



Nowy peptyd antybakteryjny oraz jego zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest nowy peptyd antybakteryjny oraz zastosowanie tego nowego peptydu antybakteryjnego.

Jednym z niezwykle ważnych problemów klinicznych pojawiających się w ostatnim czasie jest występowanie oporności bakterii na klasyczne antybiotyki. Lekooporne bakterie są groźnym wyzwaniem dla mikrobiologów i lekarzy, a także przedmiotem intensywnych badań naukowych skupionych na poszukiwaniu nowych czynników, które mogłyby tę oporność przełamać. Z drugiej strony zbyt duże przetworzenie żywności, a jednocześnie dążenie do zastosowania w produkcji substancji pochodzenia naturalnego, przyczyniają się do poszukiwania nowych, bezpiecznych i skutecznych substancji antybakteryjnych, które będą jednocześnie konserwantami żywności.

Intensywne stosowanie antybiotyków doprowadziło do zwiększonej oporności mikroorganizmów na standardowo stosowane antybiotyki. W związku z tym, w dobie stale rosnącej liczby lekoopornych szczepów bakteryjnych, istotne jest poszukiwanie kolejnych substancji aktywnych w ich zwalczaniu.

Pseudomonas aeruginosa jest oportunistycznym patogenem, należącym do bakterii Gram-ujemnych, która najczęściej związana jest z zakażeniami szpitalnymi i zapaleniem płuc związanym z funkcjonowaniem respiratorów, co zostało ujawnione w publikacji F. Barbier, A. Andremont, M. Wolff, L. Bouadma. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*, 19 (2013), pp. 216-228. Zakażenia stosunkowo rzadko dotyczą osób zdrowych, ale bakteria ta

powoduje wysoką zachorowalność i śmiertelność pacjentów z mukowiscydozą oraz osób z obniżoną odpornością, co zostało opisane w publikacji R.T. Sadikot, T.S. Blackwell, J.W. Christman, A.S. Prince. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 171 (2005), pp. 1209-1223. Odpowiada ona również, za około 5% infekcji u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc – POChP i wiąże się ze zwiększoną śmiertelnością chorych, co ujawniono w publikacji T.F. Murphy. *Pseudomonas aeruginosa* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*, 15 (2009), pp. 138-142. Bakteria ta odpowiedzialna jest także za wiele innych zakażeń, w tym za wywoływanie infekcji dróg oddechowych i moczowych, zakażenia ran i tkanek miękkich oraz zakażenia pacjentów z poparzeniami, co zostało przedstawione w publikacji Roulová N, Mot'ková P, Brožková I, Pejchalová M. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *J Water Health*. 2022;20(4):692–701. doi:10.2166/wh.2022.101.

W publikacjach: Pena C, Cabot G, Gomez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodriguez-Bano J, Rodriguez-Lopez F, Tubau F, Martinez-Martinez L, Oliver A, Gurgui M, Sorde R, Larrosa N, Martin C, Fontanals D, de Cueto M, Navarro MD, Torre-Cisneros J, Casal M, Lara R, Natera C, Rivero A, Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2015. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 60:539–548; Walkty A, Lagace-Wiens P, Adam H, Baxter M, Karlowsky J, Mulvey MR, McCracken M, Zhanel GG. 2017. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of

the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008–2015. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:60–63; Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, Flamm RK. 2018. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from United States medical centers stratified by infection type: results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 92:69–74

