



УДК 577.112.6.017:577.18.03

## СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА САРКОТОКСИНА IA

© 2002 г. С. А. Таран<sup>\*#</sup>, Т. З. Есикова<sup>\*\*</sup>, Л. Г. Мустаева<sup>\*</sup>, М. Б. Бару<sup>\*</sup>, Ю. Б. Алахов<sup>\*</sup><sup>\*</sup> Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, Московская обл.;<sup>\*\*</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Московская обл.

Поступила в редакцию 16.05.2001 г. Принята к печати 03.12.2001 г.

Твердофазным методом с применением свеллографического мониторинга синтезированы три 18-членных аналога N-концевого фрагмента катионного антимикробного пептида саркотоксина IA. Изучены способность полученных пептидов ингибировать рост различных бактерий в культуральной среде, а также их гемолитическая активность в экспериментах на эритроцитах человека. Наибольшей антибактериальной активностью обладал аналог, полностью соответствующий N-концевой аминокислотной последовательности природного саркотоксина IA и имеющий амидированный C-конец. Наличие карбоксильной группы на C-конце или замена остатка Trp2 на Tyr приводят к ослаблению антимикробных свойств пептида. Полученные данные свидетельствуют о том, что амфифильный N-концевой (1-18)-фрагмент саркотоксина IA включает элементы, ответственные за антимикробную активность.

*Ключевые слова:* саркотоксин IA; твердофазный синтез пептидов; свеллографический мониторинг; антимикробные пептиды.

### ВВЕДЕНИЕ

Последние десять лет наряду с сообщениями об открытии новых природных полипептидов антимикробного действия и результатами их исследования приводятся данные о биологической активности синтетических аналогов, сконструированных на основе уже известных природных пептидов [1, 2]. Синтетические аналоги часто обладают активностью против широкого спектра микроорганизмов, порой превосходящей активность родительских пептидов [3]. С помощью химического синтеза можно быстро получить варианты антимикробных пептидов с измененными свойствами, что открывает новые возможности для изучения механизма их действия, а также влияния отдельных аминокислотных остатков и пространственной структуры на биологическую активность. Некоторые антимикробные пептиды и их аналоги уже находят применение в медицинской практике в качестве заменителей антибиотиков благодаря своей низкой аллергенности и отсутствию "эффекта привыкания".

Саркотоксин IA – типичный представитель линейных катионных пептидов насекомых, относящийся к группе цекропинов. Он состоит из 39 а.о. (около 4 кДа), в природе образуется в гемолимфе личинок мясной мухи *Sarcophaga peregrina* в ответ на повреждение тела личинки и проникновение бактериальной инфекции [4]. Спектр антибактериального действия саркотоксина достаточно широк: он токсичен как для грамотрицательных, так и для грамположительных бактерий в концентрациях, сравнимых с эффективными концентрациями традиционных антибиотиков [5].

Анализ вторичной структуры саркотоксина IA методами <sup>1</sup>H-ЯМР и КД показывает, что в гидрофобном окружении липидов бактериальной мембраны саркотоксин образует две амфифильные α-спирали, разделенные небольшим неструктурированным участком. N-Концевую спираль формирует фрагмент 3–23, а C-концевую – аминокислотные остатки 28–39 [6]. Такая двудоменная организация саркотоксина IA делает его весьма привлекательным объектом для исследования участия каждого структурного домена в пока еще мало понятном молекулярном механизме антимикробного действия этого пептида.

Сокращения: SIA – саркотоксин IA; Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол; Mtg – 4-метокси-2,3,6-триметилбензилсульфонил; Tgt – трифенилметил.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (0967) 73-17-80; эл. почта: nucleus@fibkh.serpukhov.su).

