Akademia Medyczna w Gdańsku
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Wojciech Kamysz

Projektowanie, synteza i badania peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Rozprawa habilitacyjna

Gdańsk 2007

Spis treści

Wykaz prac będących podstawą rozprawy habilitacyjnej……3
Indywidualny wkład Habilitanta do wspólnych prac stanowiących rozprawę……7
Wprowadzenie…..…….……...11
1. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe……...…….....13
2. Badania własne dotyczące projektowania, syntezy i badań peptydów przeciwdrobnoustrojowych ...……...……..…..23
2.1. Projektowanie nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych……...……23
2.2. Ekstrakcja do fazy stałej jako nowa metoda oczyszczania syntetycznych peptydów……..…….....29
2.3. Badania *in vitro* peptydów przeciwdrobnoustrojowych…….……..…31
2.4. Badania *in vivo* peptydów przeciwdrobnoustrojowych…….……..37
3. Podsumowanie.…….…….…….39
4. Wnioski……..……..…...…...40
Piśmiennictwo……..……...……41

Kserokopie publikacji stanowiących rozprawę habilitacyjną

I. Prace przeglądowe
II. Publikacje dotyczące projektowania nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz metod ich oczyszczania
III. Publikacje dotyczące badań *in vitro* peptydów przeciwdrobnoustrojowych
IV. Publikacje dotyczące badań *in vivo* peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Wykaz prac będących podstawą pracy habilitacyjnej

1. **Kamysz W**.: Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? *Nucl Med Rev Cent East Eur,* 2005;8(1):78-86. **(MEiN = 6)**
2. **Kamysz W**., Okrój M., Łukasiak J.: Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol*, 2003;50(2):461-9. **(IF = 0,600)**
3. **Kamysz W**., Mickiewicz B., Rodziewicz-Motowidło S., Greber K., Okrój M.: Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. *J Pept Sci,* 2006;12(6):533-7. **(IF = 1,803)**
4. Czajgucki Z., Andruszkiewicz R., **Kamysz W**.: Structure activity relationship studies on the antimicrobial activity of novel edeine A and D analogues. *J Pept Sci,* 2006;12(9):653-62. **(IF = 1,803)**
5. **Kamysz W**., Okrój M., Łempicka E., Ossowski T., Łukasiak J.: Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. *Acta Chromatographica*, 2004;14:180-6. **(KBN = 6)**
6. **Kamysz W**., Silvestri C, Cirioni C., Giacometti A., Licci A., Vittoria A.D., Okroj M., Scalise G.: In vitro activity of lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH_2 and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant Gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother,* 2007;51(1): 354-8. **(IF = 4,379)**
7. **Kamysz W**., Nadolski P., Kędzia A., Cirioni O., Barchiesi F., Giacometti A., Scalise G., Łukasiak J., Okrój M.: In vitro activity of synthetic antimicrobial peptides against *Candida. Pol J Microb,* 2006;55(4):303-7. **(MEiN = 6)**
8. Bogucka K., Królicka A., **Kamysz W**., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E.: Activities of synthetic peptides against human pathogenic bacteria. *Pol J Microb*, 2004;53(1):41-4. **(KBN = 5)**
9. **Kamysz W**., Królicka A., Bogucka K., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E.: Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *J Phytopathol*, 2005;153:313-7. **(IF = 0,575)**
10. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics. *J Antimicrob Chemother,* 2005;55(2):272-4. **(IF = 3,611)**

11. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Licci A., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients. *Int J Antimicrob Agents,* 2005;26(3):235-40. **(IF = 2,064)**
12. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Licci A., D'Amato G., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of uperin 3.6 against gram-positive cocci isolated from immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(9):3933-3936. **(IF = 4,216)**
13. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. *Peptides,* 2005;26(11):2111-6. **(IF = 2,511)**
14. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of the histatin derivative P-113 against multidrug-resistant pathogens responsible for pneumonia in immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother,* 2005;49(3):1249-52. **(IF = 4,216)**
15. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of citropin 1.1 against gram-positive pathogens causing skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005;49(6):2507-9. **(IF = 4,216)**
16. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *J Antimicrob Chemother*, 2005;55(7):410-2. **(IF = 3,611)**
17. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M. S., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH(2) on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004;49(3):197-200. **(IF = 2,032)**
18. Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Łukasiak J., Scalise G.: Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH_2 against multidrug-resistant

nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*, 2003;24(9):1315-1318. **(IF = 2,635)**

