

Wydział Farmaceutyczny



**Badanie krótkich lipopeptydów pod kątem ich potencjalnego
zastosowania w profilaktyce i zwalczaniu infekcji oka związanych
ze stosowaniem soczewek kontaktowych**

Magdalena Maciejewska

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry i Zakładu
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Promotor
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Promotor pomocniczy
Dr n. farm. Małgorzata Paduszyńska

Gdańsk 2020

STRESZCZENIE

Soczewki kontaktowe są stosowane przez miliony ludzi na całym świecie. Aplikowane bezpośrednio na gałkę oczną stanowią dokładną i komfortową metodę korekcji wad wzroku. Jak każdy biomateriał soczewki kontaktowe są podatne na adhezję drobnoustrojów. Niestety, mimo znacznego postępu inżynierii biomateriałowej, stosowanie soczewek kontaktowych jest jednym z głównych czynników predysponujących do rozwoju infekcji okulistycznych związanych z tworzeniem się biofilmu.

Standardową metodą leczenia infekcji okulistycznych jest antybiotykoterapia. Jednak nadużywanie związków przeciwdrobnoustrojowych o szerokim spektrum działania indukuje rozwój szczepów opornych wobec stosowanych terapeutów. Antybiotykoterapia wykazuje także ograniczoną skuteczność w infekcjach oka związanych z tworzeniem się biofilmu. Zakażenia związane z biofilmem stanowią wyzwanie dla dzisiejszej medycyny i wskazują potrzebę opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowych materiałów odpornych na kolonizację drobnoustrojów, a także nowych związków aktywnych wobec struktury biofilmu. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) i ich analogi są intensywnie badane w tym kierunku ze względu na ich obiecujące działanie przeciwdrobnoustrojowe i szerokie spektrum działania. Niespecyficzny mechanizm działania oparty na interakcjach z błoną komórkową, zmniejsza ryzyko rozwoju oporności drobnoustrojów.

Badania nad cechami determinującymi aktywność przeciwdrobnoustrojową AMPs doprowadziły do zaprojektowania krótkich lipopeptydów. Jest to grupa wysoce skutecznych związków wykazujących podobieństwo strukturalne do endogennych antybiotyków peptydowych poprzez sumaryczny ładunek dodatni oraz amfipatyczność. Ich charakterystyczną cechą jest krótka sekwencja aminokwasowa połączona z kwasem tłuszczowym. Zaletą zaprojektowanych w ten sposób związków jest istotnie krótszy czas syntezy i niższe koszty produkcji.

Prowadzone badania nad krótkimi lipopeptydami pozwoliły zidentyfikować związki prezentujące aktywność w stosunku do wieloopornych szczepów bakteryjnych zarówno w formie wolnoptywającej, jak i w postaci biofilmu. Obecnie praktyczne zastosowanie tych związków w terapii jest jednak nadal ograniczone ze względu na ich potencjalną toksyczność i alergenność. W związku z powyższym podejmowane są próby optymalizacji ich właściwości biologicznych.

Przedmiotem badań pracy doktorskiej były związki peptydowe, które syntetyzowano manualnie na stałym nośniku polimerowym. Otrzymano 9 syntetycznych krótkich lipopeptydów (C_{12} -KKC-NH₂, C_{12} -KR-NH₂, C_{14} -KKC-NH₂, C_{14} -KR-NH₂, C_{16} -KGGK-NH₂, C_{16} -KKC-NH₂, C_{14} -KKK-NH₂, C_{16} -KR-NH₂, $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂) oraz dwa peptydy naturalnie występujące w organizmach płazów (temporyna A, citropina 1.1).

W pierwszym etapie badań związki oceniano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej w stosunku do referencyjnych szczepów uznanych za czynniki etiologiczne infekcji okulistycznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych (SA, SE, EF, EC, PA, PM). Jako związki referencyjne do badań wykorzystano dwa związki przeciwdrobnoustrojowe stosowane w konwencjonalnej terapii tych infekcji (cyprofloksacyna, chloramfenikol). Metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost hodowli płynnych (MIC) minimalne stężenie eradykujące biofilm (MBEC) oraz minimalne stężenie hamujące biofilm (MBFIC). Oznaczenia aktywności związków wobec biofilmu (antybiofilmowej) wykonano na powierzchni polistyrenowej i soczewek kontaktowych.

