31, doi:10.1089/gen.32.12.12.
 319. Panteleev, P.V.; Ovchinnikova, T.V. Improved Strategy for Recombinant Production and Purification of Antimicrobial Peptide Tachyplesin I and Its Analogs with High Cell Selectivity: Recombinant Production of Tachyplesin I Analogs. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2017**, *64*, 35–42, doi:10.1002/bab.1456.
 320. Panteleev, P.V.; Myshkin, M.Yu.; Shenkarev, Z.O.; Ovchinnikova, T.V. Dimerization of the Antimicrobial Peptide Arenicin Plays a Key Role in the Cytotoxicity but Not in the Antibacterial Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *482*, 1320–1326, doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.035.
 321. Walsh, G.; Jefferis, R. Post-Translational Modifications in the Context of Therapeutic Proteins. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1241–1252, doi:10.1038/nbt1252.

322. Yin, L.M.; Edwards, M.A.; Li, J.; Yip, C.M.; Deber, C.M. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 7738–7745, doi:10.1074/jbc.M111.303602.
323. Raymann, K.; Coon, K.L.; Shaffer, Z.; Salisbury, S.; Moran, N.A. Pathogenicity of *Serratia Marcescens* Strains in Honey Bees. *mBio* **2018**, *9*, e01649-18, doi:10.1128/mBio.01649-18.
324. Nguyen, L.T.; Chau, J.K.; Perry, N.A.; De Boer, L.; Zaat, S.A.J.; Vogel, H.J. Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12684, doi:10.1371/journal.pone.0012684.
325. Wang, F.; Zhu, J.; Hu, L.; Qin, H.; Ye, M.; Zou, H. Comprehensive Analysis of the N and C Terminus of Endogenous Serum Peptides Reveals a Highly Conserved Cleavage Site Pattern Derived from Proteolytic Enzymes. *Protein Cell* **2012**, *3*, 669–674, doi:10.1007/s13238-012-2934-4.
326. Zhang, Q.-Y.; Yan, Z.-B.; Meng, Y.-M.; Hong, X.-Y.; Shao, G.; Ma, J.-J.; Cheng, X.-R.; Liu, J.; Kang, J.; Fu, C.-Y. Antimicrobial Peptides: Mechanism of Action, Activity and Clinical Potential. *Military Med Res* **2021**, *8*, 48, doi:10.1186/s40779-021-00343-2.
327. Kim, S.H.; Min, Y.-H.; Park, M.C. Antimicrobial Peptides: Current Status, Mechanisms of Action, and Strategies to Overcome Therapeutic Limitations. *Microorganisms* **2025**, *13*, 2574, doi:10.3390/microorganisms13112574.
328. Singh, S.; Singh, S.K.; Chowdhury, I.; Singh, R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *TOMICROJ* **2017**, *11*, 53–62, doi:10.2174/1874285801711010053.
329. Overhage, J.; Campisano, A.; Bains, M.; Torfs, E.C.W.; Rehm, B.H.A.; Hancock, R.E.W. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infect Immun* **2008**, *76*, 4176–4182, doi:10.1128/IAI.00318-08.
330. Linares, J.F.; Gustafsson, I.; Baquero, F.; Martinez, J.L. Antibiotics as Intermicrobial Signaling Agents Instead of Weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 19484–19489, doi:10.1073/pnas.0608949103.
331. Roberts, K.D.; Zhu, Y.; Azad, M.A.K.; Han, M.-L.; Wang, J.; Wang, L.; Yu, H.H.; Horne, A.S.; Pinson, J.-A.; Rudd, D.; et al. A Synthetic Lipopeptide Targeting Top-Priority Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1625, doi:10.1038/s41467-022-29234-3.
332. Yang, Z.; Choi, H.; Weisshaar, J.C. Melittin-Induced Permeabilization, Re-Sealing, and Re-Permeabilization of E. Coli Membranes. *Biophysical Journal* **2018**, *114*, 368–379, doi:10.1016/j.bpj.2017.10.046.
333. Yasir, M.; Dutta, D.; Willcox, M.D.P. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Mel4 Is Independent of Staphylococcus Aureus Cell Membrane Permeability. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215703, doi:10.1371/journal.pone.0215703.
334. Chui, J.K.W.; Fyles, T.M. Ionic Conductance of Synthetic Channels: Analysis, Lessons, and Recommendations. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 148–175, doi:10.1039/C1CS15099E.
335. Buttress, J.A.; Halte, M.; Te Winkel, J.D.; Erhardt, M.; Popp, P.F.; Strahl, H. A Guide for Membrane Potential Measurements in Gram-Negative Bacteria Using Voltage-Sensitive Dyes. *Microbiology* **2022**, *168*, doi:10.1099/mic.0.001227.