ujawniono, że w ostatnich latach obserwuje się wzrost częstości występowania wielolekoopornych i skrajnie lekoopornych szczepów *P. aeruginosa*, przy czym w niektórych regionach geograficznych wskaźniki te wynoszą od 15 do 30%. Jak opisano w publikacji ECDC. 2015. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control, większość krajów w Europie odnotowuje wskaźniki oporności powyżej 10% dla wszystkich grup środków przeciwbakteryjnych objętych nadzorem. U *P. aeruginosa* powszechna jest także oporność łączna. W 2015 roku Europejskie Centra Zapobiegania i Kontroli Chorób stwierdziły, że 13,7% izolatów *P. aeruginosa* było opornych na co najmniej trzy grupy, a 5,5% na wszystkie pięć grup środków antybakteryjnych objętych nadzorem EARS-Net, co ujawniono w publikacji ECDC. 2015. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. Jak pokazują dane ze Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, które zostały przedstawione w publikacji CDC. 2013. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. CDC, Atlanta, GA, wielolekooporne szczepy *P. aeruginosa* są przyczyną 13% ciężkich zakażeń szpitalnych.

Jak ujawniono w publikacji P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22 (2009), pp. 582-610, *P. aeruginosa* charakteryzuje się dużą zdolnością do

wykształcania oporności na wiele dostępnych obecnie antybiotyków, przez co leczenie zakażeń wywołanych przez tę bakterię jest skomplikowane. *Pseudomonas aeruginosa* wykazuje oporność na wiele antybiotyków, w tym aminoglikozydy, chinolony i β -laktamy, co ujawniono w publikacji R.E. Hancock, D.P. Speert. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*, 3 (2000), pp. 247-255, a także fluorochinolony, karbapenemy i cefalosporyny trzeciej generacji, które są preferowanymi opcjami w terapii poważnych zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne, co natomiast opisano w publikacji Imanah, E. O., Beshiru, A., & Igbinosa, E. O. (2017). Antibiogram profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from some selected hospital environmental drains. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(10), 604-609; Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug discovery today*, 24(1), 350-359. Jak przedstawiono w publikacjach Feng, W., Sun, F., Wang, Q., Xiong, W., Qiu, X., Dai, X., & Xia, P. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of global antimicrobial resistance*, 8, 142-147; Imanah, E. O., Beshiru, A., & Igbinosa, E. O. (2017). Antibiogram profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from some selected hospital environmental drains. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(10), 604-609, *P. aeruginosa* jest samoistnie oporna na wiele antybiotyków i ma zdolność do łatwego nabywania determinatów oporności na antybiotyki oraz, co opisano z kolei w publikacji Golle, A., Janezic, S., & Rupnik, M. (2017). Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. *PloS one*, 12(10), e0186736, ma ona duży potencjał do ewolucji fenotypów oporności lekowej. Światowa Organizacja Zdrowia – WHO wyróżnia oporną na karbapenemy bakterię *P. aeruginosa* jako jeden z trzech gatunków bakterii, u których istnieje krytyczna potrzeba opracowania nowych antybiotyków do leczenia zakażeń, co opisano w publikacji E. Tacconelli, N. Magrini, Y. Carmeli, S. Harbarth, G.

Kahlmeter, J. Kluytmans, M. Mendelson, C. Pulcini, N. Singh, U. Theuretzbacher. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization (2017), pp. 1-7 – http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. Nadmierne stosowanie antybiotyków w trakcie leczenia przyspiesza rozwój wielolekoopornych szczepów *P. aeruginosa*, co prowadzi do nieskuteczności dotychczasowej antybiotykoterapii wobec tego drobnoustroju, co przedstawiono w publikacji E.B. Hirsch, V.H. Tam. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res, 10 (2010), pp. 441-451.

