



УДК 577.112.6.017:577.18.03

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРА–АКТИВНОСТЬ В РЯДУ АНАЛОГОВ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДА ИНДОЛИЦИДИНА. I. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ С УВЕЛИЧЕННОЙ АМФИПАТИЧНОСТЬЮ И ПОВЫШЕННЫМ ОБЩИМ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ЗАРЯДОМ МОЛЕКУЛЫ

© 2004 г. М. П. Смирнова, В. Г. Афонин, В. М. Шпень, Ю. В. Тяготин, Н. И. Колодкин[#]

*ГосНИИ особо чистых биопрепаратов,
197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7*

Поступила в редакцию 14.07.2003 г. Принята к печати 15.04.2004 г.

Твердофазным методом синтезирован антибактериальный пептид индолицидин и ряд его аналогов. Предложен оптимизированный метод синтеза с использованием Вос-технологии. Показано, что в ряду синтезированных аналогов индолицидина усиление общего положительного заряда молекулы и увеличение амфипатичности сопровождается повышением терапевтического индекса, т.е. при сохранении антибактериальной активности гемолитическая активность в измеренных диапазонах концентраций практически отсутствует.

Ключевые слова: индолицидин, антибактериальные пептиды, взаимосвязь структура–активность, твердофазный синтез пептидов, триптофан, антимикробная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в медицинской практике все чаще стали наблюдаться случаи резистентности ряда патогенов к широко используемым классическим антибиотикам. Для лечения инфекций, вызванных такого рода патогенами, необходимы антибиотические средства нового поколения. К ним можно отнести, прежде всего, антибактериальные (антимикробные) генкодируемые пептиды, широко распространенные в различных организмах и являющиеся компонентой естественного иммунитета [1]. По сравнению с классическими антибиотиками они уничтожают микроорганизмы гораздо быстрее, а самое главное, развитие к ним резистентности, исходя из механизма действия [1], маловероятно.

Антибактериальные пептиды, многие из которых активны в отношении широкого ряда микроорганизмов, включая бактерии, дрожжи, грибы, простейшие и т.д. [2], были выделены из самых разнообразных организмов, начиная с бактерий и кончая млекопитающими.

Побочным эффектом действия антимикробных пептидов является их довольно высокая цитотоксическая активность в отношении нормальных клеток, например эритроцитов (гемолитическая активность), поэтому практический интерес пред-

ставляют антимикробные пептиды или их аналоги с высокой антимикробной активностью, имеющие низкую цитотоксическую активность в отношении здоровых эукариотических клеток [3].

Среди многочисленных антибактериальных пептидов привлекает особое внимание тридекапептид – индолицидин (Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂), впервые выделенный из цитоплазматических гранул бычьих нейтрофилов [4]. Это обусловлено в первую очередь широким спектром его биологической активности: он активен в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий и грибов [4–7], а также обладает ингибирующей активностью в отношении вируса иммунодефицита человека первого типа [8] и высокой гемолитической активностью [7]. Кроме того, индолицидин имеет уникальную химическую структуру. В его состав входят пять триптофановых остатков (в настоящее время не известны другие природные пептиды такой длины со столь высоким уровнем индолизации молекулы), три пролина и основные аминокислоты. Все эти аминокислоты, как известно, крайне важны для пептид-липидных взаимодействий, через которые реализуется начальная реакция пептида с микроорганизмом, и замена их в природной молекуле должна существенно изменять антибактериальную активность [9].

Целью настоящей работы было выявление структурных параметров молекулы индолицидина, влияющих на антибактериальную и гемолитичес-

Сокращения: Ind – индолицидин; Forp – формил; Mts – метилтенсульфонил.

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 230-49-53; эл. почта: Kolodkin@hpb.spb.ru).

кую составляющие его спектра активности с последующим получением соединений с селективной активностью, то есть обладающих высоким антимикробным и низким гемолитическим эффектами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение взаимосвязи структура–активность в ряду аналогов индолицидина позволило выявить следующие закономерности. Было обнаружено, что делеция C-концевого аргининамида ведет к снижению антибактериальной активности [8]. Кроме того, было показано, что аналоги, в которых все остатки пролина заменены на аланиновые или все остатки триптофана – на фенилаланиновые, имели антибактериальную активность, сравнимую с активностью исходного соединения [10]. Авторы пришли к достаточно спорному, с нашей точки зрения, выводу, что как пролин, так и триптофан не существенны для проявления молекулой антибактериальной активности.