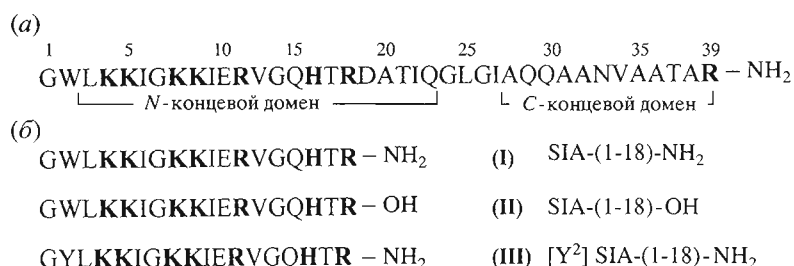


Рис. 1. Саркотоксин IA (а) и синтетические аналоги его N-концевого фрагмента (б). Выделены основные аминокислотные остатки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что антимикробные свойства саркотоксина IA проявляются при его взаимодействии с бактериальной клеточной мембраной с последующим нарушением ее функций, ответственных за осмотический баланс [7]. Показано, что такое взаимодействие обусловлено высоким содержанием катионных аминокислотных остатков в N-концевом участке природного саркотоксина IA и сходных пептидов, а также конформацией этой части молекулы, которая в гидрофобном окружении липидов бактериальной мембраны представляет собой амфифильную  $\alpha$ -спираль. У некоторых катионных антимикробных пептидов N-концевой участок имеет структуру амфифильного  $\beta$ -складчатого слоя. В то же время C-концевой участок молекулы остается слабо структурированным, образуя короткую  $\alpha$ -спираль, или структурируется случайным образом. Кроме того, известно, что изменения в N-концевой области антимикробного пептида, как правило, влияют на его биологическую активность, в отличие от изменений в C-концевой части [8]. Поэтому можно предположить, что именно N-концевая амфифильная часть пептида, называемая иногда доменом, ответственна за антимикробные свойства. Однако следует отметить, что исследования антимикробных свойств синтетических пептидов, структурно сходных с саркотоксином IA, проводились только на полно-размерных моделях, содержащих аминокислотные замены в различных положениях, либо на гибридах, состоящих из частей разных антимикробных пептидов [9].

В связи с этим целью настоящей работы было исследование антибактериальной активности укороченных аналогов N-концевого амфифильного домена саркотоксина IA, для чего были синтезированы пептиды (I)–(III) (рис. 1).

Пептид (I) (SIA-(1-18)-NH<sub>2</sub>) имеет последовательность 18-членного N-концевого фрагмента природного саркотоксина IA и амидирован по C-концу, что характерно для большинства извест-

ных на сегодняшний день природных антимикробных пептидов [2].

Пептид (II) (SIA-(1-18)-OH), имея ту же аминокислотную последовательность, что и (I), неамидирован.

Пептид (III) ([Y<sup>2</sup>]SIA-(1-18)-NH<sub>2</sub>) отличается от (I) заменой остатка триптофана во втором положении на тирозин. Известно, что остатки триптофана в большинстве антимикробных пептидов важны для проявления биологической активности.

Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием светлогографического мониторинга для контроля за ходом процесса и Fmoc-стратегии по разработанному нами контрастному протоколу (табл. 1) [10, 11]. В отличие от большинства применяемых в настоящее время протоколов автоматического синтеза пептидов в нашем протоколе мы использовали растворители и их смеси, при смене которых объем пептидилполимера изменяется и отслеживается светлогографическим мониторингом. В качестве реагентов, контрастирующих объем пептидилполимера, были применены смеси растворителей различного

Таблица 1. Типовой контрастный протокол твердофазного синтеза пептидов\*

Номер операции	Операция одного цикла
1	DMF
2	Пиперидин–DMF–толуол (6 : 7 : 7)
3	DMF
4	Bu <sup>t</sup> OH–DMF (3 : 1)
5	DMF
6	Добавление активированного производного Fmoc-аминокислоты
7	DMF
8	Bu <sup>t</sup> OH–DMF (3 : 1)

\* Для автоматизированного комплекса "СинХром" с использованием светлогографического мониторинга, ориентированного на момент стабилизации сигнала потенциометрического датчика (исходная масса полимера 0.5 г, скорость потока 2 мл/мин).

Таблица 2. Выход и чистота синтезированных пептидов

Пептид	Выход, %		Чистота по данным ВЭЖХ*, %		$R_f$ , мин
	после гель-фильтрации	конечный	после гель-фильтрации	конечная	
(I)	81	49	69	95	17.4
(II)	56	55	40	99.5	11.8
(III)	77	64	58	98.5	15.6

\* Условия см. "Эксперимент. часть".