Jak wykazano w publikacji Ibrahim D, Jabbour J-F, Kanj SS. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. Current Opinion in Infectious Diseases 2020 - Volume 33 - Issue 6 - p 464-473, *Pseudomonas aeruginosa* to jedna z najtrudniejszych do leczenia klinicznego bakteria, a stosowana antybiotykoterapia opiera się na zaleceniach European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. W publikacjach Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S i wsp. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. Cochrane Database Syst Rev 2014; 1: CD003344; Paul M, Dickstein Y, Schlesinger A i wsp. Beta-lactam versus beta-lactam-aminoglycoside combination therapy in cancer patients with neutropenia. Cochrane Database Syst Rev 2013; 6: CD003038 wykazano, że jednym z rozwiązań prowadzących do zwalczania ciężkiego zakażenia bakteryjnego jest stosowanie naraz więcej niż jednego leku przeciwbakteryjnego, którego celem jest rozszerzenie spektrum aktywności mikrobiologicznej oraz wzmocnienie działania przeciwbakteryjnego poprzez uniknięcie selekcji drobnoustrojów opornych na jeden ze stosowanych środków. W zależności od tego czy skuteczność leczenia jest większa czy mniejsza od skuteczności poszczególnych leków stosowanych oddzielnie,

wyróżnia się antagonizm, działanie addytywne oraz synergizm – działanie superaddytywne, co przedstawiono w publikacji Sopirala, M.M.; Mangino, J.E.; Gebreyes, W.A.; Biller, B.; Bannerman, T.; Balada-Llasat, J.M.; Pancholi, P. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 4678–4683.

Przykładem wykorzystania zjawiska synergizmu przy łączonym stosowaniu leków przeciwbakteryjnych jest połączenie aminoglikozydów, będących nieskutecznymi w monoterapii zakażeń *Enterococcus species* oraz antybiotyków beta-laktamowych. Zjawisko antagonizmu, pomiędzy antybiotykami hamującymi syntezę białka a upośledzającymi syntezę DNA zostało opisane w publikacji Bollenbach T. *Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. Curr Opin Microbiol* 2015; 27: 1–9, zaś pomiędzy tetracyklinami a antybiotykami beta-laktamowymi zostało opisane w publikacji Olajuyigbe OO. *Synergistic influence of tetracycline on the antibacterial activities of amoxicillin against resistant bacteria. J Pharm Allied Health Sci* 2012; 2: 12–20.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – AMP to krótkie sekwencje zbudowane z liniowo ułożonych aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Większość znanych peptydów AMP jest wytwarzana przez organizmy zwierząt, ponieważ są jednym z elementów immunologicznej obrony nieswoistej. Jednakże peptydy te występują również w jadach zwierząt, a także w bakteriach, grzybach lub roślinach. Znane są również sekwencje syntetyczne, które zostały zaprojektowane *in silico*, przy czym zdecydowana większość peptydów AMP to peptydy o długości od 20 do 50 aminokwasów, ładunku wypadkowym z zakresu od 0 do +5 i stopniu hydrofobowości w zakresie od 40 do 70%, co przedstawiono w publikacji Wang, G. *Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. Pharmaceuticals* 2013, 6, 728-758. <https://doi.org/10.3390/ph6060728>.

Peptydy AMP były szeroko testowane na wielu różnych gatunkach bakterii, przy czym w zależności od gatunku bakterii, wobec którego aktywność wykazuje peptyd, można zaplanować jego wykorzystanie. Z publikacji Morais TP, Zaini PA, Chakraborty S, Gouran H, Carvalho CP, Almeida-Souza HO, Souza JB, Santos PS, Goulart LR, Luz JMQ, Nascimento R, Dandekar AM. The plant-based chimeric antimicrobial protein SIP14a-PPC20 protects tomato against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Sci.* 2019 Mar;280:197-205. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.11.017. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30823998 znane jest zastosowanie chimericznych peptydów przeciwko *Ralstonia solanacearum*, który jest patogenem pomidorów, który wykazują minimalne stężenie hamujące, przy czym wartość MIC jest z zakresu od 25 do 100 μM . Natomiast AMP pochodzące z jadu węży mają szeroki zakres wartości MIC w zależności od gatunku bakterii, na którym dany peptyd testowano. Dla *Escherichia coli* są to wartości zaczynające się od 0,25 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla *Staphylococcus aureus* – 4 $\mu\text{g/ml}$, co przedstawiono w publikacji Pérez-Peinado, C.; Defaus, S.; Andreu, D. Hitchhiking with Nature: Snake Venom Peptides to Fight Cancer and Superbugs. *Toxins* 2020, 12, 255. <https://doi.org/10.3390/toxins12040255>. W przeprowadzonych innych badaniach, syntetyczne AMP miały właściwości hamujące względem *E. coli*, a wartość MIC najefektywniejszego z nich wynosiła 3 $\mu\text{g/ml}$, co przedstawiono w publikacji Huang, Y.-T., Kumar, S. R., Chan, H.-C., Jhan, Z.-H., Chen, D. W., & Lue, S. J. (2021). *Efficacy of antimicrobial peptides (AMPs) against Escherichia coli and bacteria morphology change after AMP exposure. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 126, 307–312. doi:10.1016/j.jtice.2021.07.003. Syntetyczne AMP testowano również względem *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus*, dla których uzyskano wartość MIC równą 125 $\mu\text{g/ml}$, co przedstawiono w publikacji Kampshoff, F.; Willcox, M.D.P.; Dutta, D. A Pilot Study of the Synergy between Two Antimicrobial Peptides and Two Common Antibiotics. *Antibiotics* 2019, 8, 60. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020060>. Zgodnie z wytycznymi AMP Database, <https://aps.unmc.edu/about>, bazy, która deponuje

