



УДК 577.181:577.112.6

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ. V. ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИЕ АНТИГРИБКОВЫЕ ПЕПТИДЫ С “ЛИНЕЙНЫМ” ТИПОМ АМФИПАТИЧНОСТИ

© 2024 г. Н. В. Амирханов\*,<sup>#</sup>, А. В. Бардашева\*, В. Н. Сильников\*, Н. В. Тикунова\*

\* ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 07.11.2023 г.

После доработки 18.11.2023 г.

Принята к публикации 19.11.2023 г.

Синтезирован и исследован ряд гистидин-содержащих синтетических антигрибковых пептидов с “линейным” типом амфипатичности (САМП-ЛТА) (**F2H<sub>x</sub>**, **H10F2**, **H10**, где  $x = 7, 10, 13$  и  $16$ ), проведен скрининг антигрибковой и гемолитической активности этих гистидин-содержащих пептидов. Показано, что представленные гистидин-содержащие САМП-ЛТА способны эффективно подавлять рост условно-патогенных грибов *Candida albicans* и обладают низкой гемолитической активностью, в большинстве случаев не превышающей 10% даже при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты. Антигрибковая активность исследованных САМП-ЛТА возрастает с увеличением количества остатков гистидинов в их составе, достигая максимального значения для гистидин-содержащего пептида **F2H16** (МПК<sub>50</sub> = 1.0 мкМ). Показано, что с увеличением длины цепи пептидов растет также их гемолитическая токсичность. В плане терапевтической значимости оптимальными в представленном ряду пептидов оказались САМП-ЛТА **F2H10** и **F2H13**, обладающие более высокой селективностью, чем короткие или более протяженные их аналоги **F2H7** или **F2H16**. Значения терапевтического индекса (ТИ) для этих пептидов составили 233, 247, 79 и 60 соответственно. Показано, что гистидин-содержащие производные САМП-ЛТА с остатками фенилаланина на N-конце пептида (**F2H10**) проявляют меньшую эффективность по сравнению с аналогичными пептидами (**H10F2**), содержащими остатки фенилаланина на C-конце. Среди исследованных пептидов наиболее активным оказался пептид **H10** (МПК<sub>50</sub> = 0.7 мкМ), не содержащий остатков фенилаланина, который по своей антигрибковой активности не только эффективнее всех остальных гистидин-содержащих пептидов, в том числе и пептида **F2H16** с 16 остатками гистидина, но и в 4–5 раз эффективнее антигрибкового пептида **P113** (МПК<sub>50</sub> = 3.4 мкМ) короткого активного фрагмента природного Hst 5, хорошо известного из литературы. Благодаря своей относительно низкой гемолитической и высокой антигрибковой активности, представленные гистидин-содержащие САМП-ЛТА обладают относительно высокими значениями ТИ (ТИ > 60). Среди всех исследованных пептидов **H10** и **P113** обладают минимальными (практически нулевыми) значениями гемолитической активности. Однако вследствие своей более высокой антигрибковой активности селективность пептида **H10** (ТИ > 1400) превышает селективность пептида **P113** (ТИ > 340) более чем в 4 раза. Таким образом, пептид **H10** благодаря его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, высокой терапевтической значимости может использоваться в качестве перспективного антигрибкового пептидного препарата.

*Ключевые слова:* синтетические антимикробные пептиды, амфифильность, “линейный” тип амфипатичности, “круговой” тип амфипатичности, гистидин-содержащие пептиды, пептид P113, антигрибковая активность, *Candida albicans*, гемолитическая активность, селективность

DOI: 10.31857/S0132342324040135, EDN: MWISGO

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; ГА – гемолитическая активность; КТА – “круговой” тип амфипатичности; ЛТА – “линейный” тип амфипатичности; МГК – минимальная гемолитическая концентрация (концентрация пептида, которая вызывает лизис не более 4% свежих красных кровяных клеток); МПК<sub>50</sub> – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%); АГА – антигрибковая активность; САМП – синтетические антимикробные пептиды; ТИ – терапевтический индекс; ХГ – хлоргексидин; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НАТУ – 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат; Hst – гистатин; PBS – фосфатно-солевой буфер; TFA – трифторуксусная кислота.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: nariman@niboch.nsc.ru).

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается рост заболеваемости пациентов внутрибольничными грибковыми инфекциями. Дрожжеподобные грибки рода *Candida* – одни из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций кровотока [1, 2]. Длительное применение в терапии микозов различных антигрибковых средств привело к серьезной угрозе возникновения и распространения патогенных штаммов грибов, обладающих лекарственной устойчивостью к традиционно используемым препаратам [3, 4]. Поэтому важное практическое значение имеет поиск новых лекарственных средств, применение которых не приводило бы к возникновению устойчивости к ним.

Перспективными в этом плане могут оказаться выявленные в природе антимикробные пептиды (АМП), синтезирующиеся в ответ на контакт с чужеродными микроорганизмами или их внедрение [5–8]. АМП – это в основном амфифильные катионные пептиды, которые воздействуют на отрицательно заряженную мембрану микробных клеток. В результате такого воздействия развитие устойчивости патогенов к АМП в значительной степени затруднено, поскольку требует внесения серьезных изменений в структуру и электрофизиологические свойства их клеточной мембраны [5, 8–11]. Большинство известных природных АМП обладают не только высокой антимикробной активностью, но и повышенной гемолитической токсичностью. Причина такой токсичности пептидов – их относительно высокая гидрофобность, обусловленная повышенным содержанием (> 30%, а в ряде случаев и до 50%) гидрофобных аминокислотных остатков в общей аминокислотной цепи природного пептида [12, 13]. В связи с этим продолжают поиски новых эффективных АМП, обладающих высокой антимикробной активностью и низкой гемолитической токсичностью. Перспективными в этом плане могут оказаться синтетические антимикробные пептиды (САМП), сконструированные и синтезированные *de novo*, не опирающиеся на структуру природных АМП, т.е. сконструированные независимо от структуры многочисленных известных природных АМП [13–21].

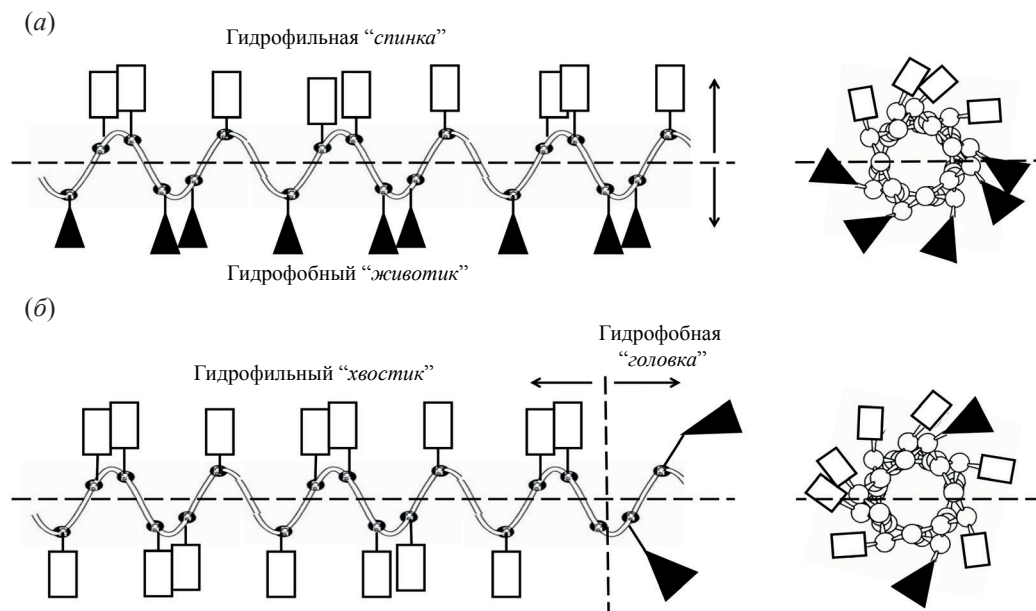
Ранее с использованием такого подхода нами были сконструированы САМП, с классическим

широко известным и хорошо исследованным в литературе “круговым” (спиральным или кольцевым) типом амфипатичности (КТА) [22–24] (рис. 1а) и пептиды с малоизвестным “линейным” типом амфипатичности (ЛТА) [25, 26]. Было выявлено, что САМП с малоизвестным “линейным” типом амфипатичности (ЛТА) (**R9F2**, **K9F2** и **H9F2**) по сравнению с аналогичными САМП с часто встречающимся в природе классическим “круговым” типом амфипатичности (КТА) (**R5F5** (RFRRFFRRFF), **K5F5** (KFRRFFRRFF) и **H5F5** (HFRRFFRRFF)) проявляют не только пониженную гемолитическую токсичность, но и, в то же время, повышенную антигрибковую активность [26].