Хэнкок и Фалла [6] получили аналог индолицидина с бóльшим, чем природная молекула, положительным зарядом и амфипатичностью (Ile-Leu-Lys-Lys-Trp-Pro-Trp-Pro-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂), который обладал повышенной антибактериальной активностью.

Лим и др. [11] описали восемь аналогов индолицидина. Среди них [Gly^{4,6}]Ind, [Ile^{6,8}]Ind, [Lys¹²]Ind и [Thr²,Tyr⁹]Ind показали повышенную антибактериальную активность. Их результаты подтверждают функциональную значимость пролинов и положительно заряженных аминокислотных остатков. Стаубитц и др. [12] синтезировали большую серию аналогов индолицидина, которая включала укороченные последовательности, точечные аланиновые замены, аналоги, в которых остатки триптофанов и пролинов были замещены на ароматические, гидрофобные, основные и кислые аминокислоты. Кроме того, были получены ретро- и инверсо-аналоги самого индолицидина и аналога, в которых все остатки триптофана были замещены на фенилаланин.

Антимикробная активность фенилаланинового аналога индолицидина была сходной с таковой для природной молекулы, однако гемолитичес-

кая активность была на порядок ниже. Интересно, что антимикробные активности как ретро-, так и инверсо- и ретроинверсо-аналогов индолицидина и [Phe^{4,6,8,9,11}]Ind были сравнимы с активностями исходных молекул. Этот факт в достаточной степени подтверждает независимость антимикробного эффекта пептида от наличия специфического рецептора или рецептороподобной молекулы, так как рецепторопосредованный механизм предполагает зависимость как от хиральности, так и от аминокислотной последовательности молекулы. Уменьшение же гемолитической активности полученных ретро-, инверсо- и ретроинверсо-аналогов может являться, по мнению авторов, результатом изменения общего дипольного момента молекулы, что существенно для клетки – эритроцита.

Антимикробная активность аналогов, в которых триптофан и аргинин (лизин) были замещены на кислые аминокислоты: аспарагиновую и глутаминовую [12], была гораздо ниже, чем у индолицидина, что, казалось бы, подтверждало решающий вклад общего положительного заряда молекулы в реализацию эффекта. Однако аналог с полным замещением триптофанов на лизины, имеющий высокий положительный заряд, был также не активен. То есть, сильно влияя на специфическую активность, общий положительный заряд молекулы является лишь одним из определяющих структурных факторов, необходимым для ее проявления.

Фредрич и др. [13] исследовали аналог индолицидина, в котором остатки пролинов замещены на остатки аланинов, обладающих способностью усиливать образование α-спиральных участков. Спектры КД аналога в водных растворах и трифторэтаноле свидетельствовали о наличии спиральных структур. Более того, при взаимодействии с липидами происходила дальнейшая индукция образования спиральной структуры.

Для оценки влияния амфипатичности на биологическую активность модифицированной молекулы природного пептида мы построили амфипатическую спираль Эдмундсона [14] индолицидина (**I**) (рис. 1) и для более полного разделения гидрофильной и гидрофобной частей спирали провели ряд замен гидрофобных аминокислот гид-

- Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**I**)
- Ile-Leu-Pro-Trp-Ala-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**II**)
- Ile-Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Ala-Arg-NH₂ (**III**)
- Ile-Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**IV**)
- Ile-Lys-Pro-Trp-Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**V**)
- Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Lys-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**VI**)
- Ile-Lys-Lys-Trp-Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Lys-Trp-Arg-Arg-NH₂ (**VII**)

Выделены основные аминокислотные остатки.