19. **Kamysz W**., Turecka K.: Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol Pharm*, 2005;62(5):341-4. **(MEiN = 6)**
20. Kulkarni M.M., McMaster W.R., Kamysz E., **Kamysz W**., Engman D.M., McGwire B.S.: The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol,* 2006;62(5):1484-97. **(IF = 6,203)**
21. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Orlando F., **Kamysz W**., D'Amato G., Mocchegiani F., Łukasiak J., Silvestri C., Saba V., Scalise G.: Potential therapeutic role of histatin derivative P-113d in experimental rat models of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *J Infect Dis*, 2004;190:356-64. **(IF = 4,481)**
22. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., **Kamysz W.,** Rocchi M., D'Amato G., Mocchegiani F., Silvestri C., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. *Peptides*, 2005;26(2):207-16. **(IF = 2,511)**
23. Giacometti A., Ghiselli R., Cirioni O., Mocchegiani F., D'Amato G., Orlando F., Sisti V., **Kamysz W**., Silvestri C., Naldoski P., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. *J Antimicrob Chemother*, 2004;54(3):654-60. **(IF = 3,080)**
24. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Viticchi C., Orlando F., D'Amato G., Del Prete M.S., **Kamysz W**., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock. *Peptides,* 2003;24(11):1747-1752. **(IF = 2,635)**
25. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., D'Amato G., Del Prete M.S., Orlando F., **Kamysz W**., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats. *Gut,* 2003;52(6):874-8. **(IF = 6,323)**
26. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., **Kamysz W**., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis,* 2005;192(9):1613-20. **(IF = 4,943)**

27. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli F., Mocchegiani F., Silvestri C., Orlando F., **Kamysz W**., D'Amato G., Kamysz E., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Amphibian peptides prevent endotoxemia and bacterial translocation in bile duct-ligated rats. *Crit Care Med*, 2006;34(9):2415-20. **(IF = 5,077)**
28. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., D'Amato G., **Kamysz W**., Mocchegiani F., Sisti V., Silvestri C., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Temporin A soaking in combination with intraperitoneal linezolid prevents vascular graft infection in a subcutaneous rat pouch model of infection with *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother,* 2004;48(8):3162-4. **(IF = 4,246)**
29. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Dell'Acqua G., Gov Y., **Kamysz W**., Łukasiak J., Mocchegiani F., Orlando F., D'Amato G., Balaban N., Saba V., Scalise G.: Prophylactic efficacy of intraperitoneal temporin A combined with topical RNAIII-inhibiting peptide in a subcutaneous rat pouch model of graft infection due to staphylococci with intermediate resistance to glycopeptides. *Circulation,* 2003;108(6):767-71. **(IF = 10,255)**
30. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., **Kamysz W**., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Chiodi L., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides,* 2006;27(6):1210-6. **(IF = 2,231)**

Indywidualny wkład Habilitanta do wspólnych prac stanowiących rozprawę

Lp.	Publikacja	Indywidualny wkład habilitanta
1	**Kamysz W**. *Nucl Med Rev Cent East Eur,* 2005;8(1):78-86.	koncepcja pracy, redakcja publikacji, przygotowanie publikacji do druku
2	**Kamysz W**., Okrój M., Łukasiak J. *Acta Biochim Pol*, 2003;50(2):461-9.	koncepcja pracy, redakcja publikacji, przygotowanie publikacji do druku
3	**Kamysz W**., Mickiewicz B., Rodziewicz-Motowidło S., Greber K., Okrój M. *J Pept Sci,* 2006;12(8):533-7.	zaprojektowanie badań, synteza peptydów, przygotowanie próbek do badań konformacyjnych, badania mikrobiologiczne na szczepach referencyjnych, przygotowanie publikacji do druku
4	Czajgucki Z., Andruszkiewicz R., **Kamysz W**. *J Pept Sci,* 2006;12(9):653-62.	synteza peptydów, badania mikrobiologiczne, udział w redagowaniu manuskryptu publikacji
5	**Kamysz W**., Okrój M., Łempicka E., Ossowski T., Łukasiak J. *Acta Chromatographica*, 2004;14:180-6.	zaprojektowanie badań, synteza peptydów, wykonanie rozdziałów chromatograficznych, opracowanie wyników, przygotowanie publikacji do druku
6	**Kamysz W**., Silvestri C, Cirioni C., Giacometti A., Licci A., Vittoria A.D., Okroj M., Scalise G. *Antimicrob Agents Chemother,* 2007;51(1): 354-8.	zaprojektowanie badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne na szczepach referencyjnych oraz wstępna ocena działania synergistycznego z konwencjonalnymi antybiotykami, udział w opracowaniu wyników, przygotowanie publikacji do druku
7	**Kamysz W**., Nadolski P., Kędzia A., Cirioni O., Barchiesi F., Giacometti A., Scalise G., Łukasiak J., Okrój M. *Pol J Microb,* 2006;55(4):303-7.	koncepcja pracy, synteza peptydów, badania mikrobiologiczne na szczepach szpitalnych, opracowanie wyników oraz przygotowanie publikacji do druku
8	Bogucka K., Królicka A., **Kamysz W**., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E. *Po J Microb*, 2004;53(1):41-4.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, udział w pisaniu publikacji
9	**Kamysz W**., Królicka A., Bogucka K., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E. *J Phytopathol*,2005;153:313-7	zaprojektowanie badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne na szczepach referencyjnych, udział w pisaniu publikacji
10	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Łukasiak J., Scalise G. *J Antimicrob Chemother,* 2005;55(2): 272-4.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne oraz ocena działania synergistycznego na szczepy referencyjne, udział w opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji

11	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Licci A., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G. *Int J Antimicrob Agents,* 2005; 26(3):235-40.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji
12	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Licci A., D'Amato G., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(9):3933-3936.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji
13	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G. *Peptides,* 2005;26(11): 2111-6.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
14	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G. *Antimicrob Agents Chemother,* 2005;49(3):1249-52.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
15	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005;49(6):2507-9.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji
16	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G. *J Antimicrob Chemother*, 2005;56(7): 410-2.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne oraz działania synergistycznego na szczepy referencyjne, udział w opracowaniu wyników oraz pisaniu publikacji
17	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M. S., Łukasiak J., Scalise G. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004;49(3):197-200.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne na szczepach szpitalnych gronkowców, udział w pisaniu publikacji
18	Giacometti A., Cirioni O., **Kamysz W**., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Łukasiak J., Scalise G. *Peptides*, 2003;24(9):1315-1318.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji

19	**Kamysz W**., Turecka K. *Acta Pol Pharm*, 2005;62(5):341-4.	zaprojektowanie badań, synteza peptydów, badania mikrobiologiczne, opracowanie wyników oraz przygotowanie publikacji
20	Kulkarni M.M., McMaster W.R., Kamysz E., **Kamysz W**., Engman D.M., McGwire B.S. *Mol Microbiol,* 2006;62(5):1484-97.	synteza peptydów, udział w pisaniu publikacji
21	Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Orlando F., **Kamysz W**., D'Amato G., Mocchegiani F., Łukasiak J., Silvestri C., Saba V., Scalise G. *J Infect Dis*, 2004;190:359-64.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
22	Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., **Kamysz W**., Rocchi M., D'Amato G., Mocchegiani F., Silvestri C., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Peptides*, 2005;26(2):207-16.	udział w projektowaniu badań, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne dotyczące synergizmu z konwencjonalnymi antybiotykami, udział w pisaniu publikacji
23	Giacometti A., Ghiselli R., Cirioni O., Mocchegiani F., D'Amato G., Orlando F., Sisti V., **Kamysz W**., Silvestri C., Naldoski P., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *J Antimicrob Chemother*, 2004;54(3):654-60	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
24	Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Viticchi C., Orlando F., D'Amato G., Del Prete M.S., **Kamysz W**., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Peptides,* 2003;24(11):1747-1752.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
25	Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., D'Amato G., Del Prete M.S., Orlando F., **Kamysz W**., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Gut,* 2003;52(6):874-8.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
26	Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., **Kamysz W**., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *J Infect Dis,* 2005;192(9):1613-20.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji

27	Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli F., Mocchegiani F., Silvestri C., Orlando F., **Kamysz W**., D'Amato G., Kamysz E., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Crit Care Med*, 2006;34(9):2415-20.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
28	Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., D'Amato G., **Kamysz W**., Mocchegiani F., Sisti V., Silvestri C., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Antimicrob Agents Chemother,* 2004;48(8):3162-4.	synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
29	Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Dell'Acqua G., Gov Y., **Kamysz W**., Łukasiak J., Mocchegiani F., Orlando F., D'Amato G., Balaban N., Saba V., Scalise G. *Circulation,* 2003;108(6):767-71.	udział w projektowaniu badań, ocena stopnia immobilizacji peptydu na materiale medycznym, synteza peptydów, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji
30	Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., **Kamysz W**., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Chiodi L., Łukasiak J., Saba V., Scalise G. *Peptides,* 2006;27(6):1210-6.	udział w tworzeniu koncepcji badań, synteza peptydów, ocena stopnia immobilizacji peptydu na materiale medycznym, wstępne badania mikrobiologiczne, udział w pisaniu publikacji

Wprowadzenie

Poszukiwanie skutecznych substancji przeciwdrobnoustrojowych to ciągle aktualny problem współczesnej farmacji i medycyny [1]. Pojawienie się szczepów opornych na konwencjonalne, niegdyś bardzo skuteczne antybiotyki (np. wankomycynę) spowodowało pilną potrzebę badań w grupie leków przeciwdrobnoustrojowych. Innym powodem poszukiwania nowych leków są problemy z zakażeniami oportunistycznymi u chorych z dysfunkcją układu odpornościowego [2].

Zakażenia powodowane przez drobnoustroje w statystykach umieralności plasują się w czołówce czynników etiologicznych powodujących zejścia śmiertelne na świecie (zaraz po chorobach układu krążenia). W wielu krajach obserwuje się od kilku lat gwałtowny nawrót chorób zakaźnych a Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) określiła je jako główne zagrożenie dla człowieka. Choroby powodowane przez mikroorganizmy powodują śmierć rocznie ponad 11 milionów ludzi na całym świecie [3]. Najczęstszą przyczyną są zakażenia wirusem HIV oraz powikłania bakteryjne związane z chorobą AIDS [4].