peptydy antybakteryjne i antydrobnoustrojowe, za peptyd z potwierdzonymi wspomnianymi właściwościami uważa się jeżeli jego MIC jest niższe niż 100 µM lub 100 µg/ml.

Jak przedstawiono w publikacji Ibrahim D, Jabbour J-F, Kanj SS. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2020 - Volume 33 - Issue 6 - p 464-473, *Pseudomonas aeruginosa* to jedna z najtrudniejszych do leczenia klinicznego bakterii, a stosowana antybiotykoterapia opiera się na zaleceniach EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Jednym z rozwiązań prowadzących do zwalczania ciężkiego zakażenia bakteryjnego jest stosowanie naraz więcej niż jednego leku przeciwbakteryjnego, którego celem jest rozszerzenie spektrum aktywności mikrobiologicznej oraz wzmocnienie działania przeciwbakteryjnego poprzez uniknięcie selekcji drobnoustrojów opornych na jeden ze stosowanych środków, co ujawniono w publikacjach Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S i wsp. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD003344; Paul M, Dickstein Y, Schlesinger A I i wsp. Beta-lactam versus beta-lactam-aminoglycoside combination therapy in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: CD003038.

Do oportunistycznych patogenów wywołujących przewlekłe infekcje należą *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*, co znane jest z publikacji Vanderwoude J, Fleming D, Azimi S, Trivedi U, Rumbaugh KP, Diggle SP. 2020 The evolution of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* during chronic wound infection. *Proc. R. Soc.* B287:20202272. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2020.2272>. *S. aureus* jest główną przyczyną infekcji skóry i tkanek miękkich, a obserwowane zwiększanie ilości szczepów wielolekoopornych, powoduje zmniejszenie dostępnych antybiotyków, co ma bezpośredni wpływ na utrzymujący się stan zapalny i utrudnione gojenia ran, co