Пониженная гемолитическая активность САМП-ЛТА **R9F2**, **K9F2** и **H9F2** в силу их структурированности по сравнению с САМП-КТА **R5F5**, **K5F5** и **H5F5** (рис. 1а, 1б) обусловлена пониженным содержанием гидрофобных Phe-групп в составе пептида (18 и 50% соответственно) [26]. Гемолитическая активность при действии гистидин-содержащего САМП-ЛТА **H9F2** *in vitro* даже при достаточно высокой его концентрации в среде (500 мкМ), содержащей эритроциты, не превышала 4%, тогда как уровень гемолиза для пептида **H5F5** из группы САМП-КТА при той же его концентрации в среде 500 мкМ составляла уже > 60%, т.е. гистидин-содержащие САМП-КТА по уровню их действия на эритроциты оказались более чем в 15 раз токсичнее, чем аналогичные САМП-ЛТА [26].

Среди всех исследованных САМП-ЛТА гистидин-содержащий пептид **H9F2** показал не только низкий уровень гемолитической токсичности, но и максимально высокую антигрибковую активность [26]. В настоящей работе с целью оптимизации последовательности антигрибкового пептида **H9F2** с “линейным” типом амфипатичности и выявления более активных антигрибковых пептидов этого ряда необходимо было исследовать влияние на антигрибковую активность более длинных или, напротив, более коротких последовательностей таких гистидин-содержащих пептидов.

Ранее антимикробная активность пептидов, содержащих гидрофобные группы на N- или C-конце пептидной последовательности, не сравнивались. Поэтому необходимо было также выяснить, как влияет на антигрибковую активность



**Рис. 1.** Гипотетическое представление классического “кругового” (а) и “линейного” (б) типов амфипатичности  $\alpha$ -спиральных пептидов. Прямоугольниками обозначены гидрофильные или катионные остатки аминокислот, треугольниками – гидрофобные остатки. В случае классического “кругового” типа амфипатичности (КТА) [6, 22, 23] гидрофобные и гидрофильные полярные поверхности  $\alpha$ -спиральной молекулы пептида разделены продольной осевой линией (а). На рисунке верхняя поверхность гидрофильная, нижняя – гидрофобная (амфипатичность по типу “спинка–животик”). В случае линейного типа амфипатичности (ЛТА) гидрофобные и гидрофильные (катионные) остатки аминокислот разнесены на противоположных концах вдоль линейной оси пептида. Гидрофобная и гидрофильная полярные области в этом случае разделены поперечной линией, перпендикулярной продольной оси пептида (б), где один (левый) конец молекулы имеет гидрофильный “хвостик”, а противоположный (правый) – гидрофобную “головку”. Справа представлены двумерные проекции “спиральных колес” Шиффер и Эдмундсона [20, 24] этих же пептидов. Видно, что полярная однородность гидрофобных и гидрофильных групп в случае “линейного” типа амфипатичности (б) в проекции, представленной слева, гораздо выше, чем когда та же молекула представлена в классическом виде в виде двумерных проекций “спиральных колес” (справа).

пептида гидрофобный остаток фенилаланина (Phe) при его расположении на *N*- или на *C*-конце гистидин-содержащих пептидов, какова роль гидрофобных остатков в таких пептидах, другими словами, какова, например, антигрибковая активность аналогичного гистидин-содержащего пептида, не имеющего в своем составе остатки Phe.

Необходимо было сравнить биологические свойства таких гистидин-содержащих САМП-ЛТА друг с другом, а также с описанными в литературе активными гистидин-богатыми пептидными антигрибковыми препаратами, например, с 12-звенным антигрибковым пептидом **P113** (AKRHNGYKRKFH) [27–29], который известен в качестве потенциального антигрибкового лекарственного препарата под названием **PAC-113** (2016-132), [28], являющегося одним из наиболее

коротких фрагментов природного антигрибкового белка гистатина 5 (Hst 5), обнаруженного в слюне человека [30–32]. На сегодняшний день пептид **P113** (**PAC-113**) продемонстрировал свою эффективность и безопасность у пациентов с кандидозом полости рта [28] и уже прошел фазу IIВ клинических испытаний в качестве антигрибкового препарата (компания Pacgen Biopharmaceuticals Corporation, Канада) [32].

Цель настоящей работы – синтез и сравнительный скрининг антигрибковой активности ряда сконструированных нами *de novo* гистидин-содержащих САМП (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10**, **H10F2**), обладающих так называемым “линейным” типом амфипатичности, исследование их гемолитических свойств и оценка терапевтического индекса, а также сравнение полученных результатов с аналогичными дан-

ными для гистидин-богатого 12-звенного антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRRKFH) – потенциального лекарственного препарата, известного под названием **PAC-113**, одного из наиболее коротких и активных аналогов природного гистидин-богатого антигрибкового пептида Hst 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Структура, синтез и физико-химические свойства антимикробных пептидов.** Для изучения влияния количества остатков гистидина, а также расположения гидрофобных групп в гистидин-содержащих пептидах на антигрибковую активность нами был сконструирован ряд модельных гистидин-содержащих САМП, образующих “линейный” тип амфипатичности (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2**), а также пептиды **H10**, **P113** и **R9F2**, использованные в качестве контрольных последовательностей. Структура синтезированных пептидов включала в себя последовательность аминокислот, содержащую свободную *N*-концевую аминогруппу (придающую пептиду дополнительный положительный заряд), и амидную группу на *C*-конце цепи, нейтрализующую отрицательный заряд свободной концевой карбоксильной группы (табл. 1).

В амфифильных САМП-ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** и **H10F2** гидрофобные Phe- и гидрофильные His-группы сгруппированы таким образом, что расположены раздельно на концах цепи пептида (табл. 1), создавая так называемый “линейный” тип амфипатичности [25, 26] (рис. 1б).

Среди исследованных пептидов были выделены четыре гистидин-содержащих пептида различной длины с различным содержанием аминокислотных остатков His: **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, т.е. пептиды, содержащие 7, 10, 13 и 16 остатков His соответственно на *C*-конце пептида и по два остатка Phe на *N*-конце пептида, которые были использованы для выявления оптимального количества остатков гистидинов, необходимых для осуществления пептидами их антимикробной и гемолитической активности.

С целью определения влияния гидрофобных остатков в составе исследуемых гистидин-содержащих пептидов на антигрибковую активность использованы три пептида: пептид **H10F2** с десятью остатками His на *N*-конце и двумя гидрофобными остатками Phe на *C*-конце пептида; пептид **F2H10**, содержащий также десять остатков His и два остатка Phe на *N*-конце; декагистидин **H10** как контрольный пептид без гидрофобных остатков Phe. Аргинин-содержащий пептид **R9F2** по своей структуре принадлежит, так же как и остальные вышеперечисленные пептиды с остатками гистидина, к САМП-ЛТА (рис. 1б), но вместо гистидина содержит аргинин. Этот пептид был использован нами в качестве контрольного пептида для выяснения сравнительной роли влияния остатков His на антигрибковую активность. В качестве контрольного пептида был синтезирован также 12-звенный пептид **P113** [28, 32], являющийся одним из наиболее коротких и активных фрагментов Hst 5 [27–29], 26-мерного антигрибкового пептида Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr (**2001-5643**) [30], выделенного

Таблица 1. Структура пептидов

Пептид	Структура
<b>F2H7</b>	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-NH <sub>2</sub>
<b>F2H10</b>	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-NH <sub>2</sub>
<b>F2H13</b>	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-NH <sub>2</sub>
<b>F2H16</b>	H-Phe-Phe-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-His-NH <sub>2</sub>
<b>H10</b>	H-His-His-His-His-His-His-His-His-NH <sub>2</sub>
<b>H10F2</b>	H-His-His-His-His-His-His-His-His-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>
<b>P113</b>	H-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-NH <sub>2</sub>
<b>R9F2</b>	H-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>

из слюнной железы человека [30, 31] (в структуре Hst 5 подчеркнута последовательность фрагмента **P113**).

Синтез исследованных пептидов проводили стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [33] согласно ранее опубликованной схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3. Эффективность присоединения одного аминокислотного мономерного звена, определенная путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, для синтезированных пептидов в среднем составила 97.2–99.8%. Конечные выходы пептидов после деблокирования, удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ составили ~50–67% (табл. 2). По данным офВЭЖХ и масс-спектрометрии, все выделенные пептиды соответствовали ожидаемой структуре и были гомогенными с содержанием основного вещества не менее 95%.