состава. Растворители, сильно сжимающие гранулы носителя ( $\text{Pr}^i\text{OH}$ ,  $\text{Bu}^i\text{OH}$ , гексан), нежелательны вследствие низкой растворимости в них отмываемых продуктов реакции, а также из-за резкого уменьшения скорости диффузии. В синтезе пептидов (I)–(III) мы использовали "мягко"

сжимающую смесь  $\text{Bu}^i\text{OH}$ –DMF (3 : 1). С этой же целью увеличения контрастности протокола при деблокировании использовали пиперидин в смеси DMF–толуол (6 : 7 : 7). В качестве исходного носителя применяли 4-(2',4'-диметоксифенил- $\text{Fmoc}$ -аминометил) на основе сополимера дивинилбензола со стиролом. Для защиты боковых функциональных групп использовались:  $\text{Bu}^i$  – для Glu, Thr и Tyr; Boc – для Lys; Mtr – для Arg; Trt – для His.

Для конденсаций применяли пентафторфениловые эфиры  $\text{Fmoc}$ -Gln и  $\text{Fmoc}$ -His(Trt) в присутствии  $\text{HOBT}$ ; остальные  $\text{Fmoc}$ -защищенные аминокислотные остатки вводились в реакцию в виде 1-оксibenзотриазоловых эфиров, полученных *in situ*.

Деблокированные пептиды подвергали гель-фильтрации и дополнительно очищали ионообменной хроматографией. Индивидуальность полученных соединений подтверждали данными аминокислотного анализа и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выходы и качественная характеристика полученных продуктов приведены в табл. 2.

Затем были исследованы антимикробная активность аналогов (I)–(III), а также их способность осуществлять гемолиз эритроцитов крови человека. В качестве тест-бактерий использовали как грамположительные – *Micrococcus luteus* MX100, *Bacillus megaterium* ВКМ41, *Bacillus subtilis* 168, так и граммотрицательные – *Escherichia coli* K12K37, *Pseudomonas aeruginosa* PAT348.

На клетках *B. megaterium* ВКМ41 и *E. coli* K12K37 были проведены сравнительные исследования ингибирования роста культур при добавлении в среду аналогов саркотоксина IA (I)–(III) в различных концентрациях (рис. 2). В экспериментах использовали одинаковые условия культивирования для обоих бактериальных штаммов. Пептиды вносили в культуру, находящуюся в начале логарифмической фазы роста. Как следует из результатов, все три пептида проявляли цитолитическую активность в микромолярных концентрациях, которая, однако, варьировала в довольно широких пределах.