zostało ujawnione w publikacji Malachowa N, Kobayashi SD, Lovaglio J, DeLeo F. Mouse Model of *Staphylococcus aureus* Skin Infection. *Mouse Models of Innate Immunity* pp 139–147, Part of the *Methods in Molecular Biology* book series (MIMB, volume 1960). W publikacji Gonzalez MR, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, Raffoul W, Que Y-A, Perron K. 2016. Effect of human burn wound exudate on *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *mSphere* 1(2):e00111-15. doi:10.1128/mSphere.00111-15 ujawniono, że rany oparzeniowe to złożone mikrośrodowiska, w których infekcje patogenami bakteryjnymi, takimi jak *P. aeruginosa* lub *S. aureus*, stanowią poważny problem w leczeniu pacjentów, dlatego też duże znaczenie ma opracowanie nowych strategii leczenia infekcji bakteryjnych. Jak przedstawiono w publikacji Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br Jour Dermatol.* 2008; 158(3): 442- 455.), *Staphylococcus epidermidis* jest oportunistycznym patogenem, który w normalnych warunkach rezyduje w skórze jako komensal, ale może stać się patogenny u pacjentów z obniżoną odpornością lub kiedy bariera skórna zostanie przerwana. *S. epidermidis* może przenikać przez uszkodzony naskórek do krwioobiegu i jest najczęstszą przyczyną pierwotnej bakteriemii i zakażeń wszczepianych wyrobów medycznych, szczególnie u osób z obniżoną odpornością i noworodków, co przedstawiono w publikacji Rupp ME. Clinical characteristics of infections in humans due to *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol.* 2014; 1106: 1- 16. Zarówno w przypadku oparzeń, jak i ran pooperacyjnych, bardzo często obserwuje się infekcje wywołane przez *Staphylococcus epidermidis*, co ujawniono w publikacjach Sharma, L., Srivastava, H., Pipal, D. K., Dhawan, R., Purohit, P. M., & Bhargava, A. (2017). Bacteriological profile of burn patients and antimicrobial susceptibility pattern of burn wound isolates. *International surgery journal*, 4(3), 1019-1023 oraz Barret, J. P., & Herndon, D. N. (2003). Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plastic and reconstructive surgery*, 111(2), 744-750. Jak opisano w publikacji Burchard, K. W. (1984). *Staphylococcus epidermidis* Sepsis in Surgical Patients. *Archives of Surgery*, 119(1), 96, zakażenia te mogą

zagrozić życiu ofiar poparzeń, gdyż niejednokrotnie wywołują sepsę u hospitalizowanych pacjentów. Ponadto warto zauważyć, że szczepy *S. epidermidis* są coraz bardziej odporne na antybiotyki takie jak penicyliny, aminoglikozydy i chinolony, co opisano w publikacji Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(4): 244- 253.

Jak wykazano w publikacji Ibrahim D, Jabbour J-F, Kanj SS. Current choices of antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2020 - Volume 33 - Issue 6 - p 464-473, *Pseudomonas aeruginosa* to zatem jedna z najtrudniejszych do leczenia klinicznego bakterii. Dowodem na to są uzyskane wyniki antybiogramu, pokazanego w tabeli I, które potwierdzają oporność bakterii na antybiotyki z różnych grup. Najczęściej stosowaną terapią w zwalczaniu *P. aeruginosa* jest terapia skojarzona wykorzystująca kombinację dwóch środków przeciwbakteryjnych, co opisano w publikacji Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S i wsp. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD003344; Paul M, Dickstein Y, Schlesinger A i wsp. Beta-lactam versus beta-lactam-aminoglycoside combination therapy in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: CD003038.

Tabela I

Szczep bakteryjny	Antybiogram			
	Ampicylina	Chloramfenikol	Genta-mycyna	Kanamycyna
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	BA BZ	250 BZ	BA BZ	125

gdzie:

BA – brak aktywności antybakteryjnej

BZ – brak skuteczności w leczeniu zakażeń bakteryjnych *P. aeruginosa*.

Intensywne stosowanie antybiotyków doprowadziło do zwiększenia oporności mikroorganizmów na standardowo stosowane antybiotyki. W dobie stale rosnącej liczby lekoopornych szczepów bakteryjnych niezwykle istotne jest poszukiwanie kolejnych substancji aktywnych w ich zwalczaniu.

Celem wynalazku jest opracowanie nowego peptydu antybakteryjnego, który będzie wykazywał właściwości hamujące wzrost bakterii, zwłaszcza wykazujących cechy lekooporności.

Nowy peptyd antybakteryjny o wzorze chemicznym $C_{119}H_{202}N_{20}O_{38}O_{31}$ i o sekwencji IKIANGFGRIGRSVLRALYETGR.