Poza skutkami społecznymi leczenie chorób zakaźnych niesie za sobą ogromne koszty ekonomiczne. Nie mniejszy ciężar spoczywa na koncernach farmaceutycznych, które chcąc wprowadzić nową substancję na rynek muszą zainwestować średnio 400-800 milionów dolarów [5]. Pomimo olbrzymich potrzeb związanych z nowymi antybiotykami przemysł światowy główny nacisk kładzie na wdrażanie leków stosowanych w chorobach przewlekłych, przyjmowanych w długim okresie przez pacjenta. Liczba nowych związków przeciwdrobnoustrojowych wprowadzanych do lecznictwa cały czas maleje. W Stanach Zjednoczonych w latach 1983-87 wprowadzono 16 nowych chemioterapeutyków, przez cztery kolejne już tylko 7 nowych, co stanowiło zaledwie 3% wszystkich nowych leków [1]. Należy jednak zaznaczyć, że do statystyki tej nie zalicza się leków działających miejscowo, szczepionek, przeciwciał oraz immunomodulatorów, czyli substancji, które także stosuje się w terapii lub prewencji chorób zakaźnych. Badania nad nowymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi można podzielić na trzy główne grupy. Największy nacisk kładzie się obecnie na poszukiwanie nowych analogów struktur chemicznych, które są stosowane w lecznictwie. Dowodem na to jest wprowadzenie w latach 1998-2003 nowych antybiotyków, w grupie których pojawiło się dziewięć nowych związków, ale tylko dwa to substancje o całkowicie nowym mechanizmie działania (daptomycyna oraz linezolid). W roku 2002 spośród 89

nowych leków dopuszczonych do obrotu przez Federalny Urząd ds. Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych (FDA) ani jeden nie był antybiotykiem.

Inne trendy naukowe w odniesieniu do problemu narastającej oporności na leki to poszukiwania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych w oparciu o badania genomu mikroorganizmów chorobotwórczych (*ang.* genomic approaches) oraz rozwój szczepionek. Pierwszemu z nich sprzyja poznawanie całkowitej sekwencji DNA coraz większej liczby drobnoustrojów. Dzięki temu możliwe jest systemowe podejście do identyfikacji nowych celów terapeutycznych. Mogą nimi być przykładowo struktury odpowiedzialne za wzrost bakterii, adhezję do błon śluzowych czy produkcję toksyn. Równoległy rozwój wysokowydajnych technik screeningu, takich jak chipy oligonukleotydowe pozwala na szybkie testowanie tysięcy potencjalnych kandydatów na skuteczne terapeutyki. Jako praktyczne zastosowanie wspomnianego podejścia należy wymienić inhibitory syntetaz t-RNA. Syntetazy t-RNA są kluczowym elementem w procesie translacji i produkcji białek, warunkując powstawanie molekuł t-RNA specyficznych dla danego aminokwasu. Dzięki temu, iż bakteryjne syntetazy t-RNA różnią się od syntetaz organizmów eukariotycznych, różnice te mogą być wykorzystane w konstruowaniu terapeutyków. Obecnie dzięki wiedzy i technikom opartym na analizie genomu opracowano kilka obiecujących związków, które w najbliższym czasie przejdą badania kliniczne.

W stosunku do często pojawiających się bakterii chorobotwórczych, takich jak pneumokoki oporne na penicylinę, dwoinka rzeżączki, meningokoki, *Helicobacter pylori* czy drobnoustrojów powodujących infekcje jelitowe, sensownym podejściem wydaje się stworzenie szczepionek, które uwrażliwiałyby układ immunologiczny na antygeny tych bakterii (często słabo immunogennie) i przez to pozwalały na eliminację zakażenia we wczesnym jego stadium.

1. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Związki peptydowe o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych są szeroko rozpowszechnione w naturze. Stanowią bowiem jeden z ważniejszych elementów układu odpornościowego zarówno u organizmów *Prokaryota* jak i *Eukaryota* [6]. W mikroorganizmach są one produkowane przez wieloenzymatyczne układy komórkowe lub w trakcie różnych procesów pozarybosomalnych [7]. Część bakterii posiada również zdolność syntezy rybosomalnej związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Syntezowane peptydy aktywność mikrobiologiczną uzyskują w trakcie obróbki posttranslacyjnej [8]. Dużo uwagi poświęca się również peptydom produkowanym przez organizmy wyższe. Peptydy syntezowane rybosomalnie dzieli się na trzy podstawowe grupy [9]:

- bakteriocyny,
- lantybiotyki (modyfikowane bakteriocyny),
- endogenne antybiotyki peptydowe.