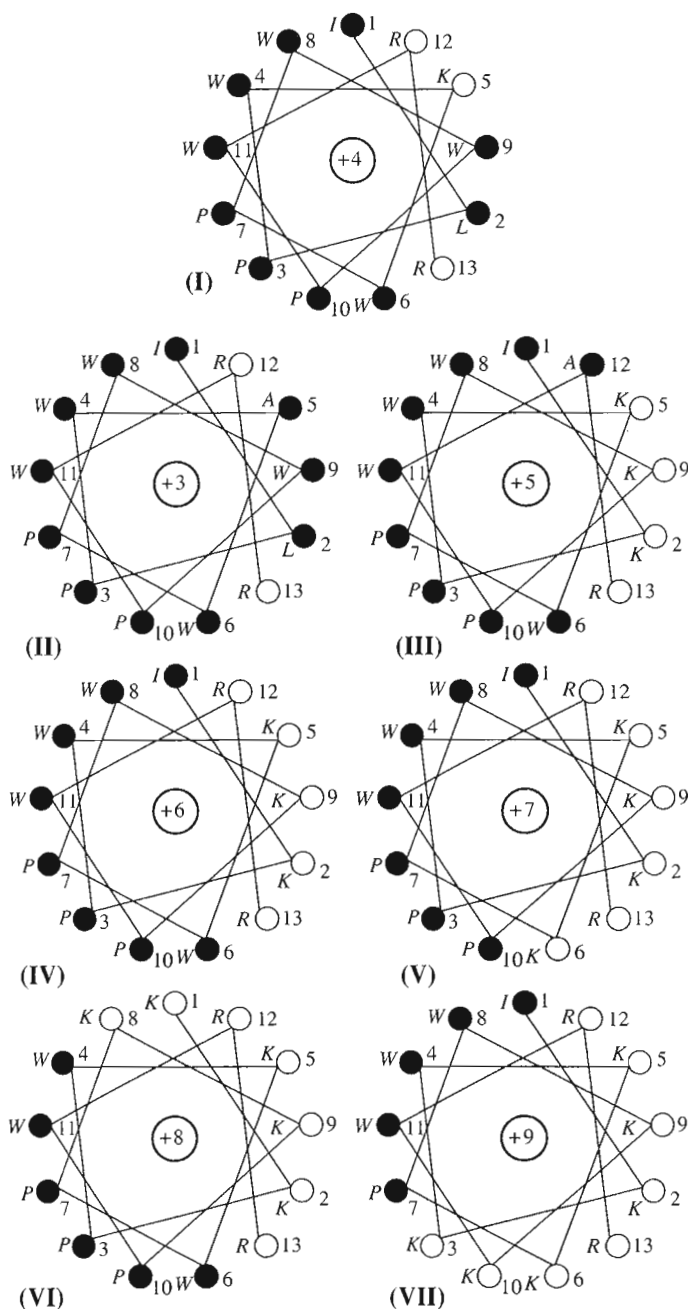


Рис. 1. Проекция амфипатических спиралей индолицидина (I) и его аналогов (II)–(VII). Темные и светлые кружки – соответственно гидрофобные и гидрофильные аминокислотные остатки. В центре показан общий положительный заряд молекулы.

рофильными. Учитывая, что, в соответствии с литературными данными [15], увеличение общего положительного заряда молекулы должно способствовать усилению антимикробных свойств, в качестве гидрофильной аминокислоты для модификации молекулы индолицидина была выбрана основная аминокислота – лизин (аналоги (III)–(VII)). Амфипатические спирали аналогов представлены на рис. 1. Для сравнения была построена также спираль аналога (II), в котором замена положительно

заряженной аминокислоты лизина в положении 5 на аланин наоборот приводила к снижению общего положительного заряда молекулы и, как видно из рис. 1, уменьшала ее амфипатичность.

Как сам индолицидин, так и все его аналоги, описанные в литературе, были синтезированы твердофазным методом [16], причем, как правило, использовалась Fmoc-технология [7, 10, 17]. При этом были найдены оптимальные условия синтеза и комбинации защитных группировок.

Ранее Андреу и Гарсиа разработали удобный способ получения индолицидина с помощью Вос-технологии, сделав в основном упор на оптимизацию условий конечного деблокирования [18]. Мы же, оптимизируя синтез индолицидина по Вос-технологии, уделили большее внимание оценке использования различных сочетаний защитных группировок трифункциональных аминокислот – триптофана и аргинина (табл. 1). Выбор направления исследования продиктован тем, что индольные кольца остатков триптофана (а их в молекуле 5) легко подвергаются нежелательным химическим превращениям, а для защитных групп гуанидиновой функции аргинина требуются достаточно жесткие кислые условия деблокирования.

Твердой матрицей служил метилбензгидриламинопolyмер, для временной защиты α -аминогрупп использовалась *трет*-бутилоксикарбонильная защита, ϵ -аминогруппа лизина была блокирована 2-хлорбензилоксикарбонильной группой (Cbz(Cl)).

Наращивание пептидной цепи осуществлялось либо на синтезаторе пептидов Applied Biosystems 430A, либо вручную с помощью оксипентотриазоловых эфиров и нейтрализацией *in situ* [19]. Полноту протекания реакции конденсации контролировали нингидриновым тестом, а в случае остатков пролина – бромфеноловым голубым. На стадии конечного удаления защитных группировок и отщепления пептида от смолы применялись безводный фтористый водород, метансульфо-кислота и различные комбинации скавенджеров.