336. Te Winkel, J.D.; Gray, D.A.; Seistrup, K.H.; Hamoen, L.W.; Strahl, H. Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 29, doi:10.3389/fcell.2016.00029.
337. Dunkers, J.P.; Iyer, H.; Jones, B.; Camp, C.H.; Stranick, S.J.; Lin, N.J. Toward Absolute Viability Measurements for Bacteria. *Journal of Biophotonics* **2021**, *14*, e202100175, doi:10.1002/jbio.202100175.
338. Malinverni, J.C.; Silhavy, T.J. An ABC Transport System That Maintains Lipid Asymmetry in the Gram-Negative Outer Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 8009–8014, doi:10.1073/pnas.0903229106.
339. Sutterlin, H.A.; Shi, H.; May, K.L.; Miguel, A.; Khare, S.; Huang, K.C.; Silhavy, T.J. Disruption of Lipid Homeostasis in the Gram-Negative Cell Envelope Activates a Novel Cell Death Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, doi:10.1073/pnas.1601375113.
340. Yoon, Y.; Song, S. Structural Insights into the Lipopolysaccharide Transport (Lpt) System as a Novel Antibiotic Target. *J Microbiol.* **2024**, *62*, 261–275, doi:10.1007/s12275-024-00137-w.
341. Chng, S.-S.; Ruiz, N.; Chimalakonda, G.; Silhavy, T.J.; Kahne, D. Characterization of the Two-Protein Complex in *Escherichia Coli* Responsible for Lipopolysaccharide Assembly at the Outer Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 5363–5368, doi:10.1073/pnas.0912872107.
342. Vetterli, S.U.; Zerbe, K.; Müller, M.; Urfer, M.; Mondal, M.; Wang, S.-Y.; Moehle, K.; Zerbe, O.; Vitale, A.; Pessi, G.; et al. Thanatin Targets the Intermembrane Protein Complex Required for Lipopolysaccharide Transport in *Escherichia Coli*. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaau2634, doi:10.1126/sciadv.aau2634.
343. Huang, L.; Zhang, C. Microscale Thermophoresis (MST) to Detect the Interaction Between Purified Protein and Small Molecule. In *Plant Chemical Genomics*; Hicks, G.R., Zhang, C., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2021; Vol. 2213, pp. 187–193 ISBN 978-1-0716-0953-8.
344. El Deeb, S.; Al-Harrasi, A.; Khan, A.; Al-Broumi, M.; Al-Thani, G.; Alomairi, M.; Elumalai, P.; Sayed, R.A.; Ibrahim, A.E. Microscale Thermophoresis as a Powerful Growing Analytical Technique for the Investigation of Biomolecular Interaction and the Determination of Binding Parameters. *Methods Appl. Fluoresc.* **2022**, *10*, 042001, doi:10.1088/2050-6120/ac82a6.
345. Magnez, R.; Bailly, C.; Thuru, X. Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases. *IJMS* **2022**, *23*, 7672, doi:10.3390/ijms23147672.
346. Scheinpflug, K.; Nikolenko, H.; Komarov, I.; Rautenbach, M.; Dathe, M. What Goes around Comes Around-A Comparative Study of the Influence of Chemical Modifications on the Antimicrobial Properties of Small Cyclic Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1130–1144, doi:10.3390/ph6091130.
347. Hedegaard, S.F.; Derbas, M.S.; Lind, T.K.; Kasimova, M.R.; Christensen, M.V.; Michaelsen, M.H.; Campbell, R.A.; Jorgensen, L.; Franzyk, H.; Cárdenas, M.; et al. Fluorophore Labeling of a Cell-Penetrating Peptide Significantly Alters the Mode and Degree of Biomembrane Interaction. *Sci Rep* **2018**, *8*, 6327, doi:10.1038/s41598-018-24154-z.
348. Chimalakonda, G.; Ruiz, N.; Chng, S.-S.; Garner, R.A.; Kahne, D.; Silhavy, T.J. Lipoprotein LptE Is Required for the Assembly of LptD by the β -Barrel Assembly

- Machine in the Outer Membrane of *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 2492–2497, doi:10.1073/pnas.1019089108.
349. Drew, D.; Lerch, M.; Kunji, E.; Slotboom, D.-J.; De Gier, J.-W. Optimization of Membrane Protein Overexpression and Purification Using GFP Fusions. *Nat Methods* **2006**, *3*, 303–313, doi:10.1038/nmeth0406-303.
 350. Geertsma, E.R.; Groeneveld, M.; Slotboom, D.-J.; Poolman, B. Quality Control of Overexpressed Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 5722–5727, doi:10.1073/pnas.0802190105.
 351. Wang, Z.; Xiang, Q.; Wang, G.; Wang, H.; Zhang, Y. Optimizing Expression and Purification of an ATP-Binding Gene *gsiA* from *Escherichia Coli* k-12 by Using GFP Fusion. *Genet. Mol. Biol.* **2011**, *34*, 661–668, doi:10.1590/S1415-47572011005000043.
 352. Clifton, L.A.; Skoda, M.W.A.; Le Brun, A.P.; Ciesielski, F.; Kuzmenko, I.; Holt, S.A.; Lakey, J.H. Effect of Divalent Cation Removal on the Structure of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Models. *Langmuir* **2015**, *31*, 404–412, doi:10.1021/la504407v.
 353. Henninot, A.; Collins, J.C.; Nuss, J.M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1382–1414, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00318.