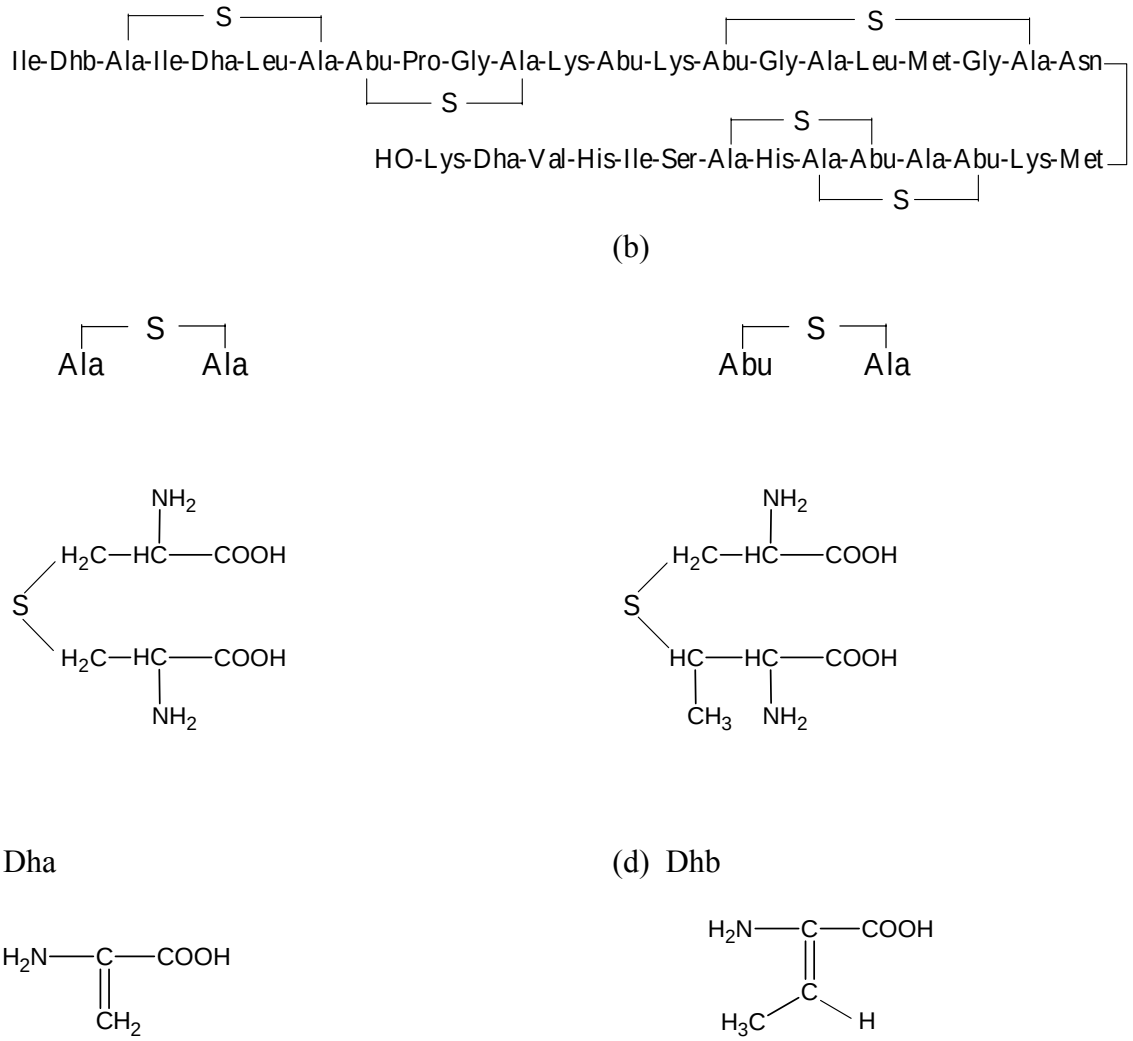
Peptydy przeciwdrobnoustrojowe pochodzące z bakterii

Do niedawna duże nadzieje pokładano w bakteriocynach, naturalnych peptydach produkowanych przez bakterie a chroniącymi je przed innymi patogenami. Bakteriocyny to produkty bakteryjnej syntezy rybosomalnej wydzielane na zewnątrz komórki celem ochrony przed patogenami. Charakteryzują się przeważnie wąskim spektrum działania bójczego oraz występowaniem u co najmniej kilku gatunków bakterii. Przeważnie są produkowane przez bakterie Gram-dodatnie. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje bakteriocyn [10]. Grupa pierwsza obejmuje peptydy, które zostały poddane obróbce posttranslacyjnej (modyfikowane bakteriocyny - lantybiotyki). Związkom tym obecnie poświęca się najwięcej uwagi. Do drugiej grupy należą bakteriocyny niemodyfikowane.

Do bakteriocyn zaliczane są też kolicyny i mikrocyny, peptydy które są wytwarzane przez bakterie Gram-ujemne (np. *Escherichia coli*) [11].