С увеличением количества остатков гистидина в составе пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** время их удерживания на колонке при офВЭЖХ закономерно повышалось от 18.2 до 20.0 мин (табл. 2). При этом пептид **H10**, не содержащий гидрофобных остатков Phe, в ряду всех исследованных пептидов имеет наименьшее время удерживания ( $\tau = 12.8$  мин). Однако следует отметить неожиданную разницу во времени удерживания пептидов **F2H10** и **H10F2** одинакового состава, но содержащих остатки Phe на разных концах цепи – *N*- или *C*-конце ( $\tau = 19.0$  и  $22.5$  мин соответственно) (табл. 2). По-видимому, наличие гидрофобных

остатков Phe на *N*- или *C*-конце пептида по-разному влияет на его пространственную структуру, увеличивая или уменьшая своего рода “замаскированность” или “размытость” гидрофобных групп в самом пептиде. Так, например, в случае пептида **F2H10** концевой остаток Phe на *N*-конце содержит гидрофильную положительно заряженную концевую аминокислотную группу, что в какой-то мере, вероятно, “разбавляет” или “размывает” гидрофобный кластер, образуемый двумя концевыми остатками Phe на *N*-конце такого пептида. Остатки Phe на *C*-конце цепи в случае пептида **H10F2**, в свою очередь, кооперативно группируясь друг с другом и с относительно нейтральной амидной группой, по-видимому, образуют более компактный гидрофобный кластер на *C*-конце, что, скорее всего, в целом влияет на гидрофобные свойства пептида **H10F2**, увеличивая его относительную гидрофобность относительно пептида **F2H10**.

По сравнению с 12-звенными гистидин-содержащими пептидами **F2H10** и **H10F2** с двумя остатками Phe на *N*- или *C*-концах цепи, время удерживания контрольного 12-мерного пептида **P113** оказалось наименьшим ( $\tau = 19.0$ ,  $22.5$  и  $16.6$  мин соответственно) (табл. 2). Вероятно, такое различие в гидрофобности связано с наличием в пептиде **P113** дополнительно более гидрофильных остатков Arg и Lys и меньшим содержанием остатков His, а также наличием менее гидрофобного (по сравнению с Phe) остатком тирозина (Tyr).

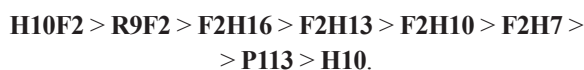
**Таблица 2.** Физико-химические характеристики пептидов

Пептиды	Общий выход синтеза*, %	Время удерживания ( $\tau$ )**, мин, 30% CH <sub>3</sub> CN	Молекулярная масса	
			расч. [M + H]	эсп. [M + H]
<b>F2H7</b>	66.7	18.2	1271.4	1271.7
<b>F2H10</b>	59.1	19.0	1682.8	1682.9
<b>F2H13</b>	55.2	19.6	2094.3	2094.1
<b>F2H16</b>	49.8	20.0	2505.7	2505.4
<b>H10</b>	63.4	12.8	1388.5	1388.8
<b>H10F2</b>	61.0	22.5	1682.8	1683.0
<b>P113</b>	56.5	16.6	1563.8	1564.1
<b>R9F2</b>	56.0	21.9	1717.0	1716.5

\* Конечный выход после удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ в расчете на первую загруженную аминокислоту на полимерном носителе.

\*\* В условиях аналитической офВЭЖХ (условия см. в “Эксперим. части”).

Гидрофобность всех исследованных пептидов по данным офВЭЖХ может быть расположена по возрастанию их времени удерживания в следующем ряду:



Видно, что наиболее гидрофобны в этом ряду пептиды **H10F2** и **R9F2**, а пептиды **P113** и **H10** обладают наименьшей гидрофобностью.

Таким образом, синтез всех пептидов в указанном режиме, как и ранее [25, 26], проходит достаточно эффективно, с относительно высокими выходами, которые закономерно снижаются с увеличением длины синтезируемой цепи. Зависимость гидрофобности соответствующих гистидин-содержащих пептидов с остатками Phe на *N*-конце цепи пептида, по данным офВЭЖХ, закономерно возрастает с увеличением количества остатков гистидина в их составе. Также следует отметить, что гидрофобность исследованных гистидин-содержащих пептидов зависит от расположения гидрофобных остатков Phe на *C*- или *N*-конце цепи пептида: пептид **H10F2** обладает большей гидрофобностью, чем аналогичный пептид **F2H10**.

**Антигрибковая активность пептидов.** Антигрибковую активность пептидов изучали на примере условно-патогенной дрожжеподобной грибковой культуры *C. albicans*. Каждый из пептидов в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ добавляли к растущим культурам клеток *C. albicans* и наблюдали за ростом клеток. Влияние присутствия

пептидов в культуральной среде на рост самой культуры клеток контролировали измерением оптической плотности (оптического поглощения при 595 нм) суспензии растущих клеток во времени в течение 24 ч [25, 26, 34]. Для оценки антигрибковой активности исследованных пептидов были определены их минимальные подавляющие концентрации (МПК<sub>50</sub>), при воздействии которых доля микробных частиц составляла 50% от концентрации частиц в контрольной культуре [25, 26]. Значения МПК<sub>50</sub>, характеризующие антигрибковую активность исследованных пептидов, приведены в табл. 3. На рис. 2 значения МПК<sub>50</sub> исследованных пептидов для наглядности представлены в виде диаграммы обратных значений МПК<sub>50</sub> (1/МПК<sub>50</sub>), отражающих прямую антигрибковую активность пептидов (чем выше значения 1/МПК<sub>50</sub>, тем выше активность).

В качестве универсальных положительных контролей для сравнения относительной антигрибковой активности исследуемых пептидов использовали известные антисептические препараты – водные растворы хлоргексидина (ХГ) и нитрата серебра (AgNO<sub>3</sub>). Во всех исследованных случаях (за исключением пептида **F2H7**) антигрибковая активность гистидин-содержащих пептидов существенно (в 3 и более раз) превышала активность контрольных препаратов AgNO<sub>3</sub> и ХГ (табл. 3, рис. 2).

Из данных табл. 3 и диаграммы обратных значений МПК<sub>50</sub> (рис. 2) видно, что антигрибковая активность пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и

**Таблица 3.** Значения МПК<sub>50</sub> исследованных пептидов по отношению к грибковым культурам клеток *C. albicans*

Пептиды	МПК <sub>50</sub> *, мкМ
<b>F2H7</b>	8.9
<b>F2H10</b>	1.5
<b>F2H13</b>	1.5
<b>F2H16</b>	1.0
<b>H10</b>	0.7
<b>H10F2</b>	0.9
<b>P113</b>	3.4
<b>R9F2</b>	4.6
ХГ	6.8
AgNO <sub>3</sub>	9.9

\* МПК<sub>50</sub> – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%). Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных) не превышает 15–30%.

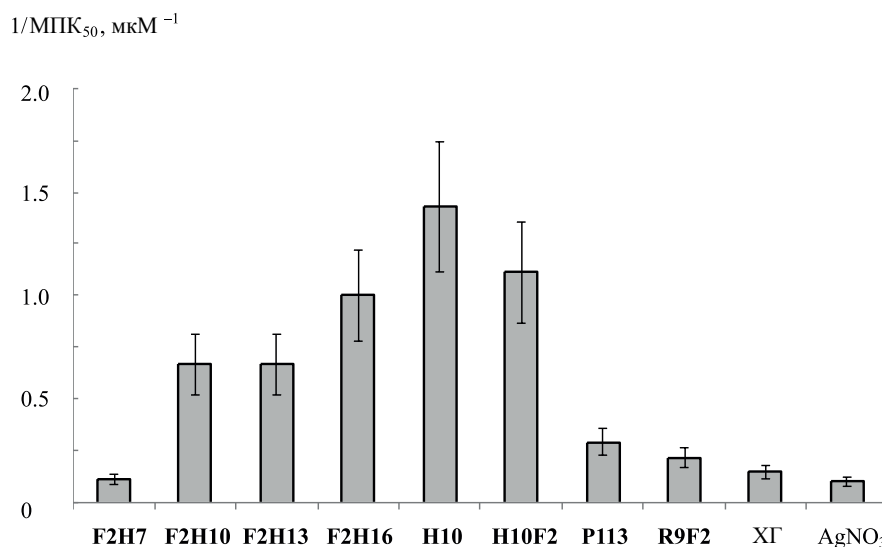


Рис. 2. Гистограмма обратных значений МПК<sub>50</sub> (1/МПК<sub>50</sub>) пептидов по отношению к грибковым культурам клеток *C. albicans* после 24 ч инкубации с пептидами.