Выживаемость клеток, %

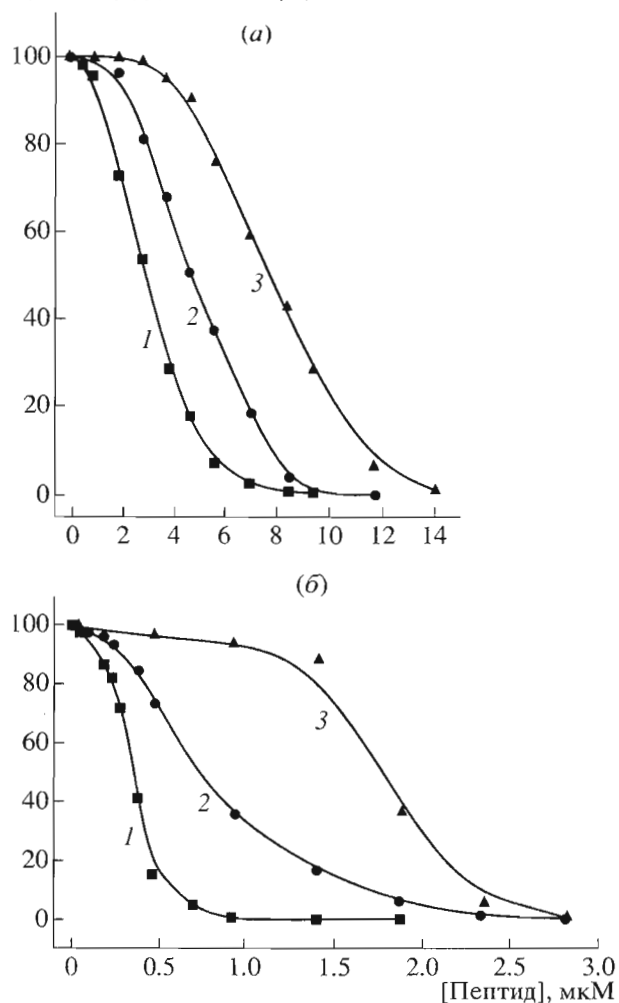


Рис. 2. Антибактериальная активность против *E. coli* (а) и *B. megaterium* (б) синтетических пептидов (I)–(III) (кривые 1–3 соответственно).

Общепринятой характеристикой сравнения биологической активности пептидных антибиотиков является их минимальная ингибирующая концентрация. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее активным среди исследованных аналогов саркотоксина IA является пептид (I) (табл. 3). При замене С-концевого карбоксамиды на карбоксильную группу в аналоге (II) наблюдалось 2–5-кратное снижение биологической активности. Кроме того, можно отметить, что наиболее чувствительными к действию исследуемых пептидов оказались штаммы *M. luteus* MX100, *B. megaterium* ВКМ41 и *E. coli* K12K37.

Согласно гипотетическому механизму действия, молекулы саркотоксина IA и родственных ему пептидов взаимодействуют с бактериальной мембраной [12]. В липидном окружении антибактериальные пептиды агрегируют с образованием трансмембранного кластера (возможно, ионного канала), что приводит к нарушению мембранного потенциала и последующему цитолизу. При этом предполагается, что длина пептида должна соответствовать толщине бактериальной мембраны (около 3 нм). Теоретически минимальная длина составляет около 18 а.о. В рамках этой гипотезы более высокую антибактериальную активность амидированного аналога саркотоксина IA (I) по сравнению с карбоксильным аналогом (II) можно объяснить большей стабильностью первого в трансмембранном положении за счет взаимодействия концевых амидов с отрицательно заряженными группами фосфолипидов, находящимися на обеих поверхностях бактериальной мембраны. При этом отсутствие С-концевого фрагмента природного саркотоксина IA в исследованных нами аналогах (I)–(III), по-видимому, не принципиально для проявления антибактериальных свойств.

Изменения же в N-концевом домене приводят, как правило, к значительному снижению биологической активности [13]. Существенными для проявления антибактериальных свойств являются остатки аргинина или лизина, консервативные для семейства цекропинподобных пептидов, к которому принадлежат саркотоксины [2]. Осуществленная нами замена триптофана во втором положении пептида на тирозин также оказалась весьма важной для проявления антибактериальных свойств аналога (III). Его минимальная ингибирующая концентрация против *B. megaterium* увеличилась в 16 раз по сравнению с аналогом (I), а для штаммов *P. aeruginosa* и *M. luteus* – в 8 и 6 раз соответственно. Это согласуется с литературными данными [13] и свидетельствует в пользу того, что остатки триптофана вносят существенный вклад в проявление антимикробного действия пептида. Например, сохраняющая  $\alpha$ -спиральность цекропина А замена триптофана в положении 2 на остаток глутаминовой кислоты приводила к снижению его антибактериальной активности более чем в 10 раз [13]. О значимости остатка

**Таблица 3.** Минимальные ингибирующие концентрации аналогов (I)–(III) саркотоксина IA против некоторых штаммов бактерий

Штаммы бактерий	Минимальная ингибирующая концентрация*, мкМ		
	(I)	(II)	(III)
<i>E. coli</i> K12K37	0.95	2.1	3.8
<i>P. aeruginosa</i> PAT348	1.4	7.0	11.8
<i>B. megaterium</i> ВКМ41	0.1	0.25	1.66
<i>B. subtilis</i> 168	>50	>50	>50
<i>M. luteus</i> MX100	0.07	0.14	0.43

\* Даны усредненные значения из пяти независимых определений.