Lantybiotyki to najlepiej poznana grupa bakteriocyn [12]. Należy do nich około 30 związków o budowie peptydowej pochodzenia bakteryjnego (np. *Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus*). Lantybiotyki produkowane są w procesach obróbki

posttranslacyjnej przez drobnoustroje Gram-dodatnie, a ich nazwa związana jest z występowaniem niebiałkowego aminokwasu lantioniny lub metylolantioniny. Oprócz tego dehydroaminokwasu jak i innych aminokwasów niebiałkowych w strukturze tych antybiotyków obserwuje się występowanie wiązań (mostków) tioeterowych [13]. Średnia masa cząsteczkowa lantybiotyków wynosi 2-5 kDa. Aktywność ich skierowana jest głównie wobec bakterii Gram-dodatnich. Stosunkowo duża masa cząsteczkowa uniemożliwia penetrację błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Strukturę najważniejszego lantybiotyku nizyny oraz aminokwasów niebiałkowych wchodzących w jej skład prezentuje rysunek 1.



Rys. 1. Schemat budowy nizyny oraz modyfikowanych (niebiałkowych) reszt aminokwaswych: (a) lantionina, (b) metylolantionina, (c) dehydroalanina, (d) kwas dehydromasłowy. Abu – kwas aminomasłowy.

Obecność reszt dehydroaminokwasów jest nieodzowna dla aktywności przeciwbakteryjnej lantybiotyków [14]. Reszty te posiadają silne centra elektrofilowe mogące oddziaływać z ugrupowaniami nukleofilowymi obecnymi w bakteryjnym DNA lub hamować aktywność niektórych układów enzymatycznych. Mostki tioeterowe zwiększają odporność lantybiotyków na czynniki fizyczne (temperatura). Wykorzystany na dużą skalę został dotychczas tylko jeden antybiotyk z grupy lantybiotyków, nizyna. Jest on stosowany jako konserwant żywności od trzydziestu lat w ponad 50 krajach. Trwają intensywne badania nad wykorzystaniem innych lantybiotyków. Epidermina i gallidermina ma być zastosowana w leczeniu infekcji skórnych [15], lantopeptyna jako lek przeciwwirusowy (*Herpes simplex*) [16]. Z kolei lantybiotyk ankowenina jest proponowany do leczenia nadciśnienia [17].

Najważniejszym ograniczeniem stosowania lantybiotyków jest koszt otrzymywania. Synteza na dużą skalę tych związków sprawia spore trudności. Szczególnie kłopotliwe jest końcowe oczyszczanie otrzymanych związków. Zastosowanie lantybiotyków na szerszą skalę, wymaga więc opracowania skutecznej i taniej metody syntezy lub izolacji tych związków.

Endogenne antybiotyki peptydowe

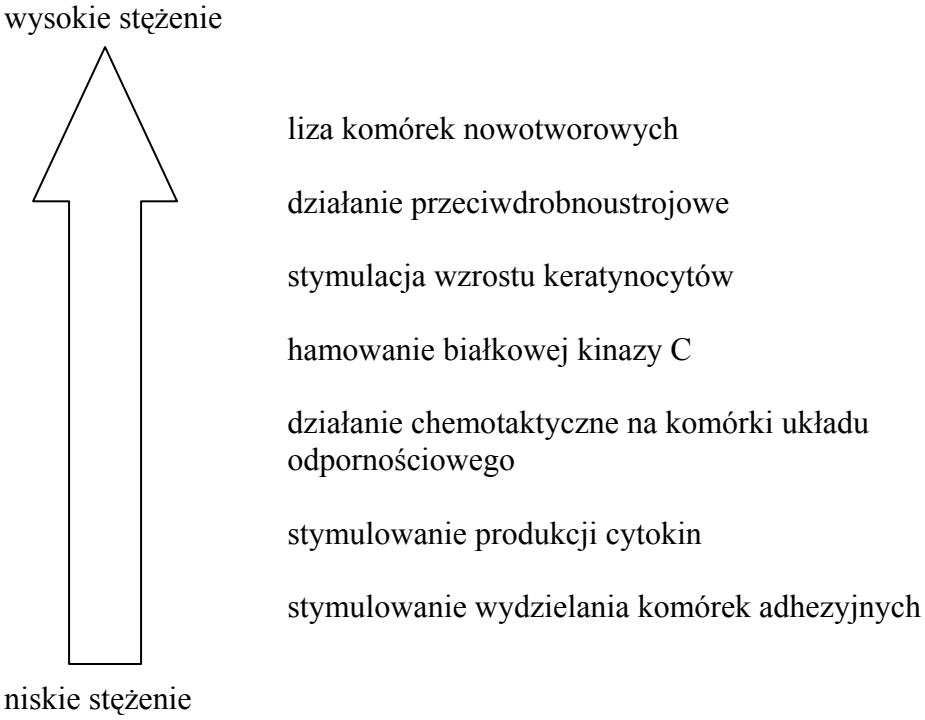
Duże nadzieje aplikacyjne w projektowaniu nowych chemioterapeutyków wiąże się z odkrytymi przed dwudziestoma laty endogennymi antybiotykami peptydowymi [18]. Cechą wspólną tych związków i antybiotyków peptydowych dotychczas stosowanych, oprócz nazwy, są aminokwasy jako podstawowy element budowy chemicznej. Różnią się jednak znacznie ze względu na źródło pochodzenia, występowanie fragmentów niebiałkowych oraz właściwości biologiczne. „Stare" antybiotyki peptydowe są stosowane w medycynie od ponad pół wieku. Ze względu na wysoką nefro- i hepatotoksyczność oraz właściwości hemolizujące pełnią one ograniczoną rolę. Ponadto brak wchłaniania z przewodu pokarmowego zadecydował głównie o miejscowym stosowaniu tych środków. Endogenne antybiotyki peptydowe uważa się za bezpieczniejsze w stosowaniu. W przeciwieństwie do swych poprzedników, izolowanych z kultur promieniowców *Streptomyces* „nowe" antybiotyki peptydowe są składnikami wszystkich organizmów eukariotycznych, gdzie stanowią ważny element ich układu odpornościowego [6]. Są składnikami śliny, występują na