**F2H16**, содержащих Phe-группу на *N*-конце пептида, возрастает с увеличением числа остатков His (МПК<sub>50</sub> = 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ соответственно) (табл. 3). Так, например, значения МПК<sub>50</sub> пептидов в этом ряду возрастают, начиная со значения 8.9 мкМ для пептида **F2H7** и достигая максимума для пептида **F2H16** (МПК<sub>50</sub> = 1.0 мкМ) (табл. 3). Таким образом, антигрибковая активность исследованных пептидов возрастает с увеличением длины пептида и количества остатков His в их составе в следующем ряду:



Ранее антимицробную активность пептидов, содержащих гидрофобные группы на *N*- или *C*-конце пептида, не сравнивали. Поэтому неожиданным для нас оказалось то, что синтезированный нами пептид **H10F2**, содержащий Phe-группу на *C*-конце пептида, обладает не только более высокой гидрофобностью, но и более высокой антигрибковой активностью (МПК<sub>50</sub> = 0.9 мкМ) по сравнению с пептидом **F2H10**, содержащим Phe на *N*-конце цепи (МПК<sub>50</sub> = 1.5 мкМ) (табл. 3). Величина активности для пептида **H10F2** (МПК<sub>50</sub> = 0.9 мкМ) сопоставима с таковой для пептида **F2H16** (МПК<sub>50</sub> = 1 мкМ), проявляющего максимальную активность среди всех исследованных гистидин-содержащих пептидов с остатками Phe на *N*-конце. Таким образом, обнаружено, что

гистидин-содержащие пептиды с гидрофобной Phe-группой на *N*-конце пептида проявляют существенно меньшую антигрибковую активность, чем гистидин-содержащие пептиды, у которых гидрофобная Phe-группа находится на *N*-конце. Более того, оказалось, что декагистидиновый пептид **H10**, не содержащий остатков Phe, обладает еще большей антигрибковой активностью (МПК<sub>50</sub> = 0.7 мкМ) (табл. 3), чем аналогичные декагистидин-содержащие пептиды **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на *C*- или *N*-концах (МПК<sub>50</sub> = 1.5 и 0.9 мкМ соответственно) (табл. 3). Этот факт для нас оказался также неожиданным, поскольку, согласно литературным данным, механизм действия АМП, в том числе и гистидин-богатых пептидов, предполагает наличие у пептида амфифильности, которая необходима для взаимодействия АМП с клеточной мембраной микроорганизмов [14–16, 28]. Другими словами, для успешного проникновения через мембрану микробной клетки в составе пептида необходимо наличие не только катионных остатков аминокислот, но и гидрофобных остатков, способных взаимодействовать с гидрофобным слоем мембраны. Однако, исходя из полученных данных, видно, что остатки Phe на *C*- или *N*-концах гистидин-содержащих пептидов в нашем случае не только способствуют проявлению антигрибковой активности, а напротив, даже “мешают” или “пре-

пятствуют” проявлению такой активности, например, в случае пептида **F2H10** в большей, а в случае пептида **H10F2** – в меньшей степени. Таким образом, видно, что пептид **H10**, который не содержит никакие “препятствующие” проявлению антигрибковой активности гидрофобные остатки Phe, проявляет максимальную антигрибковую активность, превосходящую активность пептидов **F2H10** и **H10F2**, содержащих остатки Phe.

Аргинин-содержащий пептид **R9F2**, обладающий также “линейным” типом амфипатичности (рис. 1б), проявляет существенно (в 5 раз) меньшую антигрибковую активность ( $МПК_{50} = 4.6$  мкМ) (табл. 3), чем аналогичный гистидин-содержащий пептид **H10F2** ( $МПК_{50} = 0.9$  мкМ) (табл. 3), что свидетельствует о преимущественной значимости остатков His в структуре пептида для проявления его относительно высокой антигрибковой активности. Ранее нами было показано, что тот же аргинин-содержащий пептид **R9F2** гораздо эффективнее воздействует на бактериальные клетки, чем на клетки грибов, причем гораздо эффективнее, чем аналогичный гистидин-содержащий пептид **H9F2** [25, 26]. Вероятно, воздействие гистидин-содержащих пептидов на клетки грибов происходит по другому механизму [35, 36], чем при воздействии на бактериальные клетки [14–16].

Согласно литературным данным [28, 32, 35, 36], один из представителей гистатинов (гистидин-богатых пептидов) – Hst 5 – связывается с белками клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2), с гликанами и поглощается клетками посредством переносчиков грибковых полиаминов. Попав внутрь грибковых клеток, Hst 5 может влиять на функции митохондрий и вызывать окислительный стресс, однако конечная причина гибели клеток – дисрегуляция объема и дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом. Но поскольку специфической активностью по отношению к *C. albicans* обладает не только Hst 5, но и остальные гистатины, содержащие в своем составе остатки гистидинов, вполне уместно предположить, что на поверхности дрожжевых клеток *C. albicans* имеются специфические рецепторы к гистидин-богатым пептидам. Другими словами, причина проникновения гистидин-богатых пептидов (гистатинов), в том числе исследованных нами гистидин-содержащих САМП (**F2H7**, **F2H10**, **F2H13**,

**F2H16**, **H10F2**, **H10**), как можно предположить, – это не их катионные свойства, а наличие рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам. Проникновение в клетку в данном случае, скорее всего, должно идти не по электростатическому, а по рецептор-опосредованному механизму, хотя, как утверждается в некоторых случаях, электростатические взаимодействия также играют немаловажную роль в первоначальном связывании с отрицательно заряженной поверхностью клеток *C. albicans* [28, 37].

Важность электростатических взаимодействий наряду с рецептор-опосредованными взаимодействиями подчеркивается в случае антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRKFH) (**2020-2654**), полученного из белка Hst 5 слюны человека [27], который сохраняет антигрибковую активность, сопоставимую с активностью исходной молекулы Hst 5. Утверждается, что механизм антигрибковой активности пептида **P113** аналогичен механизму Hst 5 [27]. Предполагается, что первоначально положительно заряженные остатки **P113** связываются с отрицательно заряженной поверхностью условно-патогенных дрожжевых клеток *C. albicans* посредством электростатических взаимодействий с последующим связыванием с белком клеточной стенки Ssa2 и транслокацией в цитоплазму [37]. При этом утверждается, что две катионные аминокислоты Lys2 и Lys10 в составе пептида **P113** играют важную роль в транспорте в цитозоль [37]. Однако антигрибковая активность исследованного нами пептида **H10** ( $МПК_{50} = 0.7$  мкМ) (табл. 3), содержащего лишь остатки His, оказалась намного (почти в 5 раз) выше, чем антигрибковая активность пептида **P113**. В случае пептида **P113** сам факт электростатического взаимодействия АМП с клеточной стенкой или мембраной дрожжевой клетки, скорее всего, важен, однако в случае пептида **H10** взаимодействие десяти остатков His с рецепторами клеточной стенки, вероятно, перекрывает по своей активности электростатические взаимодействия, которые дополнительно присутствуют в пептиде **P113** благодаря остаткам Arg и Lys. Три остатка His в составе пептида **P113**, вероятно, недостаточны для эффективного взаимодействия с гистидин-специфичными рецепторами, хотя электростатические взаимодействия, обусловленные катионными аминокислотными остатками Arg и Lys, в этом случае дополняют рецептор-



опосредованные взаимодействия. И, как видно на примере исследованных нами пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, увеличение количества остатков гистидинов в пептидах действительно последовательно увеличивает их антигрибковую активность (табл. 3).

Таким образом, был проведен скрининг антигрибковой активности гистидин-содержащих пептидов с разной структурой. Антигрибковая активность (АГА) исследованных пептидов может быть расположена в следующем ряду по возрастанию их активности:



где АГА пептидов **P113** и **R9F2** самая низкая.

Результаты проведенного скрининга показывают, что антигрибковая активность исследованных пептидов зависит не только от содержания остатков гистидина в составе пептида, повышаясь с увеличением числа гистидинов в пептиде, но и от расположения гидрофобных остатков Phe. Гистидин-содержащие пептиды с гидрофобными остатками Phe на C-конце способны проявлять большую антигрибковую активность, чем аналогичные пептиды с остатками Phe на N-конце. Среди всех исследованных пептидов наибольшей антигрибковой активностью обладает пептид **H10**, не содержащий гидрофобных остатков Phe, который по своей антигрибковой активности эффективнее аналогичных гистидин-содержащих пептидов **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на N- или C-конце, а также пептида **F2H16**, содержащего максимальное количество остатков His, и который почти в 5 раз эффективнее известного в литературе антигрибкового пептида **P113** – одного из самых коротких активных фрагментов природного гистидин-богатого антигрибкового белка Hst 5.

**Гемолитическая активность пептидов.** При создании САМП в качестве потенциальных лекарственных препаратов одним из важных факторов, помимо высокой эффективности синтеза и повышенной антимикробной активности, является их относительно низкая токсичность по отношению к высшим организмам, в частности низкая гемолитическая активность создаваемых САМП. Ранее нами было показано, что САМП ЛТА по сравнению с САМП КТА обладают не только повышенной антигрибковой активностью, но и намного меньшей гемолитической актив-

ностью, поскольку в силу своего структурного строения таких пептидов (рис. 1а, 1б) содержание гидрофобных остатков у САМП ЛТА намного меньше, чем у САМП КТА [26]. Эксперименты, проведенные с лизисом эритроцитов, показали, что исследованные нами гистидин-содержащие САМП ЛТА (табл. 1 и 4) при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты, в большинстве случаев демонстрируют довольно низкую (не превышающую 10%) гемолитическую активность, за исключением пептида **F2H16**, для которого уровень лизиса эритроцитов составил 18.1% (табл. 4).