Zastosowanie nowego peptydu antybakteryjnego, o wzorze chemicznym $C_{119}H_{202}N_{20}O_{38}O_{31}$ i o sekwencji IKIANGFGRIGRSVLRALYETGR, jako środka o działaniu przeciwbakteryjnym wobec bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz wobec bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Zastosowanie nowego peptydu antybakteryjnego, o wzorze chemicznym $C_{119}H_{202}N_{20}O_{38}O_{31}$ i o sekwencji IKIANGFGRIGRSVLRALYETGR, jako składnika maści lub opatrunku w leczeniu zakażeń *Staphylococcus aureus* lub *Staphylococcus epidermidis*, korzystnie do leczenia zakażeń *Pseudomonas aeruginosa* stosuje się go w połączeniu z antybiotykiem, zwłaszcza z chloramfenikolem.

Nowy peptyd antybakteryjny, według wynalazku, znajduje zastosowanie w leczeniu zakażeń lekoopornych szczepów bakterii, w szczególności bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz wobec bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis

Przedmiot wynalazku został przedstawiony w przykładzie wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia płytkę 96-dółkową z wynikami analizy wspólnego oddziaływania nowego peptydu antybakteryjnego oraz chloramfenikolu na bakterie szczepu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442.

Nowy peptyd antybakteryjny, według wynalazku, ma sekwencję IKIAINGFGRIGRSVLRALYETGR i wzór chemiczny $C_{119}H_{202}N_{38}O_{31}$. Masa cząsteczkowa tego nowego peptydu wynosi 2661,15 Da. Peptyd wykazuje hydrofobowość rzędu 42%, a jego ładunek netto wynosi +4.

Inne parametry nowego peptydu penetrującego:

- uśredniona hydropatia peptydu GRAVY – the Grand Average hydrophathy value of the peptide = 0,121;
- hydrofobowość peptydu wg. Wimleya-White’a – The Wimley-White whole-residue hydrophobicity of the peptide = 2,96;
- Indeks Bomana, współczynnik oddziaływań białko-białko – Protein-binding Potential – Boman index = 1,7 kcal/mol;
- współczynnik alifatyczny = 117,92;
- teoretyczny punkt izoelektryczny = 11,55.

Nowy peptyd penetrujący zawiera aminokwasy w następujących ilościach:

- Aminokwasy hydrofobowe: I: 4 V: 1 L: 2 F: 1 C: 0 M: 0 A: 2 W: 0
- Glicyna i Prolina: G: 4 P: 0
- Ujemnie naładowane aminokwasy: E: 1 D: 0
- Dodatnio naładowane aminokwasy: K: 1 R: 4 H: 0
- Inne aminokwasy: T: 1 S: 1 Y: 1 Q: 0 N: 1

Udział procentowy poszczególnych aminokwasów w nowym peptydzie

penetrującym jest następujący: Ile = 17% Val = 4% Leu = 8% Phe = 4% Cys = 0% Met = 0% Ala = 8% Trp = 0% Gly = 17% Pro = 0% Thr = 4% Ser = 4% Tyr = 4% Gln = 0% Asn = 4% Glu = 4% Asp = 0% His = 0% Lys = 4% Arg = 17%