wszystkich powierzchniach eksponowanych na środowisko zewnętrzne, mogą być także wydzielane przez neutrofile. Stanowią doskonałą matrycę do poszukiwania nowych środków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych zarówno w zwalczaniu zakażeń, jak i konserwacji leków. Obecnie wiele zespołów naukowych próbuje testować peptydy przeciwdrobnoustrojowe pod kątem nowych leków czy aktywnych środków do preparowania powłok przeciwdrobnoustrojowych. Wiedzę na temat peptydów stosuje się do modyfikacji genetycznej roślin odpornych na patogeny. Znane są transgeniczne banany czy transgeniczne rośliny uprawne skonstruowane, by chronić makroorganizmy przed drobnoustrojami.

Istnieje kilka metod klasyfikacji endogennych antybiotyków peptydowych. Najczęściej peptydy dzieli się na związki posiadające określona budowę chemiczną, gdyż odlegle taksonomicznie organizmy posiadają peptydy o podobnej strukturze. Szereg podobieństw chemicznych pozwala wydzielić trzy podstawowe grupy związków:

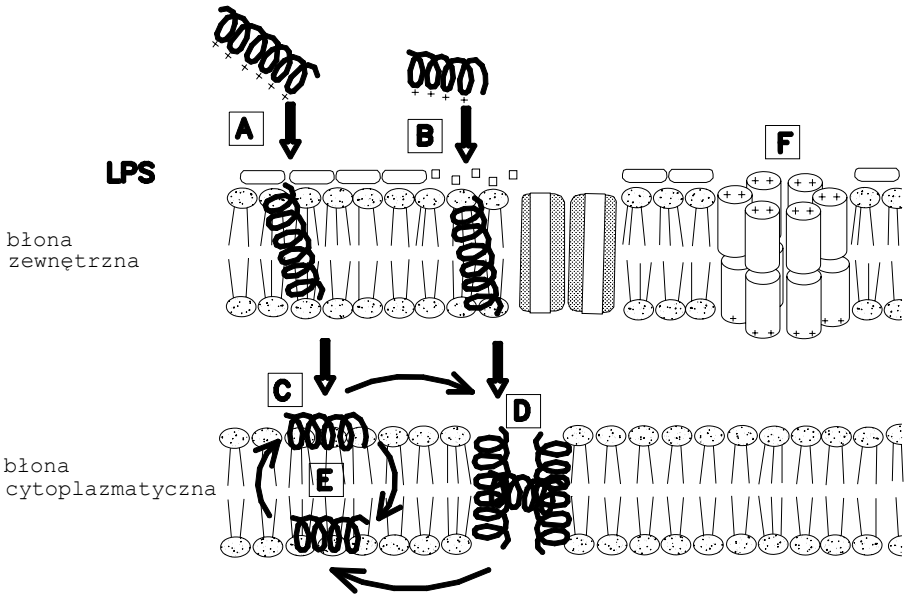
- peptydy liniowe, o budowie α-helikalnej, nie zawierające reszt cysteiny (np. magaininy, cekropiny)
- peptydy liniowe, nie zawierające reszt cysteiny, bogate w określone reszty aminokwasowe (np. histatyny, indolicydyna)
- peptydy cykliczne z przewagą struktury β, zawierające jedno lub więcej wiązań disulfidowych (np. protegryny, defensyny)

Niektóre peptydy charakteryzują się bardzo szerokim spektrum działania wobec zarówno bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów, wirusów oraz komórek nowotworowych. Do związków takich należą m.in. defensyny i protegryny. Oprócz typowej aktywności przeciwdrobnoustrojowej peptydy wykazują szerokie spektrum działań immunomodulujących związanych z infekcją drobnoustrojową. Do działań tych należą m.in. wpływ na ekspresję genów, wiązanie się z bakteryjnym lipopolisacharydem powodującym kaskadę cytokin prozapalnych czy wpływanie na odpowiedź komórek odpornościowych organizmu na rozwijająca się infekcję (Rys. 2) [18].