Гемолитическая активность увеличивающихся по длине САМП ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** составляет 1.2, 4.2, 6.1 и 18.1% соответственно (табл. 4), а значения  $MPK_{50}$  для этих же пептидов – 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ соответственно (табл. 3). Другими словами, в данном случае видно, что увеличение антигрибковой активности пептидов в представленном ряду сопровождается одновременно увеличением их гемолитической активности и достигает максимального значения гемолитической токсичности 18.1% у пептида **F2H16**, который в этом же ряду обладает максимальной антигрибковой активностью ( $MPK_{50} = 1.0$  мкМ) (табл. 3). Такая закономерность увеличения гемолитической и антигрибковой активности, скорее всего, связана с увеличением гидрофобности представленных пептидов

**Таблица 4.** Гемолитическая активность исследуемых пептидов

Пептиды	Гемолиз*, %
<b>F2H7</b>	1.2
<b>F2H10</b>	4.2
<b>F2H13</b>	6.1
<b>F2H16</b>	18.1
<b>H10</b>	0.4
<b>H10F2</b>	8.7
<b>P113</b>	0.1
<b>R9F2</b>	6.8

\* Гемолиз проводили при концентрации пептидов 400 мкМ в среде эритроцитов.

( $\tau = 18.2, 19.0, 19.6, 20.0$  мин соответственно) (табл. 2). Аналогичное влияние гидрофобности АМП на их антимикробную и гемолитическую активность ранее также было отмечено в литературе [14, 15, 38, 39].

Таким образом, гемолитическая активность (ГА) для увеличивающихся по длине пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16**, как и в случае их антигрибковой активности, увеличивается в ряду:

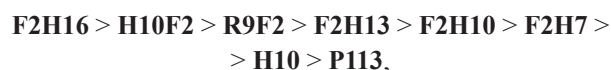


Такая же закономерность увеличения гемолитической и антигрибковой активности с увеличением гидрофобности исследуемых пептидов наблюдается и для пептидов **F2H10** и **H10F2** одинакового состава, но с разным расположением Phe-групп на концах цепи. Наиболее гидрофобный пептид **H10F2** по сравнению с пептидом **F2H10** ( $\tau = 22.5$  и  $19.0$  мин соответственно) (табл. 2) показывает как наибольшую антигрибковую ( $\text{МПК}_{50} = 0.9$  и  $1.5$  мкМ) (табл. 3), так и наибольшую гемолитическую активность ( $8.7$  и  $4.2\%$ ) (табл. 4).

Однако в некоторых случаях можно наблюдать и обратную зависимость между антибактериальной и гемолитической активностями. Так, например, видно, что наиболее активный антигрибковый пептид **H10** ( $\text{МПК}_{50} = 0.7$  мкМ) (табл. 3) в то же время обладает и наименьшей (практически нулевой) гемолитической активностью, равной  $0.4\%$ , сравнимой с общим фоном гемолиза самих эритроцитов в среде без каких-либо реагентов (табл. 4). Такая низкая гемолитическая активность пептида **H10** по сравнению с другими пептидами, вероятно, связана с отсутствием в его составе гидрофобных остатков Phe и в связи с этим с довольно низкой гидрофобностью этого пептида ( $\tau = 12.8$  мин) (табл. 2). Таким образом, гистидин-содержащий пептид **H10**, несмотря на свою относительно низкую гидрофобность, помимо своей повышенной антимикробной активности показал также и относительно низкую гемолитическую токсичность по отношению к эритроцитам.

Контрольный пептид **P113**, так же как и пептид **H10**, обладает наименьшей (практически нулевой) гемолитической активностью, равной  $0.1\%$  (табл. 4), сравнимой с общим фоном гемолиза самих эритроцитов, что также, вероятно, связано с низкой гидрофобностью этого пептида ( $\tau = 16.6$  мин) (табл. 2). Однако антигрибковая активность пептида **P113** существенно ниже, чем у пептида **H10** ( $\text{МПК}_{50} = 3.4$  и  $0.7$  мкМ соответственно) (табл. 3).

Гемолитическая активность (ГА) всех исследованных пептидов может быть представлена по возрастанию их активности в следующем ряду:



т.е. пептиды **H10** и **P113** по своей ГА в представленном ряду стоят на последнем месте и наименее токсичны по отношению к лизису эритроцитов.

Таким образом, повышенная или пониженная гемолитическая активность исследованных гистидин-содержащих пептидов не всегда коррелирует с их пониженной или повышенной антигрибковой активностью. Увеличение длины пептида приводит не только к увеличению их гидрофобности и антигрибковой активности, но также и к увеличению их гемолитической токсичности. Напротив, среди всех исследованных пептидов гистидин-содержащий пептид **H10** показал не только самую высокую антигрибковую, но и наименьшую гемолитическую активность. Описанный в литературе гистидин-богатый пептид **P113** также обладает минимальной гемолитической активностью, однако его антигрибковая активность почти в 5 раз ниже, чем у пептида **H10**. Пептиды **F2H16** и **H10F2** хотя и демонстрируют сравнительно высокую антигрибковую активность, сопоставимую с активностью пептида **H10**, но уровень их гемолитической токсичности (особенно для пептида **F2H16**) остается относительно высоким.

**Терапевтический индекс.** Увеличение антимикробной активности АМП часто сопровождается увеличением их гемолитического действия, т.е. способности разрушать эритроциты [14, 15, 40, 41]. Активный в отношении микроорганизмов препарат может оказаться, в свою очередь, также и довольно токсичным. В таком случае терапевтический потенциал антимикробных агентов оценивается на основе селективности их действия на исследуемые патогенные микроорганизмы по сравнению с аналогичным их действием на эритроциты в виде терапевтического индекса (ТИ), т.е. как отношение величины минимальной гемолитической концентрации (МГК) к величине МПК, где МГК – концентрация пептида, вызывающая лизис определенной доли свежих красных кровяных телец [26, 42].

Для оценки селективности действия пептидов нами были определены величины МГК пептидов и вычислены значения их ТИ (табл. 5). За величину МГК в нашем случае мы принимали концентрацию пептида, которая вызывала лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Поскольку уровень гемолитической активности пептида **H10** даже при максимальной его концентрации (400 мкМ) в среде приближается к нулю, а дальнейшее увеличение его концентрации приводит к снижению растворимости пептида, то подсчитать точное значение МГК, определяемую как концентрация пептида, которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток, для данного пептида путем повышения его концентрации в среде не удастся. В этом случае значение МГК для пептида **H10** оценивали как величину  $> 1000$  мкМ, а ТИ принимали как величину  $> 1400$  ( $1000/0.7 = \sim 1400$ ) (табл. 5). Аналогичный расчет использовали и при оценке селективности воздействия для пептида **P113**, который также при максимально высокой концентрации пептида 400 мкМ в среде, содержащей эритроциты, проявляет довольно низкую (практически нулевую) гемолитическую активность, равную 0.1% (табл. 4). Величину МГК для этого пептида также принимали  $> 1000$  мкМ,

**Таблица 5.** Минимальная гемолитическая концентрация (МГК) и терапевтический индекс (ТИ) исследуемых пептидов

Пептиды	МГК*, мкМ	ТИ**
<b>F2H7</b>	700	79
<b>F2H10</b>	350	233
<b>F2H13</b>	370	247
<b>F2H16</b>	60	60
<b>H10</b>	$\gg 1000$	$> 1400$
<b>H10F2</b>	200	222
<b>P113</b>	$\gg 1000$	$> 300$
<b>R9F2</b>	300	65

\* МГК – минимальная гемолитическая концентрация – такая концентрация пептида (мкМ), которая вызывает лизис 4% свежих красных кровяных клеток. Средняя ошибка приведенных значений МГК, ТИ и СГ не превышает величину 15–20%.

\*\* ТИ – терапевтический индекс для каждой культуры микроорганизмов по отдельности, выраженный в виде отношения значения МГК к МПК<sub>50</sub>. Большие значения ТИ указывают на большую селективность пептида.

а величину ТИ, соответственно, принимали  $> 300$  ( $1000/3.4 = \sim 300$ ) (табл. 5).