Zastosowanie nowego peptydu antybakteryjnego, który ma sekwencję IKIAINGFGRIGRSVLRALYETGR i wzór chemiczny $C_{119}H_{202}N_{38}O_{31}$, jako środka o działaniu przeciwbakteryjnym wobec bakterii Gram-ujemnych, *Escherichia coli* ATCC 10536 oraz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 oraz wobec bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Ocenę *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej peptydu przeprowadzono według metodologii Clinical & Laboratory Standards Institute. W tym celu roztwór wyjściowy bakterii przygotowano przez inkubację drugiej hodowli bakteryjnej w pożywce Mueller Hinton Broth – MHB przez czas od 20 do 24 godzin w temperaturze 37°C na wyrzășarce orbitalnej. Hodowla prowadzona była do momentu uzyskania gęstości 10^8 komórek/mL. Z tak przygotowanej hodowli, w wyniku tysięckrotnego rozcieńczenia, uzyskano hodowlę roboczą o gęstości 10^5 komórek/mL, którą wykorzystano w kolejnych etapach. W każdym dniu badania przygotowywano seryjne dwukrotne rozcieńczenie związku na mikrotitracyjnych płytkach 96-dołkowych i dodawano bakterie z hodowli roboczej. Wyjściowe stęzenie peptydu wynosiło 3 mg/mL, a zakres badanych stężeń wynosił od 0,046 do 750 μ g/mL. Płytki następnie inkubowano w 37°C w otaczającym powietrzu przez czas od 20 do 24 godzin. Następnie analizowano stopień zmętnienia hodowli w dołkach zawierających określone stęzenie badanego związku i sprawdzano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm. Wyznaczono najniższe stęzenie związku, które całkowicie hamowało wzrost hodowli bakteryjnej MIC – Minimum Inhibitory Concentration. W tabeli 1 pokazano wartości minimalnego stęzenia hamującego wzrost bakterii uzyskane dla nowego peptydu antybakteryjnego.

Tabela 1

Szczep bakteryjny	Nowy peptyd antybakteryjny AMPAB5K
	MIC [$\mu\text{g/mL}$]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	187,50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	11,72
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	29,12
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	29,12

Wykazano, że nowy peptyd antybakteryjny ma zdolność inhibicji wzrostu bakterii i może być powszechnie stosowany jako związek przeciwbakteryjny, który najwyższą średnią aktywność wykazuje wobec *Escherichia coli* ATCC 10536 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, a najniższą wobec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Wykazano również zwiększoną lub zbliżoną aktywność nowego peptydu antybakteryjnego wobec *E. coli* w porównaniu do znanych i stosowanych antybiotyków. W tabeli 2 pokazano wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii, które zostały uzyskane dla nowego peptydu antybakteryjnego oraz dla czterech znanych antybiotyków stosowanych w zwalczaniu infekcji powodowanych przez *Escherichia coli*.

Tabela 2

Antybiotyk	Szczep bakteryjny: <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 MIC [$\mu\text{g/mL}$]
Ampicylina	15,62
Chloramfenikol	3,91
Gentamycyna	1,95
Kanamycyna	3,91
Nowy peptyd antybakteryjny	11,72

Nowy peptyd antybakteryjny hamuje wzrost i namnażanie się bakterii *Escherichia coli* i może być powszechnie stosowany jako chemioterapeutyk w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

Nowy peptyd antybakteryjny, według wynalazku, wykazuje synergistyczne działanie w połączeniu z antybiotykiem jakim jest chloramfenikol wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Ocenę *in vitro* wspólnego oddziaływania nowego peptydu antybakteryjnego i antybiotyku przeprowadzono z wykorzystaniem metody szachownicy – checkerboard.

Roztwór wyjściowy bakterii przygotowano przez inkubację drugiej hodowli bakteryjnej w pożywce Muller Hinton Broth – MHB przez czas od 20 do 24 godzin w 37°C na wytrząsarce orbitalnej. Hodowla prowadzona była do momentu uzyskania gęstości 10^8 komórek/mL. Z tak przygotowanej hodowli, w wyniku tysięczkrotnego rozcieńczenia, uzyskano hodowlę roboczą o gęstości 10^5 komórek/mL, którą wykorzystano w kolejnych etapach. W każdym dniu badania przygotowywano seryjne dwukrotne rozcieńczenie związków na mikrotitracyjnych płytkach 96-dołkowych i dodawano do nich bakterie z hodowli roboczej. W kombinacji dwóch środków przeciwbakteryjnych, wyjściowe stężenie nowego peptydu antybakteryjnego wynosiło 3 mg/mL – 16 x MIC,