триптофана у цекропинов также свидетельствует о существенном уменьшении антибактериальной активности против *E. coli*, которое наблюдалось в случае пептидов с делециями двух N-концевых аминокислотных остатков, включая триптофан; при этом на штаммах *P. aeruginosa* и *M. luteus* активность у этих аналогов вообще отсутствовала [14]. В то же время делеция только первой N-концевой аминокислоты не приводила к существенному изменению активности [13]. Важность остатка триптофана можно объяснить тем, что его индольное ядро обладает и гидрофобными, и гидрофильными свойствами, и, вероятно, именно оно в значительной степени обеспечивает взаимодействие пептида с поверхностью бактериальной мембраны, а затем и его проникновение через фосфолипидный бислой.

Гемолитическую активность аналогов N-концевого фрагмента саркотоксина IA (I)–(III) определяли в экспериментах на эритроцитах крови человека; в качестве положительного контроля использовали пептид пчелиного яда мелиттин, обладающий высокой гемолитической активностью. Ни один из аналогов (I)–(III) не приводил к гемолизу эритроцитов даже в концентрациях, превышающих 100 мкМ, в то время как мелиттин проявлял гемолитическую активность уже при концентрации 5 мкМ (9%). Отсутствие гемолитической активности у изученных аналогов саркотоксина IA свидетельствует о взаимодействии этих пептидов только со специфическими для бактерий компонентами клеточных мембран. Эти выводы согласуются с данными, которые были получены рядом авторов на природном саркотоксине и родственных ему цекропинах [15].

Таким образом, нами установлено, что наибольшей антибактериальной активностью среди изученных 18-членных, укороченных с С-конца, аналогов катионного антимикробного пептида саркотоксина IA обладает амидированный пептид (I). Наличие карбоксильной группы на С-конце (аналог II) или замена остатка Trp2 на Tyr (ана-

лог III) приводят к ослаблению, но не к полному исчезновению антибактериальной активности. Эти данные указывают на то, что молекулярные элементы, ответственные за антимикробные свойства, находятся в составе *N*-концевого  $\alpha$ -спирально-амфифильного домена саркотоксина IA, и такая структура в дальнейшем может быть использована для выяснения механизма антимикробного действия саркотоксина, а также в качестве основы при разработке новых терапевтических препаратов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислотные производные и реактивы фирм Novabiochem (Швейцария), Fluka (Швейцария), LKB Biochrom (Великобритания), Sigma (США). Автоматический синтез пептидов проводили с использованием комплекса "СинХром" (НПО СинХро, Россия) и проточного реактора переменного объема [11]. Спектрофотометрический мониторинг осуществляли с помощью Uvicord SII (LKB, Швеция), для проведения манометрического мониторинга применяли проточный тензопреобразователь Д2,5Б (ПО Промприбор, Россия). Аналитическую ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа System Gold (Beckman, США) на колонках Nucleosil (4.1 × 250 мм) 300-7 C18 и C4 (Macherey-Nagel, Германия). Аминокислотный состав пептидов определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе (Biotronic LC5000, Германия) после кислотного гидролиза (6 н. HCl, 110°C, 24 ч). Очистку растворителей проводили стандартными методами [16].

В микробиологических исследованиях были использованы бактериальные штаммы из коллекции лаборатории организации белковых структур филиала ИБХ РАН: *E. coli* K12K37, *P. aeruginosa* PAT348, *B. subtilis* 168, *B. megaterium* ВКМ41, *M. luteus* MX100. Бактерии культивировали на полноценных питательных средах LB-агаре и LB-бульоне, содержащих (г/л): бакто-триптон (Difco, США) – 10.0, дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5.0, NaCl – 10.0, а также на среде Antibiotic medium (Difco, США). Для получения агаризованной среды добавляли 1.5% агара (Difco, США). Культивирование штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* осуществляли при 37°C, *B. megaterium*, *B. subtilis* и *M. luteus* при 30°C на качалке НТ (Infors AG, Швейцария) при 200 об/мин. Оптическое поглощение измеряли при длине волны 650 нм на спектрофотометре Ocean Optics (США) с использованием программного пакета OOI Base32. При необходимости пробы разводили в 2–4 раза стерильной средой.

