

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-141

**СОЗДАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО СКРИНИНГА КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ\*****DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR TARGETED ANTIMICROBIAL PEPTIDE COMPOUNDS COMBINATORIAL LIBRARIES SCREENING**А. И. Калганова<sup>1</sup>, С. О. Пипия<sup>1</sup>, И. В. Смирнов<sup>1,2</sup>, С. С. Терехов<sup>1</sup><sup>1</sup>*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*<sup>2</sup>*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*A. I. Kalganova<sup>1</sup>, S. O. Pipyi<sup>1</sup>, I. V. Smirnov<sup>1,2</sup>, S. S. Terekhov<sup>1</sup><sup>1</sup>*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University*

✉ kalganovanas@ibch.ru

**Аннотация**

Антибиотикорезистентность является серьезной проблемой современного здравоохранения. На данный момент существует ограниченное число платформ для поиска новых антимикробных препаратов, активных в отношении бактерий с резистентностью к антибиотикам. Разрабатываемая технология позволит проводить скрининг высокопредставительных библиотек измененных природных соединений, что дает возможность усилить их эффективность и / или расширить спектр активности.

**Abstract**

Antibiotic resistance is a serious problem in modern healthcare. Currently, there are a limited number of platforms for development of new antimicrobial drugs active against antibiotic-resistant bacterial strains. The technology will make it possible to screen entire libraries of modified natural compounds, which will enhance their effectiveness and / or expand their spectrum of activity.

Исследование сосредоточено на разработке скрининг-платформы для поиска соединений активных в отношении социально значимых ESCAPE-патогенов. Рассматриваемые соединения представляют собой отдельные варианты из комбинаторной библиотеки ДНК-кодируемых антимикробных веществ. Платформа позволит отбирать молекулы-кандидаты с различными механизмами действий, а также осуществлять направленную селекцию активных вариантов при изменении условий культивирования бактериальных возбудителей на разных раундах отбора. Одним из направлений работы является обеспечение возможности обнаружения адъювантной активности нескольких соединений. Уникальность разрабатываемой технологии заключается в том числе в том, что она позволит осуществлять поиск соединений, потенцирующих действие антимикробных пептидов для преодоления антибиотикорезистентности устойчивых микроорганизмов.

Под пептидными матрицами подразумевается широкое разнообразие антимикробных пептидов (АМП) с измененной последовательностью. Использование природных АМП в качестве исходной матрицы для последующих модификаций не ново, однако получение комбинаторных библиотек с прямым отбором против ESCAPE-бактериальных патогенов показано не было. На основе полученных ранее данных об эффективности природных антимикробных соединений выбраны пептидные матрицы для создания библиотек искусственного разнообразия АМП с помощью методов рационального дизайна.

В данной работе АМП нарабатываются путем гетерологической экспрессии в дрожжевых клетках. Недавняя публикация лаборатории продемонстрировала возможность использования в качестве продуцента антимикробных соединений дрожжей *Pichia pastoris* [1–3]. Использование рекомбинантных продуцентов АМП позволяет анализировать до 10<sup>6</sup> вариантов соединений в ходе одного раунда скрининга.

Важной частью работы является этап оптимизации условий формирования стабильных эмульсий и последующего культивирования клеток. Возможность инкапсуляции и скрининга не отдельных штаммов, а целой микробиоты с использованием капельной микрофлюидики для функционального профилирования была показана нашей лабораторией ранее [4, 5].

\* Работа выполняется при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2024-536).

© А. И. Калганова, С. О. Пипия, И. В. Смирнов, С. С. Терехов, 2024

Мы используем два подхода. Первый заключается в кокультивации дрожжевых клеток-продуцентов АМП и бактерий-мишеней, конститутивно-продуцирующих флуоресцентный белок внутри двойной эмульсии. В качестве аналитического сигнала используется флуоресценция живых бактериальных клеток. Во втором методе также производится кокультивация тех же клеток, но в формате однократной эмульсии по принципу витальной селекции. Активные кандидаты отбираются с помощью FACS или высева на селективную питательную среду для первого и второго подходов соответственно.

После анализа активности индивидуальных клеток выделяется геномная ДНК и затем секвенируется по следовательности молекул-кандидатов, после чего необходимо получить путем химического синтеза и протестировать его активность повторно.

С помощью платформы произведен скрининг разработанных комбинаторных библиотек и получено несколько молекул-кандидатов, проявляющих антимикробную активность в отношении ESKAPE-патогенов. Результаты демонстрируют перспективность использования данной платформы для эффективного отбора ДНК-кодируемых молекул.

### Литература

1. Pipiya S.O., Mokrushina Y.A., Gabibov A.G. et al. Selective Eradication of *Staphylococcus aureus* by the Designer Genetically Programmed Yeast Biocontrol Agent // *Antibiotics (Basel)*. 2020. Vol. 9 (9). P. 527.
2. Pipiya S.O., Kudzhaev A.M., Mirzoeva N.Z. et al. Bioengineering the Antimicrobial Activity of Yeast by Recombinant Thanatin Production // *Antibiotics (Basel)*. 2023. Vol. 12 (12). P. 1719.
3. Pipiya S.O., Mirzoeva N.Z., Baranova M.N. et al. Creation of recombinant biocontrol agents by genetic programming of yeast // *Acta Naturae*. 2023. Vol. 15 (1). P. 74–80.
4. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V. et al. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. Vol. 114 (10). P. 2550–2555.
5. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V. et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018. Vol. 115 (38). P. 9551–9556.