В случае увеличивающихся по длине пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** наблюдается повышение их антигрибковой активности и одновременное увеличение их гемолитической активности, рассчитанной как МГК (МПК<sub>50</sub> = 8.9, 1.5, 1.5 и 1.0 мкМ) (табл. 3 (МГК = 700, 350, 370 и 60 мкМ соответственно) (табл. 5). Первый из этих факторов увеличивает, а последний – снижает селективность этих препаратов. В результате селективность пептида **F2H7** (ТИ = 79) (табл. 5) с наименьшей антигрибковой активностью (МПК<sub>50</sub> = 8.9 мкМ) (табл. 3) становится сопоставимой с селективностью пептида **F2H16** (ТИ = 60) (табл. 5), обладающего максимальной в представленном ряду антигрибковой активностью (МПК<sub>50</sub> = 1.0 мкМ) (табл. 3). В то же время селективность промежуточных по своей антигрибковой активности пептидов **F2H10** и **F2H13** (МПК<sub>50</sub> = 1.5 и 1.5 мкМ) (табл. 3) становится существенно выше (ТИ = 233 и 247) (табл. 5), чем селективность для крайних по активности в этом же ряду пептидов **F2H7** и **F2H16** (ТИ = 79 и 60) (табл. 5). Другими словами, дальнейшее увеличение длины гистидин-содержащих пептидов (более чем на 16 остатков гистидина) с целью повышения их антигрибковой активности в данном случае, вероятно, нецелесообразно, поскольку гемолитическая токсичность пептидов в представленном ряду увеличивается быстрее, чем их антигрибковая активность, и, как результат, селективность таких пептидов начинает снижаться. Таким образом, в плане терапевтической значимости в представленном ряду пептидов оптимальны пептиды **F2H10** или **F2H13**, обладающие более высокой селективностью, чем более короткие или более протяженные пептиды **F2H7** или **F2H16**.

При сравнении антигрибковых и гемолитических свойства двух одинаковых по составу пептидов **F2H10** и **H10F2**, но с разным расположением гидрофобных Phe-групп на концах, видно, что более эффективен по отношению к *C. albicans* пептид **H10F2** (МПК<sub>50</sub> = 0.9 мкМ) (табл. 3), но в то же время и более токсичен по отношению к эритроцитам (МГК = 200 мкМ) (табл. 5), а менее эффективный пептид **F2H10** (МПК<sub>50</sub> = 1.5 мкМ) (табл. 3), напротив, менее токсичен (МГК = 350 мкМ) (табл. 4). В итоге селективности

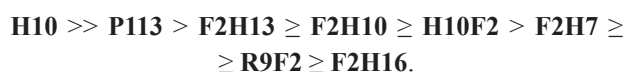
обоих пептидов сопоставимы (ТИ = 222 и 233 соответственно) (табл. 5). Тем не менее пептид **H10F2** по своей терапевтической значимости более предпочтителен, поскольку обладает большей антигрибковой активностью и для достижения соответствующего биологического эффекта требует использования меньшей концентрации в среде.

При сравнении антигрибковых и гемолитических свойств гистидин-содержащих САМП ЛТА с аналогичными по структуре пептидами, содержащими другие катионные аминокислотные остатки (например, аргинин), можно отметить, что аргинин-содержащий САМП ЛТА **R9F2** проявляет более низкую гемолитическую активность (МГК = 300 мкМ) (табл. 5) по сравнению с близким по структуре гистидин-содержащим САМП ЛТА **H10F2** (МГК = 200 мкМ) (табл. 5). Тем не менее селективность пептида **R9F2** (ТИ = 65) (табл. 5) более чем в 3 раза ниже селективности пептида **H10F2** (ТИ = 222) (табл. 5) вследствие более чем в 5 раз меньшей антигрибковой активности аргинин-содержащего пептида **R9F2** по сравнению с пептидом **H10F2** (МПК<sub>50</sub> = 4.6 и 0.9 мкМ соответственно) (табл. 3). Таким образом, гистидин-содержащий САМП ЛТА не только более активен по отношению к грибковой культуре, но и обладает большей селективностью воздействия по сравнению с аргинин-содержащим пептидом аналогичной структуры.

С точки зрения селективности воздействия особо следует обратить внимание на пептид **H10**, для которого наблюдается как наибольшая антигрибковая активность (МПК<sub>50</sub> = 0.7 мкМ) (табл. 3), так и минимальная гемолитическая токсичность (МГК > 1000 мкМ) (табл. 5). В результате селективность такого пептида среди всех исследованных пептидов максимально высокая (ТИ > 1400) (табл. 5). Пептид **P113** также обладает минимальной гемолитической токсичностью (МГК > 1000 мкМ) (табл. 5). Тем не менее антигрибковая активность пептида **P113** (МПК<sub>50</sub> = 3.4 мкМ) (табл. 3) почти в 5 раз ниже, чем активность пептида **H10**. Таким образом, хотя контрольный пептид **P113** обладает низкой гемолитической токсичностью, сопоставимой с таковой для пептида **H10**, и относительно высокой селективностью (ТИ > 300) (табл. 5), тем не менее пептид **H10** характеризуется более чем в

4 раза превосходящей селективностью воздействия (ТИ > 1400) (табл. 5).

В отношении селективности, выраженной величиной ТИ, исследованные пептиды по возрастанию значений их ТИ могут быть представлены в следующем ряду:



Исходя из такого сравнения, видно, что на первом месте по селективности воздействия стоят пептиды **H10** и **P113**, затем пептиды **F2H13**, **F2H10** и **H10F2**, на последнем месте – пептид **F2H16**.

Таким образом, скрининг антигрибковой и гемолитической активности гистидин-содержащих САМП показал, что среди всех исследованных пептидов пептид **H10** обладает не только наибольшей антимикробной и наименьшей гемолитической активностью, но и наибольшей селективностью (ТИ > 1400), превосходящую более чем в 4 раза селективность известного из литературы гистидин-богатого антигрибкового пептида **P113**. Пептид **H10** может быть представлен как один из перспективных антигрибковых пептидных препаратов не только в плане его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, его высокой терапевтической значимости, но и в плане экономичности его синтеза по сравнению с другими представленными пептидами, в том числе пептидом **P113**, поскольку аминокислотная последовательность пептида **H10** гомогенна и состоит лишь из одних аминокислотных остатков гистидина. Пептиды **F2H13**, **F2H10** и **H10F2** обладают сопоставимой друг с другом высокой селективностью (ТИ = 247, 233 и 222 соответственно) (табл. 5) и также могут использоваться для дальнейших исследований в качестве потенциальных антигрибковых пептидных препаратов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали реактивы для пептидного синтеза (Sigma, Fisher Scientific, Bachem, Protein Technologies, США); полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin, функционализированный 9-Фмос-аминоксантен-3-илоксильным

фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия); защищенные аминокислотные мономеры (Protein Technologies, США); конденсирующий реагент HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат (кат. № 023926, Oakwood Products Inc., США).

**Синтез антимикробных пептидов.** Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [33] аналогично опубликованной ранее схеме [25] на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США). Содержание основного вещества в синтезированных пептидах по данным офВЭЖХ составляло не менее 95%.

**Штамм условно-патогенного гриба *Candida albicans*** ЭМТК 34 поддерживали и нарабатывали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

**Образец крови** для получения эритроцитов был предоставлен медицинской лабораторией Гемотест (г. Новосибирск).

**Аналитическую офВЭЖХ** проводили на хроматографе LC-20 AD (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония) на колонке Gemini 5 мкм NX-C18, 110 Å, 4.6 × 250 мм (Phenomenex Inc., США), уравновешенной 0.1%-ным раствором TFA, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0–30% в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекция при длине волны 210, 220, 240 и 260 нм.

**Молекулярные массы пептидов** (табл. 2) определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI-MS (LC/MS XCT Ultra, Agilent Technologies, США) в Центре масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

**Антимикробная активность пептидов.** Растворы пептидов определенной концентрации для оценки антимикробной активности готовили из сухих навесок. Для пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2** и **R9F2**, которые содержали по два остатка Phe, дополнительно проводили определение концентрации путем измерения поглощения в ближней УФ-области

спектра с использованием значения молярного коэффициента поглощения при длине волны 260 нм, равного 330 л моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>, который ранее был определен, исходя из соответствующих растворов пептидов, приготовленных из сухих навесок. Исходные растворы пептидов с концентрацией 1–2 мМ хранили при –15°C в темноте не более месяца. Непосредственно перед экспериментом растворы разбавляли до нужной концентрации средой Сабуро. Исходная концентрация пептидов для приготовления проб для дальнейшего испытания их гемолитической активности составляла 2–4 мМ в воде.

Для работы использовали взвесь ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности при длине волны 595 нм.