Как оказалось, безводный фтористый водород и смесь скавенджеров, которая считается оптимальной для триптофансодержащих пептидов [18] (*m*-крезол–тиоанизол–этандитиол, 2 : 2 : 1), при использовании комбинации защит 1 и 4 дает гетерогенную смесь продуктов (рис. 2а, 2б), и выход целевого пептида – индолицидина оказался очень низким (около 5%).

По виду ВЭЖХ грубого продукта (рис. 2а) можно было предположить, что наряду с индолицидином в реакционной массе присутствует большое количество пептидов с “недоснятыми” защитными группировками либо продуктов с модифицированным триптофаном.

Для выяснения справедливости первого предположения было проведено отщепление “остаточных” защитных групп в более жестких условиях путем дополнительной обработки смеси метансульфо-кислотой, однако получить дополнительное количество индолицидина не удалось.

Анализ полученных нами экспериментальных данных позволил прийти к заключению, что низкие выходы и сложные для очистки смеси продуктов во многом обусловлены побочными реакциями, связанными с использованием для блокирования боковых радикалов триптофана защитных

Таблица 1. Комбинации защитных группировок на индольном азоте триптофана и гуанидиновой функции аргинина, использованные в синтезе индолицидина

Комбинация	Trp	Arg
1	Mts	Mts
2	Form	Mts
3	Form	NO ₂
4	Mts	NO ₂

групп сульфонильного типа (комбинации 1 и 4). То есть гетерогенность реакционной смеси после конечного деблокирования была следствием модификации индольных колец остатков триптофана. Образование пептидов с модифицированными индольными кольцами было подтверждено наличием в масс-спектрах грубого продукта соединений с соответствующими молекулярными массами.

Для минимизации процесса образования побочных продуктов при конечном деблокировании в комбинациях 2 и 3 индольный азот был блокирован формильной защитой, причем в комбинации 3 для полного исключения влияния активного сульфонильного катион-радикала на индольное кольцо триптофана, гуанидиновая функция аргинина была блокирована нитрогруппой, сравнительно редко применяемой в последние годы в пептидной химии. Полученные результаты полностью подтвердили высказанное выше предположение. Так, в комбинации 2 индолицидин был получен с удовлетворительным выходом, но только при использовании выше упомянутой смеси скавенджеров (*m*-крезол–тиоанизол–этандитиол, 2 : 2 : 1).

Использование же в синтезе сочетания Trp(Form) и Arg(NO₂) привело к высокому выходу целевого продукта, причем в качестве скавенджера достаточно было применять *m*-крезол или анизол. ВЭЖХ грубого продукта представлена на рис. 2в.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что в процессе удаления Mts-защиты с индольного азота происходит необратимое внутримолекулярное или межмолекулярное сульфонирование индольных колец остатков триптофана образующимися катион-радикалами, приводящее к смеси модифицированных по триптофановым остаткам пептидов и резкому снижению выхода целевого продукта. Кроме того, использование Mts-защиты на остатках аргинина в пептидах, содержащих триптофан, возможно, но требует применения соответствующей сложной смеси скавенджеров на стадии конечного деблокирования. Оптимальным является использование в сочетании с формилтриптофаном нитроар-гинина, что позволяет значительно упростить процесс конечного деблокирования и значительно повысить выход целевого продукта.