W kolejnym etapie za pomocą testu MTT przeprowadzono ocenę toksyczności związków peptydowych i związków referencyjnych w stosunku do linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT). Na podstawie badań mikrobiologicznych oraz oznaczeń cytotoksyczności wytypowano związek o najwyższym potencjale - $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że peptydy są aktywne w stosunku do wszystkich badanych referencyjnych szczepów odpowiedzialnych za rozwój infekcji odsoczewkowych. Związki odniesienia prezentowały jednak wyższą skuteczność wobec hodowli płynnych. Większość badanych związków peptydowych prezentowała silniejsze działanie wobec biofilmu bakterii Gram-dodatnich, jednak biofilm formowany przez szczepy bakteryjne na powierzchni soczewek kontaktowych okazał się mniej wrażliwy na działanie większości badanych związków. Poprzez suplementację pożywki hodowlanej większością badanych związków peptydowych, rozwój biofilmu tworzonego przez bakterie Gram-dodatnie na obu badanych powierzchniach został skutecznie zredukowany. Pomimo zaobserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, związki peptydowe z wyjątkiem lipopeptydu 9 - $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ prezentowały aktywność toksyczną *in vitro* wobec keratynocytów HaCaT w stężeniach niższych niż stężenia aktywne mikrobiologicznie.

Dalsze etapy pracy miały na celu ocenę potencjalnego zastosowania lipopeptydu $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ w profilaktyce lub leczeniu infekcji okulistycznych związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych. W tym celu dokonano oceny wpływu związku na

aktywność metaboliczną biofilmu wytworzonego na powierzchni polistyrenowej i soczewkach kontaktowych, a następnie dokonano oceny skuteczności dostępnych na rynku płynów do soczewek po suplementacji lipopeptydem. Wykorzystując metodę obliczeniową za pomocą aplikacji Toxtree oceniono także potencjał drażniącego na oko.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że krótki lipopeptyd prezentuje silniejsze właściwości anty-biofilmowe w porównaniu do referencyjnych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz wykazuje zdolność do wzmocnienia aktywności płynów do soczewek w niskich stężeniach. Wyniki metody obliczeniowej sugerują, że lipopeptyd nie będzie wywierał działania drażniącego w stosunku do oka ludzkiego. Ze względu na wysoką aktywność mikrobiologiczną zarówno wobec utworzonego jak i zapobieganiu tworzenia się biofilmu bakteryjnego oraz działanie synergistyczne z płynami do soczewek przy stosunkowo niskiej toksyczności wobec ludzkich komórek lipopeptyd $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ powinien zostać poddany dalszym badaniom pod kątem wykorzystania w terapii oraz profilaktyce infekcji okulistycznych związanych z noszeniem soczewek kontaktowych. Związek $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ jest przykładem pomyślnie zaprojektowanego i zsyntetyzowanego nowego związku w oparciu o AMPs.

SUMMARY

Contact lenses are used by millions of people around the world. Applied directly to the eyeball, they are an accurate and comfortable method of correcting vision defects. Like any biomaterial, contact lenses are susceptible to microbial adhesion. Unfortunately, despite significant advances in biomaterial engineering, the use of contact lenses is one of the main factors predisposing to the development of ophthalmic infections associated with biofilm formation.

The standard treatment of ophthalmic infections is antibiotic therapy. However, the abuse of broad-spectrum systemic antimicrobial compounds resulted in induction of antibiotic-resistant strains. Antibiotic therapy also shows limited effectiveness in eye infections associated with biofilm formation. Biofilm-related infections pose a challenge to modern medicine and indicate the need for new therapeutic strategies.