natomiast chloramfenikolu 62,5 µg/mL – 8 x MIC. Płytki następnie inkubowano w 37°C w otaczającym powietrzu przez czas od 20 do 24 godzin. Następnie analizowano stopień zmętnienia hodowli w dołkach zawierających określone stężenia środków antybakteryjnych. MIC każdego środka przeciwbakteryjnego w kombinacji wyznaczono jako najniższe stężenie, które całkowicie hamowało wzrost bakterii. Interakcję leków w kombinacji wyrażono ilościowo jako ułamkowe stężenie hamujące – FIC Index – FICI i obliczono dla każdej kombinacji leków przy użyciu następującego równania:

$$FICI = FICA + FICB,$$

w którym:

FICA – MIC leku A w kombinacji/MIC samego leku A,

FICB – MIC leki B w kombinacji/ MIC samego leku B.

Wyniki FICI interpretowano jako synergiczne, jeśli $FICI \leq 0,5$, jako addytywne, jeśli FICI mieści się w zakresie od $>0,5$ do ≤ 1 albo antagonistyczne, jeśli $FICI \geq 2$.

W tabeli 3 pokazano wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii uzyskane dla nowego peptydu antybakteryjnego, chloramfenikoli oraz przy łącznym zastosowaniu obu związków przeciwbakteryjnych.

Tabela 3

Szczep bakteryjny	Samodzielnie stosowane związki		Kombinacja związków
	Nowy peptyd antybakteryjny	Chloramfenikol	Nowy peptyd antybakteryjny + Chloramfenikol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	MIC [µg/mL]		MIC w kombinacji [µg/mL]

	187,50	250,00	187,5+3,91 93,75+7,81 46,87+15,62 23,43+31,25
--	--------	--------	--

Nowy peptyd antybakteryjny jest stosowany również jako składnik maści i opatrunków w leczeniu zakażeń *Staphylococcus aureus* lub *Staphylococcus epidermidis* oraz jako środek działający w synergii z konwencjonalnym antybiotykiem w leczeniu zakażeń *Pseudomonas aeruginosa*.

W tabeli 4 pokazano wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis* uzyskane dla nowego peptydu antybakteryjnego, chloramfenikolu oraz wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii *P. aeruginosa* przy łącznym zastosowaniu obu związków przeciwbakteryjnych.

Tabela 4

Szczep bakteryjny	Samodzielnie stosowane związki		Kombinacja związków
	Nowy peptyd antybakteryjny	Chloramfenikol	Nowy peptyd antybakteryjny + Chloramfenikol
	MIC [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		MIC w kombinacji [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	187,50	250,00	187,5+3,91 93,75+7,81 46,87+15,62 23,43+31,25
<i>Staphylococcus</i>	29,12		

<i>aureus</i> ATCC 6538	
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> ATCC 35984	29,12

Nowy peptyd antybakteryjny, według wynalazku, hamuje wzrost i namnażanie bakterii odpowiedzialnych ze przewlekłe infekcje skórne, w tym spowodowane zmianami oparzeniowymi. Wobec *P. aeruginosa*, nowy peptyd antybakteryjny, w kombinacji z chloramfenikolem, wykazuje zwiększoną aktywność antybakteryjną, która jest dopełniona jego aktywnością wobec *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. Ponadto ten nowy peptyd antybakteryjny ma zwiększoną aktywność wobec *P. aeruginosa* po jego połączeniu z chloramfenikolem i wykazuje wartość MIC od dwu- do ośmiokrotnie niższą w porównaniu do działania samego nowego peptydu antybakteryjnego. Natomiast chloramfenikol w połączeniu z nowym peptydem antybakteryjnym wykazuje od ośmio- do sześćdziesięcioczekrotnie niższą wartość MIC w porównaniu do działania samego antybiotyku.