Для оценки антигрибкового действия пептидов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми пептидными препаратами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры *C. albicans* ресуспендировали в среде Сабуро, доводя количество микроорганизмов до посеваемой дозы ~5 × 10<sup>5</sup> КОЕ/мл. В лунки последовательно вносили раствор исследуемых препаратов, а затем клеточную суспензию в соотношении 1 : 9 по объему (общий объем 200 мкл) в конечных концентрациях 0.3–50 мкМ. В качестве отрицательного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем среды Сабуро. В качестве положительного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем водных растворов ХГ или AgNO<sub>3</sub> в соответствующих разведениях, так же как и для пептидов, в конечных концентрациях 0.3–50 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37°C и 560 об/мин на шейкер-инкубаторе (Kuhner LT-X, АБТЕК, Россия). В нулевой точке и через 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч после начала инкубации измеряли оптическую плотность суспензии на планшетном спектрофотометре iMark™ (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм. Результаты выражали в виде среднего значения оптической плотности клеточной суспензии в трех независимых экспериментах, выполненных в двух повторах. Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных)

при этом не превышала 15–30%. Стандартное отклонение ( $S$ ) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}$$

где  $n$  – число измерений,  $x_i$  –  $i$ -тый элемент выборки,  $x_m$  – среднее арифметическое значение выборки.

**Расчет МПК<sub>50</sub>.** Исходя из полученных средних значений оптической плотности суспензий клеточных культур, определяли величины относительной степени роста культуры микробных клеток ( $N_p/N_0$ ) в виде отношения оптической плотности микробных частиц после добавления пептидного препарата ( $N_p$ ) к оптической плотности в контрольной культуре ( $N_0$ ). Концентрацию пептида, при которой величина относительной степени роста культуры микробных клеток составляла 50%, определяли по кривым зависимости величины относительной степени роста культуры микробных клеток ( $N_p/N_0$ ) в процентах от концентрации пептидов [25, 43].

**Фотометрический метод оценки гемолитической активности антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека.** Гемолитическую активность исследуемых пептидов тестировали в отношении свежих эритроцитов человека согласно ранее опубликованным методикам [25, 42, 44]. Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны 540 нм в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии эритроцитов, поскольку при разрушении эритроцитов вышедший из клеток гемоглобин придает среде характерную красную окраску, сохраняющуюся после осаждения эритроцитов. Свежие эритроциты человека трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS: 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7.4), содержащим 173 мМ NaCl и 2.7 мМ KCl. К 80 мкл суспензии эритроцитов в PBS добавляли растворы пептидов в виде двукратных серийных разведений до конечного объема 100 мкл и концентрации суспензии эритроцитов 4% (по объему, за 100% принимали объем суспензии осажденных центрифугированием эритроцитов), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После центрифугирования и отделения осадка измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. За 100% гемолиза принимали оптическую плотность раствора,

полученную при действии на эритроциты 10%-ного раствора тритона X-100. За 0% принимали оптическую плотность, полученную при действии на эритроциты “холостого” буферного раствора, не содержащего пептидных проб. Гемолитический анализ проводили дважды с использованием одного образца крови человека. Данные представлены как среднее значение ± стандартные отклонения трех независимых экспериментов. Средняя ошибка эксперимента при этом не превышала 15–20%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были сконструирован и синтезирован ряд новых гистидин-содержащих САМП ЛТА **F2H7**, **F2H10**, **F2H13**, **F2H16** и **H10F2** с “линейным” типом амфипатичности, а также неамфифильный по своей структуре пептид **H10**, не имеющий гидрофобных остатков и содержащий исключительно относительно гидрофильные остатки гистидина. Исследована антигрибковая и гемолитическая активность синтезированных пептидов. Проведено сравнение полученных результатов с аналогичными данными для известного из литературы гистидин-богатого 12-звенного антигрибкового пептида **P113** (AKRHHGYKRKFH) (**2020-2654**) – потенциального лекарственного препарата под названием **PAC-113**, одного из наиболее коротких и активных аналогов природного антигрибкового пептида Hst 5.

Показано, что представленные гистидин-содержащие САМП ЛТА способны эффективно подавлять рост условно-патогенных грибов *Candida albicans* и обладают низкой гемолитической активностью, в большинстве случаев не превышающей 10% даже при их относительно высокой (400 мкМ) концентрации в среде, содержащей эритроциты.

Антигрибковая активность исследованных пептидов возрастает с увеличением количества остатков гистидина в их составе, достигая максимального значения для гистидин-содержащего пептида **F2H16** (МПК<sub>50</sub> = 1.0 мкМ).

Показано, что с увеличением длины цепи пептидов растет также их гемолитическая токсичность. В отношении терапевтической значимости оптимальными в представленном ряду гистидин-содержащих САМП ЛТА оказались пептиды **F2H10** и **F2H13**, обладающие более

высокой селективностью, чем короткий или более протяженный пептиды **F2H7** или **F2H16**. Терапевтический индекс (ТИ) для этих пептидов составил 233, 247, 79 и 60 соответственно.

Гистидин-содержащие производные пептидов с гидрофобными остатками Phe на *N*-конце пептида (**F2H10**) по сравнению с аналогичными пептидами одинакового состава, но содержащими остатки Phe на *C*-конце (**H10F2**), обладают меньшей гидрофобностью, проявляют меньшую антигрибковую активность и меньшую гемолитическую токсичность.

Показано, что декагистидиновый пептид, не содержащий остатков Phe (**H10**), обладает еще большей антигрибковой активностью ( $МПК_{50} = 0.7$  мкМ), чем аналогичные пептиды **F2H10** и **H10F2** с остатками Phe на *C*- или *N*-концах ( $МПК_{50} = 1.5$  и  $0.9$  мкМ соответственно). Этот факт для нас оказался неожиданным, поскольку, согласно литературным данным, механизм действия АМП, в том числе и гистидин-богатых пептидов, предполагает наличие у пептида амфифильности, которая необходима для взаимодействия АМП с клеточной мембраной микроорганизмов [14–16, 28].

Вероятно, в данном случае взаимодействие гистидин-содержащих САМП с клеточной мембраной и клеточными стенками грибов мало связано с амфипатичностью пептидов, а преимущественно обусловлено рецептор-опосредованными взаимодействиями, связанными с наличием на поверхности клеток грибов рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам, таких как, например, белки клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2) [28, 32, 35, 36].

Пептид **H10** по своей антигрибковой активности оказался эффективнее не только всех остальных гистидин-содержащих пептидов, в том числе и пептида **F2H16** с 16 остатками гистидина, но и в 4–5 раз эффективнее антигрибкового пептида **P113** (AKRHNGYKRKFN) (**2020-2654**) ( $МПК_{50} = 3.4$  мкМ) – короткого активного фрагмента природного Hst 5, хорошо известного из литературы.

Вероятно, три остатка His в составе пептида **P113** недостаточны для эффективного взаимодействия с рецепторами, и электростатические взаимодействия с катионными аминокислотными остатками Arg и Lys в этом случае лишь дополняют

рецептор-опосредованные взаимодействия, но не позволяют при этом достичь той антигрибковой активности, как у пептида **H10**, содержащего все десять остатков His.

На примере исследованных пептидов **F2H7**, **F2H10**, **F2H13** и **F2H16** было показано, что увеличение количества остатков His в пептидах действительно последовательно увеличивает их антигрибковую активность.

Показано, что, благодаря своей относительно низкой гемолитической и высокой антигрибковой активности, представленные гистидин-содержащие САМП ЛТА **F2H10**, **F2H13**, **F2H16**, **H10F2** обладают относительно высокими значениями ТИ (ТИ > 60).

Среди всех исследованных пептидов **H10** и **P113** обладают минимальными (практически нулевыми) значениями гемолитической активности.

Вследствие своей более высокой антигрибковой активности селективность пептида **H10** (ТИ > 1400) превышает селективность пептида **P113** (ТИ > 340) более чем в 4 раза.

Таким образом, скрининг антигрибковой и гемолитической активности гистидин-содержащих САМП показал, что среди всех исследованных пептидов **H10** обладает не только наибольшей антимикробной и наименьшей гемолитической активностью, но и наибольшей селективностью (ТИ > 1400), превосходящей более чем в 4 раза селективность известного из литературы гистидин-богатого антигрибкового пептида **P113**.