**Пептиды** синтезировали твердофазным методом с применением свеллографического мониторинга. Параллельные спектрофотометрический и манометрический мониторинги использовались как вспомогательные [11]. В качестве исходно-

го носителя применяли 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)феноксиполимер (Novabiochem) на основе сополимера 1% дивинилбензола со стиролом.

Для конденсаций использовали пентафторфениловые эфиры Fmoc-Gln и Fmoc-His(Trt) в присутствии НОВt (1 экв.); остальные Fmoc-защитные аминокислотные остатки вводили в реакцию в виде 1-оксибензотриазоловых эфиров, полученных *in situ* (по 1 экв. аминокислотного производного, диизопропилкарбодиимида и НОВt, перемешивание в DMF 10 мин).

Удаление боковых защитных групп и отщепление пептидов от полимерного носителя проводили трифторуксусной кислотой (40 мл/г пептидполимера) в токе азота в присутствии скевенджеров: 5% анизол и 1% этандитиола (8 ч при комнатной температуре). Полимерный носитель отфильтровывали, промывали деблокирующей смесью (2 × 10 мл), полученный раствор упаривали на роторном испарителе, остаток растирали в 300 мл эфира и оставляли на ночь при –10°C. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали эфиром (5 × 10 мл) и сушили в вакууме.

Полученные после деблокирования сырые продукты растворяли в 2–4 мл 5–10% уксусной кислоты и центрифугировали 5 мин (15 тыс. об/мин). Супернатант подвергали геле-фильтрации на колонке 2.5 × 75 см с носителем Toyopearl HW-40SF (Toyosoda, Япония) в 0.1 М уксусной кислоте при скорости элюции 90 мл/ч. Детекцию осуществляли при 226 и 280 нм. Фракции, содержащие преимущественно целевой продукт (по данным ВЭЖХ), объединяли и лиофилизовали. Дополнительную очистку препаратов проводили ионообменной хроматографией с использованием в качестве колонки проточного реактора переменного объема (1.6 × 4.5 см) на сорбенте SP-Toyopearl 650M (Toyosoda, Япония) в фосфатно-солевых буферных системах с последующим обессоливанием на колонке Sephadex G-15 (2.5 × 80 см) в 0.2 М уксусной кислоте.

Полученные продукты характеризовали данными аминокислотного анализа и аналитической ВЭЖХ. Элюцию осуществляли линейным градиентом ацетонитрила (2%/мин) в 0.1% TFA либо в 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5). Детекцию проводили при 220 нм с количественным обчетом по площадям пиков на интеграторе Chromatorac C-R6A (Shimadzu, Япония). Все синтезированные пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Минимальная ингибирующая концентрация пептидов.** Бактерии выращивали в жидкой полноценной среде Antibiotic medium в течение ночи, реинокулировали и выращивали до середины экспоненциальной фазы роста (*A* 0.30–0.35 при 650 нм). Клетки вносили в опытные пробирки до конечной концентрации (1–2) × 10<sup>6</sup> кл./мл. Пептиды, растворенные в воде, добавляли до конечной концентрации 0.1–100 мкМ. Бактерии выращива-

ли в течение 18–24 ч при температуре, оптимальной для каждого штамма (см. выше). Через указанный промежуток времени определяли оптическое поглощение культуры. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали то наибольшее разведение пептида, при котором наблюдали снижение оптического поглощения культуры по сравнению с контролем (табл. 3).

**Гемолитическую активность** пептидов определяли, используя эритроциты человека, выделенные центрифугированием из гепаринизированной крови. Эритроциты дважды отмывали фосфатным буфером (35 мМ Na-фосфат/0.15 М NaCl, рН 7.4) непосредственно перед экспериментом и суспендировали в том же буфере до концентрации 1% (вес/объем). К 500 мкл суспензии эритроцитов добавляли 500 мкл фосфатного буфера, содержащего пептиды в концентрации от 1 до 200 мкМ (мелиттин от 1 до 100 мкМ). Образцы инкубировали в течение 30 мин при 37°C и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Супернатант отделяли от осадка и измеряли оптическое поглощение при 540 нм. За 0% принимали гемолиз эритроцитов в фосфатном буфере, а за 100% – гемолиз в фосфатном буфере, содержащем 1% Triton X-100.