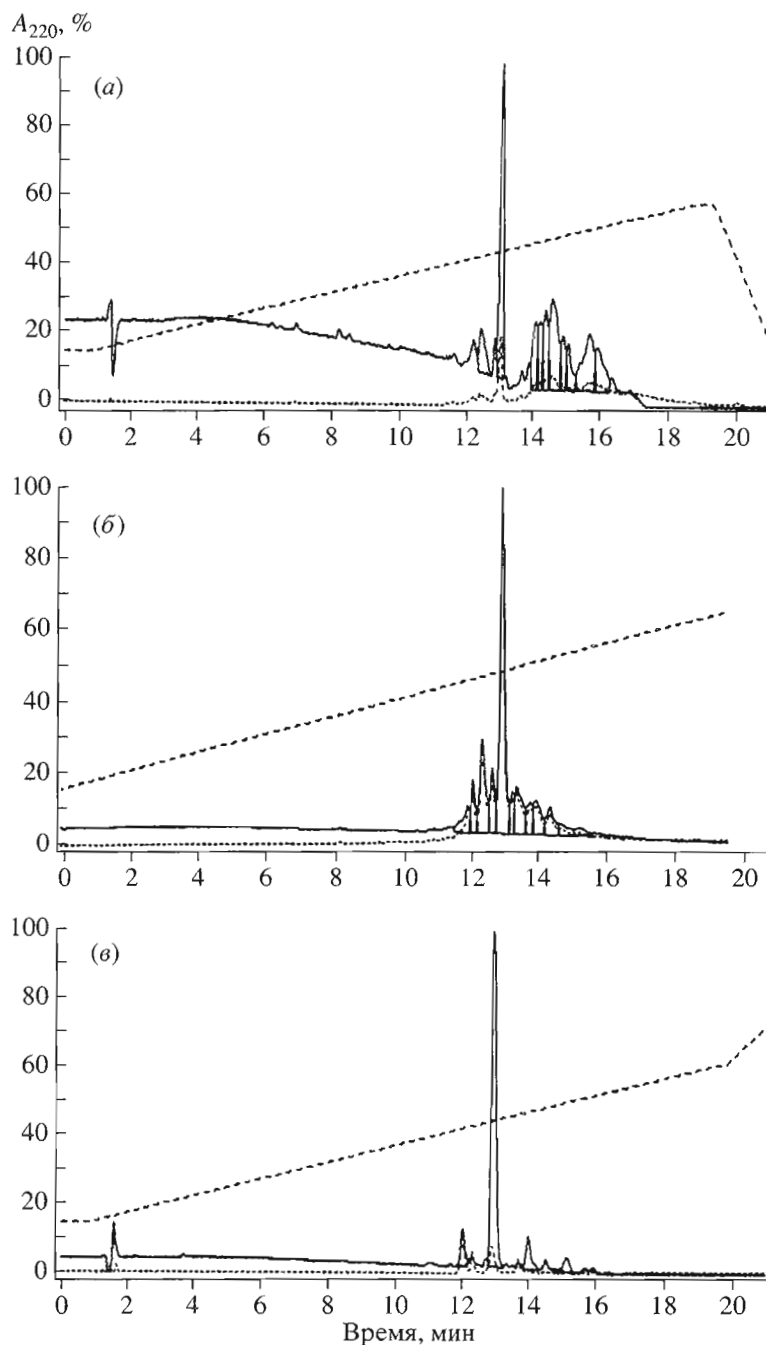


Рис. 2. ВЭЖХ грубых продуктов синтеза индолицидина с использованием различных комбинаций защитных группировок боковых функций аргинина и триптофана на колонке DeltaPak C18 (3.9×150 мм, 5μ , 100 \AA), элюент 0.1% TFA, градиент концентрации MeCN (15 \rightarrow 60% за 20 мин); (а) – Boc-Trp(Mts)-OH и Boc-Arg(Mts)-OH; (б) – Boc-Trp(Form)-OH и Boc-Arg(Mts)-OH; (в) – Boc-Trp(Form)-OH и Boc-Arg(NO₂)-OH.

Далее в синтезе всех аналогов была использована комбинация Trp(Form) и Arg(NO₂), и целевые пептиды были выделены с хорошими выходами (60–70%).

Очистку индолицидина, синтезированного различными способами, а также его аналогов проводили с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе. Чистота полученных при этом препаратов была более 95%. Они имели удовлетворительный аминокислотный анализ, были индивидуальны по данным аналитиче-

ской ВЭЖХ и их молекулярная масса, по данным масс-спектрометрии, соответствовала расчетной.

Структурные и физико-химические параметры полученных соединений приведены в табл. 2.

Все синтезированные пептиды были тестированы на гемолитическую активность (гемолиз эритроцитов) и антибактериальную активность в отношении ряда бактериальных штаммов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, все синтезированные аналоги сохраняли антимикробную активность индолицидина в отношении использованных для тестирования микроорганизмов. Активность аналогов (IV) и (V) была несколько выше, что особенно четко проявилось в отношении грамотрицательных микроорганизмов.

Что касается гемолитической активности, то только аналог (II), так же как и сам индолицидин, в интервале концентраций 100–50 мкМ вызывали значительный гемолиз эритроцитов, который постепенно уменьшался и при концентрации менее 6 мкМ практически не фиксировался. Аналог (III) только при концентрации более 50 мкМ вызывал очень незначительный гемолиз. Данные по гемолитической активности индолицидина и аналогов (II) и (III) приведены на рис. 3. Аналоги (IV)–(VII) в исследованном интервале концентраций вообще не вызывали гемолиза.

