GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZY

Synteza i badanie aktywności biologicznej liniowych oraz cyklicznych lipopeptydów

Damian Neubauer

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

Gdańsk 2021

STRESZCZENIE

Polimyksyny i daptomycyna są lipopeptydami, wytwarzanymi przez mikroorganizmy, stosowanymi jako tzw. antybiotyki ostatniej szansy. Zgodnie z najnowszymi danymi epidemiologicznymi zauważalna jest wyraźna tendencja do narastania oporności na te leki. W odpowiedzi na problem związany z pojawianiem się szczepów opornych, Światowa Organizacja Zdrowia w 2017 roku opublikowała listę patogenów stanowiących szczególny problem kliniczny. W związku z tym kluczowe jest opracowanie nowych skutecznych terapii. Jedną z grup związków, w której pokładane są nadzieje, są krótkie kationowe lipopeptydy (USCLs), których amfifilowe cząsteczki zawierają zasadowe reszty aminokwasowe (do 7 reszt) połączone wiązaniami peptydowymi oraz fragment lipidowy. USCLs uszkadzają błonę komórkową dzięki występowaniu oddziaływań elektrostatycznych z ujemnie naładowaną powierzchnią komórki patogenu, co w konsekwencji prowadzi do jej śmierci. Związki te wykazują wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową, aczkolwiek ich istotną wadą jest znaczna cytotoksyczność i aktywność hemolityczna. Celem pracy było zbadanie wpływu wprowadzanych modyfikacji strukturalnych USCLs na aktywność biologiczną w warunkach *in vitro*, oraz otrzymanie analogów o wyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i niższej cytotoksyczności oraz aktywności hemolitycznej niż związki wyjściowe Analizie poddano zarówno hydrofobowy jak i hydrofilowy fragment cząsteczki. Zastosowano rozgałęzione i nierozgałęzione kwasy tłuszczowe o różnej długości, zaś podczas stosowania krótszych kwasów tłuszczowych wprowadzano hydrofobową *N*-końcową resztę aminokwasową, a także zbadano wpływ substytucji reszt L-lizyny resztami L-argininy. Ponadto przeprowadzono dimeryzację związków oraz cyklizację fragmentu peptydowego za pomocą wiązania disulfidowego. Opracowane modyfikacje zaowocowały otrzymaniem analogów o zwiększonym potencjale terapeutycznym. Rozprawa doktorska została wzbogacona o analizy hydrofobowości, badania permeabilizacji błon i dynamiki molekularnej, obserwacje wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Umożliwiło to szczegółową analizę wpływu wprowadzanych modyfikacji na właściwości związków.

Słowa kluczowe: krótkie kationowe lipopeptydy; USCLs; lipopeptydy; antybiotyki; aktywność przeciwdrobnoustrojowa; cytotoksyczność; selektywność.

ABSTRACT

Polymyxins and daptomycin are lipopeptides produced by microorganisms and turned out to be very potent "drugs of last resort" against pathogens. However, according to the latest epidemiological reports there is a noticeable tendency of increasing rate of resistance. In 2017, the Worlds Health Organization, published a priority pathogen list that urgently need new antibiotics. In view of the above, the development of new antimicrobial agents seems to be fundamental. Ultrashort cationic lipopeptides (USCLs) are a class of amphiphilic compounds consisting of basic amino acids (up to seven amino acid residues) linked by amide bond with at least one lipid chain attached. These compounds are potent antimicrobial agents that hypothetically may be alternatively used to combat pathogens such as bacteria and fungi. Cationic lipopeptides disrupt the cell membrane, participate in its permeabilization, and cause cell death owing to electrostatic interactions with negatively charged pathogenic cell surface. The main shortcoming of USCLs is their relatively high cytotoxicity and hemolytic activity. To overcome those limitations, several approaches have been studied. The aims of this dissertation were to determine the effect of modification of the structure of USCLs on their *in vitro* biological activity, and simultaneously to obtain analogues with higher antimicrobial activity and lower cytotoxicity and haemolysis. Hydrophilic as well as hydrophobic part of USCLs were studied *i.e.* different length straight- and branched-chain fatty acids, shortening of the fatty acid chain and addition of hydrophobic *N*-terminal amino acid residue, and substitution of L-lysine with L-arginine. Moreover, USCLs dimerization (gemini compounds) and disulphide-cyclization of the polar head were analysed. The developed structural modifications resulted in compounds with more beneficial properties than those of reference lipopeptides. Moreover, studies were enriched with analyses of hydrophobicity, membrane permeabilization, molecular dynamics, fluorescence and transmission electron microscopy, which gave a deeper insight into how those modifications affect USCLs properties.

Key words: short cationic lipopeptides; USCLs; lipopeptides; antibiotics; antimicrobial activity; cytotoxicity; selectivity.