**Определение количества жизнеспособных клеток.** Бактерии *E. coli* K12K37 и *B. megaterium* ВКМ41 выращивали в течение ночи при температуре 37°C в среде Antibiotic medium (Difco), клетки осаждали центрифугированием и вносили в ту же среду в количестве  $(1-2) \times 10^6$  на 1 мл. Пептиды, растворенные в воде, добавляли до конечной концентрации 0.1–15 мкМ. После культивирования бактерий в течение 18 ч при температуре 37°C аликвоты культур отбирали, готовили серии десятикратных разведений и высевали на чашки с

L-агаром. Чашки инкубировали в течение ночи и подсчитывали количество выросших колоний.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zasloff M.* // *Curr. Opin. Immunol.* 1992. V. 4. P. 3–4.
2. *Boman H.G.* // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. V. 13. P. 61–92.
3. *Mor A., Nicolas P.* // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 1934–1939.
4. *Okada M., Natori S.* // *Biochem. J.* 1984. V. 222. P. 119–124.
5. *Okada M., Natori S.* // *Biochem. J.* 1983. V. 211. P. 727–734.
6. *Iwai N., Nakajima Y., Natori S., Arata Y., Shimada I.* // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 217. P. 639–644.
7. *Durell S.R., Raghunathan G., Guy R.H.* // *Biophys. J.* 1992. V. 63. P. 1623–1631.
8. *Nicolas P., Mor A.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1995. V. 49. P. 277–304.
9. *Shin S.Y., Lee M.K., Kim K.L., Nahm K.-S.* // *J. Peptide Res.* 1997. V. 50. P. 279–285.
10. *Бару М.Б., Черский В.В., Данилов А.В., Мошников С.А., Мустаева Л.Г.* // *Биоорган. химия.* 1995. Т. 21. С. 498–505.
11. *Бару М.Б., Черский В.В., Данилов А.В., Мошников С.А., Мустаева Л.Г.* // *Биоорган. химия.* 1995. Т. 21. С. 506–516.
12. *Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 5072–5076.
13. *Andreu D., Merrifield R.B., Steiner H., Boman H.G.* // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 1683–1688.
14. *Andreu D., Merrifield R.B., Steiner H., Boman H.G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 6475–6479.
15. *Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R.B.* // *J. Peptide Res.* 1997. V. 49. P. 59–66.
16. *Perrin D.D., Armarego W.L.F., Perrin D.R.* *Purification of Laboratory Chemicals.* N.Y.: Pergamon Press, 1985. P. 167–448.

## Synthesis and Antibacterial Activity of Analogues of the N-Terminal Fragment of the Sarcotoxin IA Antimicrobial Peptide

S. A. Taran<sup>\*#</sup>, T. Z. Esikova<sup>\*\*</sup>, L. G. Mustaeva<sup>\*</sup>, M. B. Barus<sup>\*</sup>, and Yu. B. Alakhov<sup>\*†</sup>

<sup>#</sup> *Phonelfax: (0967) 73-1780; e-mail: nucleus@fibkh.serpukhov.su*

<sup>\*</sup> *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

<sup>\*\*</sup> *Institute of the Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

Three 18-membered analogues of the N-terminal fragment of the sarcotoxin IA cationic antimicrobial peptide were synthesized by the solid phase method of peptide synthesis with the use of swellographic monitoring. The ability of these peptides to inhibit the growth of various bacteria in culture medium and their hemolytic activity in experiments on human erythrocytes were studied. The analogue completely corresponding to the N-terminal amino acid sequence of the natural sarcotoxin IA with the amide group on its C-terminus exhibited higher antibacterial activity. The presence of carboxyl group on the C-terminus or the substitution of Tyr for Trp2 resulted in a decrease in the antimicrobial activity of the peptide. Our results indicate that the amphiphilic N-terminal peptide corresponding to the 1–18 sequence of sarcotoxin IA involves the moieties responsible for the antimicrobial activity of the antibiotic. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words: sarcotoxin IA, solid phase peptide synthesis, swellographic monitoring, antimicrobial peptides*