Intensive research is carried out on the development of new materials resistant to the colonization of microorganisms, as well as new compounds active against the mature structure of the biofilm. Antimicrobial peptides (AMPs) and their analogues have been extensively examined due to their promising antimicrobial activity against a wide range of bacteria. The non-specific mechanism of action, based on interactions with the cell membrane, reduces the risk of the development of microbial resistance.

Research on the characteristics determining the antimicrobial activity of AMPs led to the design of short lipopeptides. It is a group of highly effective compounds showing structural similarity to endogenous peptide antibiotics through the total positive charge and amphipathicity. Their characteristic feature is a short amino acid sequence combined with fatty acid. The advantage of compounds designed in this way is significantly shorter synthesis time and lower production costs.

The research conducted on short lipopeptides allowed to identify compounds presenting activity against multi-resistant bacterial strains both planctonic and biofilm form. Currently, the practical use of these compounds in therapy is still limited due to their potential toxicity and allergenicity. Therefore, attempts are made to optimize their biological properties.

The subject of the dissertation was peptide compounds, which were synthesized manually through the solid-phase method. Nine synthetic short lipopeptides (C_{12} -KKC-NH₂, C_{12} -KR-NH₂, C_{14} -KKC-NH₂, C_{14} -KR-NH₂, C_{16} -KGK-NH₂, C_{16} -KKC-NH₂, C_{14} -KKK-NH₂, C_{16} -KR-NH₂, $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂) and two peptides naturally occurring in amphibian organisms (temporin A, citropine 1.1) were obtained.

In the first stage of the study the compounds were evaluated for antimicrobial activity in relation to reference strains considered as etiological factors of ophthalmic infections associated with the use of contact lenses (SA, SE, EF, EC, PA, PM). Two antimicrobial compounds used in conventional therapy of these infections (ciprofloxacin, chloramphenicol) were used as reference compounds. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum biofilm inhibitory concentration (MBEC) and minimum biofilm inhibitory concentration (MBFIC) were determined using the serial dilution method. The determination of the activity of compounds against the biofilm (antibiofilm) was performed on the polystyrene surface and contact lenses.

In the next stage, the toxicity of peptide and reference compounds to human keratinocyte cell line (HaCaT) was assessed using the MTT. Based on microbiological tests and cytotoxicity determinations, the compound with the highest potential - $(C_{10})_2$ -K₄-NH₂ was selected.

Based on the results obtained, it was found that peptides are active against all tested reference strains responsible for the development of contact lenses-related infections. However, the reference compounds presented higher effectiveness against liquid cultures. Most of the tested peptide compounds presented a stronger effect against Gram-positive bacteria biofilm, but the biofilm formed by bacterial strains on the surface of contact lenses proved to be less sensitive to most of the tested compounds. By supplementation of the culture medium with most of the tested peptide compounds, the development of biofilm formed by Gram-positive bacteria on both tested surfaces was effectively reduced. Despite the antimicrobial activity observed, peptide compounds with the exception of lipopeptide 9 - $(C_{10})_2$ -K₄-NH₂ presented in vitro toxic activity against HaCaT keratinocytes at concentrations lower than microbiologically active ones.

Further actions were taken to assess the potential use of lipopeptide $(C_{10})_2$ -K₄-NH₂ in the prevention or treatment of ophthalmic infections associated with contact lenses. For this purpose, the effect of the compound on the metabolic activity of the biofilm produced on the polystyrene surface contact lenses was assessed and then the effectiveness of commercially available lens solutions after lipopeptide supplementation was evaluated. Using the calculation method with Toxtree application the eye irritation potential was also evaluated.

Based on the results obtained, it was found that short lipopeptide presents stronger antibiofilm properties compared to reference antimicrobial agents and has the ability to enhance the activity of lens fluids at low concentrations. The results of the calculation method suggest that lipopeptide will not have an irritating effect on the human eye. Due to its high microbiological activity against both the formed and prevented bacterial biofilm and its

synergistic effect with lens fluids at relatively low toxicity to human cells, lipopeptide $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ should be further tested for use in therapy and prevention of ophthalmic infections associated with contact lens wear. The compound $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂ is an example of a successfully designed and synthesized new compound.