Пептид **H10** может быть представлен как один из перспективных антигрибковых пептидных препаратов не только благодаря его высокой антигрибковой активности, низкой гемолитической токсичности и, соответственно, высокой терапевтической значимости, но и вследствие экономичности его синтеза по сравнению с другими исследованными пептидами, в том числе пептидом **P113**, поскольку аминокислотная последовательность пептида **H10** гомогенна и состоит лишь из аминокислотных остатков гистидина.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Штаммы микроорганизмов взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН № 121031300042-1.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B.* // Clin. Infect. Dis. 2004. V. 39. P. 309–317.  
<https://doi.org/10.1086/421946>
2. *Омельчук О.А., Тевяшова А.Н., Щекотихин А.Е.* // Успехи химии. 2018. Т. 87. С. 1206–1225.  
<https://doi.org/10.1070/RCR4841>
3. *Perlin D.S.* // Clin. Infect. Dis. 2015. V. 61. P. S612–S617.  
<https://doi.org/10.1093/cid/civ791>
4. *Whaley S.G., Berkow E.L., Rybak J.M., Nishimoto A.T., Barker K.S., Rogers P.D.* // Front. Microbiol. 2017. V. 7. P. 2173.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
5. *Peschel A., Sahl H.G.* // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 529–536.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
6. *Bahar A.A., Ren D.* // Pharmaceuticals (Basel). 2013. V. 6. P. 1543–1575.  
<https://doi.org/10.3390/ph6121543>
7. *Chung P.Y., Khanum R.J.* // Microbiol. Immunol. Infect. 2017. V. 50. P. 405–410.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
8. *Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H.* // J. Antimicrob. Chemother. 2014. V. 69. P. 121–132.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt322>
9. *Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 229–248.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162016030055>
10. *Mookherjee N., Hancock R.E.* // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 922–933.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
11. *Navon-Venezia S., Feder R., Gaidukov L., Carmeli Y., Mor A.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. P. 689–694.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.689-694.2002>
12. *Ajingi Ya.S., Jongruja N.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 463–479.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162020040044>
13. *Deslouches B., Hasek M.L., Craigo J.K., Steckbeck J.D., Montelaro R.C.* // J. Med. Microbiol. 2016. V. 65. P. 554–565.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000258>
14. *Liu X., Cao R., Wang S., Jia J., Fei H.* // J. Med. Chem. 2016. V. 59. P. 5238–5247.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02016>
15. *Hollmann A., Martínez M., Noguera M.E., Augusto M.T., Disalvo A., Santos N.C., Semorile L., Maffia P.C.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2016. V. 141. P. 528–536.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.003>
16. *Clark S., Jowitt T.A., Harris L.K., Knight C.G., Dobson C.B.* // Commun. Biol. 2021. V. 4. P. 605.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02137-7>
17. *Dinh T.T.T., Kim D.-H., Lee B.-J., Kim Y.-W.* // Bull. Korean Chem. Soc. 2014. V. 35. P. 3632–3636.  
<https://doi.org/10.5012/BKCS.2014.35.12.3632>
18. *Tew G.N., Liu D., Chen B., Doerksen R.J., Kaplan J., Carroll P.J., Klein M.L., de Grado W.F.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 5110–5114.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.082046199>
19. *Javadpour M.M., Juban M.M., Lo W.C., Bishop S.M., Alberty J.B., Cowell S.M., Becker C.L., McLaughlin M.L.* // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3107–3113.  
<https://doi.org/10.1021/jm9509410>
20. *Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 12316–12329.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.m413406200>
21. *Wiradharma N., Sng M., Khan M., Ong Z.Y., Yang Y.Y.* // Macromol. Rapid Commun. 2013. V. 34. P. 74–80.  
<https://doi.org/10.1002/marc.201200534>
22. *Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // Biopolymers. 2008. V. 90. P. 369–383.  
<https://doi.org/10.1002/bip.20911>
23. *Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X.* // Protein Cell. 2010. V. 1. P. 143–152.  
<https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
24. *Schiffer M., Edmundson A.B.* // Biophys. J. 1967. V. 7. P. 121–135.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)



25. Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 681–690.  
<https://doi.org/10.1134/S106816202103002X>
26. Amirkhanov N.V., Bardasheva A.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 937–948.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162022050041>
27. Rothstein D.M., Spacciapoli P., Tran L.T., Xu T., Roberts F.D., Serra M.D., Buxton D.K., Oppenheim F.G., Friden P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. V. 45. P. 1367–1373.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1367-1373.2001>
28. Cheng K.T., Wu C.L., Yip B.S., Chih Y.H., Peng K.L., Hsu S.Y., Yu H.Y., Cheng J.W. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2654.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21072654>
29. Zolin G.V.S., Fonseca F.H.D., Zambom C.R., Garrido S.S. // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1209.  
<https://doi.org/10.3390/biom11081209>
30. Helmerhorst E.J., Hof W.V., Breeuwer P., Troxler R.F., Amerongen A.V.N., Oppenheim F.G. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 5643–5649.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008229200>
31. Oppenheim F.G., Xu T., McMillian F.M., Levitz S.M., Diamond R.D., Offner G.D., Troxler R.F. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 7472–7477.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286634/>
32. Rautenbach M., Troskie A.M., Vosloo J.A. // Biochimie. 2016. V. 130. P. 132–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.013>
33. Chan W.C., White P.D. // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford: IRL Press, 2000. P. 64–66.
34. Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 833–841.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060037>
35. Konakbayeva D., Karlsson A.J. // Curr. Opin. Biotechnol. 2023. V. 81. P. 102926.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102926>
36. Puri S., Edgerton M. // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 958–964.  
<https://doi.org/10.1128/ec.00095-14>
37. Jang W.S., Li X.S., Sun J.N., Edgerton M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 497–504.  
<https://doi.org/10.1128/aac.01199-07>
38. Cheng Q., Zeng P. // Curr. Pharm. Des. 2022. V. 28. P. 3527–3537.  
<https://doi.org/10.2174/1381612828666220902124856>
39. Wieprecht T., Dathe M., Epand R.M., Beyermann M., Krause E., Maloy W.L., MacDonald D.L., Bienert M. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12869–12880.  
<https://doi.org/10.1021/bi971398n>
40. Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Bienert M. // FEBS Lett. 1997. V. 403. P. 208–212.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00055-0)
41. Okorochenkova S.A., Zheltukhina G.A., Nebol'sin V.E. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2011. V. 5. P. 95–102.  
<https://doi.org/10.1134/S1990750811020120>
42. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 105–113.  
<https://doi.org/10.1002/psc.2732>
43. Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 492–503.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162018050035>
44. Jacobsen F., Mohammadi-Tabrisi A., Hirsch T., Mittler D., Mygind P.H., Sonksen C.P., Raventos D., Kristensen H.H., Gatermann S., Lehnhardt M., Daigeler A., Steinau H.U., Steinstraesser L. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 59. P. 493–498.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl513>

## Synthetic Antimicrobial Peptides.

### V. Histidine-containing Antifungal Peptides with a “Linear” Type of Amphipathicity

N. V. Amirkhanov\*, #, A. V. Bardasheva\*, V. N. Silnikov\*, and N. V. Tikunova\*

# Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

\* Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS,  
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A number of histidine-containing synthetic antifungal peptides with a “linear” type of amphipathicity (SAMP LTA) (**F2H<sub>x</sub>**, **H10F2**, **H10**, where  $x = 7, 10, 13$  and  $16$ ) have been synthesized and studied. Biological screening of such histidine-containing peptides for their antifungal and hemolytic activity was carried out. It has been shown that the presented histidine-containing SAMP LTAs are capable of effectively inhibiting the growth of opportunistic fungi *Candida albicans* and have low hemolytic activity in most cases not exceeding 10% even at their relatively high concentration of 400  $\mu\text{M}$  in a medium containing erythrocytes. The antifungal activity of the studied peptides increases with increasing histidine residues in their composition, reaching the maximum value for the histidine-containing peptide **F2H16** ( $\text{MIC}_{50} = 1.0 \mu\text{M}$ ). It has been shown that as the chain length of peptides increases, their hemolytic toxicity also increases. In terms of therapeutic significance, the optimal peptides in the presented series of peptides were **F2H10** and **F2H13**, which have higher selectivity than the short or longer peptides **F2H7** or **F2H16**. The therapeutic index (TI) for these peptides was 233, 247, 79 and 60, respectively. It has been shown that histidine-containing derivatives of peptides with phenylalanine residues at the *N*-terminus of the peptide (**F2H10**) are less effective compared to similar peptides (**H10F2**) containing phenylalanine residues at the *C*-terminus. Among all the studied peptides, the most active was the **H10** peptide ( $\text{MIC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$ ), which does not contain phenylalanine residues, which in its antifungal activity is not only more effective than all other histidine-containing peptides, including the **F2H16** peptide with 16 histidine residues, but also 4-5 times more effective than the antifungal peptide **P113** ( $\text{MIC}_{50} = 3.4 \mu\text{M}$ ), a short active fragment of natural histatin 5, well known in the literature. Due to its relatively low hemolytic and high antifungal activity, the presented histidine-containing SAMP LTAs have relatively high TI values, more than 60. Among all the studied peptides, peptides **H10** and **P113** have minimal, almost zero, hemolytic activity. However, due to its higher antifungal activity, the selectivity of peptide **H10** ( $\text{TI} > 1400$ ) exceeds that of peptide **P113** ( $\text{TI} > 340$ ) by more than 4 times. Thus, peptide **H10**, due to its high antifungal activity, low hemolytic toxicity and, accordingly, high therapeutic significance, can be used as a promising antifungal peptide drug.

*Keywords:* synthetic antimicrobial peptides, amphiphilicity, “linear” type of amphipathicity, “circular” type of amphipathicity, histidine-containing peptides, P113 peptide, antifungal activity, *Candida albicans*, hemolytic activity, selectivity