Сравнивая данные по антибактериальной и гемолитической активностям синтезированных аналогов, можно констатировать, что в аналогах (III)–(VII) произошло “разделение” специфической активности. Особенно наглядно это проявилось у аналогов (IV) и (V), то есть в тех концентрациях, в которых эти соединения были активны по отношению к использованным для тестирования микроорганизмам, они были инертны по отношению к эритроцитам, не приводя к их лизису.

Данные оценки биологической активности аналогов подтвердили наши предположения о том, что повышение положительного заряда и увеличение амфипатичности молекулы пептида приводит к увеличению терапевтического индекса, т.е. при сохранении антибактериальной активности гемолитическая активность практически отсутствует.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе пептидов использовали N^{α} -Вос-производные аминокислот L -ряда, в том числе трифункциональных: Lys(Cbz(Cl)), Arg(Mts), Arg(NO₂), Trp(Form), Trp(Mts) (ООО “НПФ Верта”, Санкт-Петербург, Россия). Метиленхлорид, трифторуксусная кислота и N,N -диметилформамид фирмы “Merck”, 1-гидроксibenзотриазол, N,N -диизопропилэтиламин, N,N -диизопропилкарбодимид и ацетонитрил – фирмы “Fluka” (Швейцария).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson (Франция) на колонках DeltaPak 5μ C18 100A (3.9 × 150 мм) для аналитических целей и Waters Prep-NovaPak 6μ C18 60A (19 × 300 мм) для препаративной очистки. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Alpha-Plus (LKB, Швеция) после гидролиза пептидов 4 н. метансульфонокислотой, содержащей 0.4% триптамина, в течение 22 ч при 110°C. Масс-спектрометрию осуществляли

Таблица 2. Структурные и физико-химические параметры индолицидина и его синтетических аналогов

Пептид	Суммарный положительный заряд	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
			вычисленная	по MS
(I) (Индолицидин)	4	14.04	1906.33	1908.31
(II)	3	15.51	1849.24	1850.97
(III)	5	11.25	1805.27	1806.76
(IV)	6	10.91	1863.31	1864.06
(V)	7	8.52	1778.20	1780.37
(VI)	8	7.81	1820.28	1822.34
(VII)	9	7.46	1867.38	1869.79

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации индолицидина и его аналогов в отношении роста некоторых микроорганизмов

Пептид	МИК ₅₀ , мкМ*		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> M17	<i>Klebsiella pneumonia</i> 722
Ind	6	2	5
(II)	6	<1.5	6
(III)	4	3	6
(IV)	4	<1.5	1.5
(V)	4	<1.5	2
(VI)	4	5	6
(VII)	9	6	6

* МИК₅₀ – минимальная концентрация пептида, подавляющая рост микроорганизмов более чем на 50%. Даны усредненные значения из трех независимых определений.

методом MALDI-TOF на приборе Per Sepetive BioSystems “Voyager-DE BioSpectrometry Workstation”.

Амфипатические спирали индолицидина и аналогов были построены с помощью пакета программ “Peptide Companion”, CSPS, Сан-Диего, США.

Антимикробную активность исследовали на бактериальных штаммах *Escherichia coli* M17, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Klebsiella pneumonia* 722 из коллекции музейных штаммов ГосНИИ особо чистых биопрепаратов.

Для биологического тестирования использовали стерильные 96-луночные планшеты для клеточных культур фирмы “Costar”.

Оптическое поглощение измеряли на длинах волн 595 и 415 нм на приборе BioRad, Microplate Rider, Модель 3550.

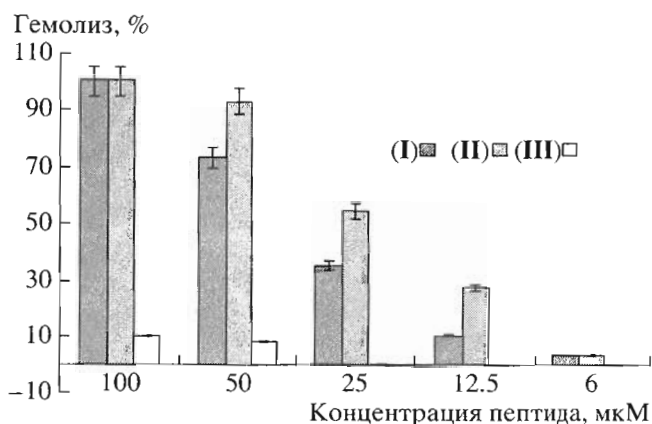


Рис. 3. Гемолитическая активность индолицидина (I) и аналогов (II) и (III).

Синтез индолицидина и его аналогов осуществляли на метилбензгидриламинопереполимере фирмы "Sigma" (США) (1 г/экв. NH_2).

Наращивание пептидной цепи проводили на пептидном синтезаторе Applied Biosystems 430A (США) либо вручную по следующему протоколу для каждого цикла: 1) TFA (2 и 4 мин); 2) DMF (2×1 мин); 3) CH_2Cl_2 (1 мин); 4) реакция конденсации (30 мин) в присутствии 1.5 экв. *N,N*-диизопротилэтиламина; 5) DMF (2×1 мин); 6) CH_2Cl_2 (1 мин).

Для конденсации использовали трехкратные избытки активированных 1-оксибензтриазоловых эфиров соответствующих Вос-аминокислот, полученных *in situ* (по 1 экв. Вос-аминокислоты, диизопротилкарбодиимида и HOBT, перемешивание в DMF 20 мин).

Деблокирование и отщепление от смолы проводили в две стадии. На первой стадии для удаления формильной защиты использовали 50% раствор пиперидина в DMF (2×20 мин), промывали CH_2Cl_2 , высушивали и для удаления оставшихся защитных групп и отщепления пептида от полимерной матрицы использовали смесь сухого HF и м-крезола (9 : 1) при 0°C .

Полученные пептиды очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA (от 10 до 70%) за 60 мин при скорости элюции 3 мл/мин и детекции на длине волны 220 нм.

Аминокислотные составы и молекулярные массы (табл. 2) всех синтезированных пептидов соответствовали расчетным.

Гемолитическую активность пептидов определяли, используя эритроциты человека, выделенные центрифугированием из гепаринизированной крови. Эритроциты отмывали веронал-мединаловым буфером (0.15 М, pH 7.4). После отмывки их разводили фосфатным буфером PBS (0.015 М Na_2HPO_4 , 0.15 М NaCl, pH 7.4). В ячейках 96-ячеечного планшета делали разведения пептидов в

том же буфере, а затем в ячейки вносили разведенную суспензию эритроцитов. Исходная тестируемая концентрация пептида составляла 100 мкМ с последующей разлитровкой с шагом 2, концентрация эритроцитов – 0.2%.

В контрольные ячейки вносили буфер PBS (отсутствие гемолиза, негативный контроль $A_{\text{НК}}$) и 0.1% раствор Тритона X-100 в PBS, вызывающий 100% гемолиз (позитивный контроль $A_{\text{К}}$).

Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C . После окончания инкубации планшеты центрифугировали, супернатант переносили в чистый планшет и измеряли оптическое поглощение при 415 нм. Каждое определение ставили в трех повторах на трех разных планшетах.

Полученные показатели оптического поглощения обрабатывали по следующей формуле:

$$\text{Гемолиз} = \frac{A_{\text{P}}^{415} - A_{\text{НК}}^{415}}{A_{\text{К}}^{415} - A_{\text{НК}}^{415}} \times 100(\%).$$

Влияние синтезированных пептидов на рост микроорганизмов. Микроорганизмы выращивали на жидкой питательной среде LB, содержащей (г/л): бактотриптон (Difko, США) – 10.0, дрожжевой экстракт (Difko, США) – 5.0, натрий хлористый – 10.0, а также на твердой питательной среде – LB-агаре, которая дополнительно содержала 1.5% агара (Difko, США).

После выращивания культуры на жидкой среде с использованием качалки в течение 18–24 ч при 37°C (стационарная фаза роста) клетки пересевали на твердую питательную среду и выращивали еще 24 ч, после чего чашки помещали в холодильник и хранили при температуре $4-8^\circ\text{C}$ 2–3 недели.

Перед проведением анализа клетки петлей снимали с поверхности агара и помещали в жидкую среду (LB) на 1.5–2 ч при 37°C ; затем определяли оптическое поглощение на спектрофотометре СФ-16 при 595 нм и рассчитывали концентрацию клеток, используя калибровочные кривые, построенные по результатам предварительных экспериментов ($A_{595} = 1$ соответствовала 1.5×10^9 клеток/мл).

В 96-ячеечном планшете для клеточных культур осуществляли разведения исследуемых пептидов в жидкой среде LB. Добавляли в ячейки суспензию бактериальных клеток до конечной концентрации 5×10^5 кл/мл. Исходная тестируемая концентрация пептида составляла 100 мкМ с последующей разлитровкой с шагом 2. Планшеты помещали в термостат (100% влажность, 37°C), инкубировали 16 ч, встряхивали при комнатной температуре 20–30 мин и измеряли оптическое поглощение при длине волны 595 нм (A_{P}^{595}).

Позитивным контролем ($A_{\text{К}}^{595}$) служили образцы, в которые вместо пептида добавляли антиби-

отики, чувствительность к которым была заранее определена (ампициллин или бензилпенициллин).

Негативным контролем (A_{NK}^{595}) являлись образцы, в которые вместо раствора пептида вносили тот же объем среды LB.

Определяли процент ингибирования (I , %) роста соответствующей культуры по формуле:

$$I = \frac{(A_{NK}^{595} - A_P^{595})}{A_{NK}^{595} - A_K^{595}} \times 100(\%).$$

Каждое определение ставили в трех повторах на трех разных планшетах.

Антибиотическую активность пептидов характеризовали в виде минимальной концентрации, при которой наблюдалось ингибирование роста микроорганизма более чем на 50% (МИК₅₀).

Работа выполнена в рамках Государственной программы “Изучение структурно-функциональных свойств и механизмов действия физиологически значимых молекул и их рецепторов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hancock R.E.W. // *Lancet*. 1997. V. 349. P. 418–422.
2. Andreu D., Rivas L. // *Biopolymers (Pept. Sci.)*. 1998. V. 47. P. 415–433.
3. Kondejewski L.H., Jelokhani-Niaraki M., Farmer S.W., Lix B., Kay C.M., Sykes B.D., Hancock R.E.W., Hodges R.S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 13181–13192.
4. Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 4292–4295.
5. Giacometti A., Cirioni O., Greganty G., Quarta M., Scalise G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. V. 42. P. 3320–3324.
6. Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G. // *J. Antimicrob. Chemother.* 1998. V. 42. P. 445–451.
7. Ahmad I., Perkins W.R., Lupan D.M., Selsted M.E., Janoff A.S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 1237. P. 109–114.
8. Robinson W.E. Jr., McDougall B., Tran D., Selsted M.E. // *J. Leukoc. Biol.* 1998. V. 63. P. 94–100.
9. Ladokhin A.S., Selsted M.E., White S.H. // *Biophys. J.* 1997. V. 72. P. 794–805.
10. Subbalakshmi C., Krishnakumary V., Nagaraj R., Sitaran N. // *FEBS Lett.* 1996. V. 395. P. 48–52.
11. Lim Y.-B., Pyun J.-C., Park J.-S. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 30. P. 229–233.
12. Staubitz P., Peschel A., Nieuwenhuizen W.F., Otto M., Gotz F., Jung G., Jack R.W. // *J. Pept. Sci.* 2001. V. 7. P. 552–554.
13. Friedrich C.L., Rozek A., Patrzykat A., Hancock R.E.W. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 24015–24022.
14. Shiffer J., Edmundsen A.B. // *Biophys. J.* 1967. V. 7. P. 121–135.
15. Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. // *Biopolymers (Pept. Sci.)*. 2000. V. 55. P. 4–30.
16. Merrifield R.B., Barany G. // *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology* / Eds Gross K., Meinhofer J. New York: Acad. Press, 1980. V. 2. P. 3.
17. van Abel R.J., Tang Y.-Q., Rao V.S.V., Dobbs C.H., Tran D., Barany G., Selsted M.E. // *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1995. V. 45. P. 401–409.
18. Andreu D., Garcia F.J. // *Lett. Pept. Sci.* 1997. V. 4. P. 41–48.
19. Schnolzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S.B.H. // *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1992. V. 40. P. 180–193.

Structure–Function Relationship between Analogues of the Antibacterial Peptide Indolicidin. I. Synthesis and Biological Activity of Analogues with Increased Amphipathicity and Elevated Net Positive Charge of the Molecule

M. P. Smirnova, V. G. Afonin, V. M. Shpen', Yu. V. Tyagotin, and N. I. Kolodkin[#]

[#] Phone: +7 (812) 230-49-53; e-mail: Kolodkin@hpb.spb.ru
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Pudovskaya ul. 7, St. Petersburg, 197110 Russia

The antibacterial peptide indolicidin and a number of its analogues were obtained by solid phase synthesis. An optimized method of the synthesis using the Boc strategy was suggested. It was shown that the therapeutic index of indolicidin analogues increased with a decrease in the total positive charge of the molecule and its amphipathicity; i.e., the hemolytic activity of analogues within the range of concentrations examined was practically absent, while the antibacterial activity was preserved. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antibacterial peptides, antimicrobial activity, indolicidin, structure–function relationship, solid phase peptide synthesis, tryptophan