Rys. 2. Spektrum aktywności biologicznej naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w zależności od stężenia na przykładzie defensyn [18].

Większość peptydów przeciwdrobnoustrojowych działa na zasadzie permeabilizacji błony drobnoustrojów (Rys. 3). Znane są również peptydy powodujące uwalnianie ATP z komórek, zatrzymanie replikacji DNA czy zahamowanie ekspresji białek strukturalnych. Wiążąc się ze składnikami błon drobnoustrojów destabilizują strukturę dwuwarstwy lipidowej, mogą ponadto tworzyć micele lub kanały w obrębie błony [19]. Do niewątpliwych zalet niektórych peptydów przeciwdrobnoustrojowych należy zdolność do wiązania się z bakteryjnym lipopolisacharydem, przez co zapobiegają skutkom wstrząsu septycznego [20]. Właściwość ta wynika z dużej ilości i odpowiedniego ułożenia w strukturze przestrzennej aminokwasów zasadowych.



Rys. 3. Typy oddziaływań antybiotyków peptydowych na błonę bakterii Gram-ujemnych [21]. (A) destabilizacja liposacharydu przez konkurencyjne wiązanie się w miejscach występowania jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}, (B) oddziaływanie peptydu z ujemnie naładowanymi składnikami błony zewnętrznej oraz tworzenie szczelin w błonie, (C) wnikanie peptydu o budowie amfipatycznej w błonę cytoplazmatyczną, (D) tworzenie micelli w błonie cytoplazmatycznej, (E) przenikanie peptydów za pomocą zjawiska *flip-flop*, (F) tworzenie kanałów w błonie przez oligomery defensyw.

Do chwili obecnej odkryto około 1000 peptydów przeciwdrobnoustrojowych (http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm). Organizmami, z których izoluje się największą ilość peptydów są owady. Pojedynczy owad produkuje mieszaninę 15-20 peptydów, których stężenie w hemolimfie gwałtownie wzrasta w trakcie infekcji. W warunkach laboratoryjnych larwy owadów nakłuwa się igłą zakażoną drobnoustrojami i po określonym czasie odciąga się mikrostrzykawką hemolimfę [22]. Płyn ten można bezpośrednio oczyszczać metodami chromatograficznymi celem rozdzielenia peptydów i otrzymania czystych związków. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią u owadów jeden z trzech podatkowych elementów układu odpornościowego. Pozostałe elementy to indukcja enzymów proteolitycznych oraz indukcja odpowiedzi komórkowej (fagocytoza).

Ze względu na prostotę izolacji dużą grupę opisanych związków stanowią peptydy żabie [23]. Chronią one delikatną skórę płazów przed infekcją w bogatym w drobnoustroje środowisku wodnym. Większość peptydów żabich to związki o stosunkowo prostej budowie chemicznej. Przeważnie liniowe, pozbawione reszt cysteiny są doskonałym modelem do poszukiwania nowych antybiotyków. Laboratoryjnie peptydy uzyskuje się z płazów poddając ich organizmy niewielkiemu działaniu prądu stałego lub wstrzykując norepinefrynę. Wydzielinę skórną żaby następnie ściera się zwilżonym wacikiem i po ekstrakcji podobnie jak w przypadku owadów rozdziela związki peptydowe metodami chromatograficznymi.

Badania mikrobiologiczne naturalnych peptydów potwierdzają ich wysoką skuteczność w stosunku do szczepów opornych na konwencjonalne antybiotyki. Na bazie naturalnych peptydów konstruowane są związki zawierające jedynie część sekwencji aminokwasowej krytycznej dla niszczenia drobnoustrojów w celu zmniejszenia kosztów ewentualnej produkcji. Ponadto wprowadza się reszty D-aminokwasów, analogi pseudopeptydowe bądź modyfikacje końców peptydu, aby zwiększyć okres półtrwania w warunkach fizjologicznych. Inna modyfikacja mająca na celu zwiększenie powinowactwa i zdolności penetracji błon drobnoustrojów to sprzęganie z kwasami tłuszczowymi [24]. Kilkanaście z peptydów przechodzi obecnie badania kliniczne (Tab. 1) [25].

Tabela 1. Przykłady peptydów przeciwdrobnoustrojowych będących w trakcie badań aplikacyjnych [25].

PEPTYD	FIRMA	POTENCJALNE ZASTOSOWANIE	ETAP BADAŃ KLINICZNYCH
D2A21	Demegen	rany oparzeniowe i infekcje skórne	I etap
Demegen P-113 analog histatyny	Demegen	zapalenie dziąseł, zakażenia drożdżakowe jamy ustnej	II etap
Iseganan IB-367 analog protegryny	Intrabiotics	owrzodzenia jamy ustnej	ukończony III etap, nie dopuszczony do użycia
		infekcje płucne towarzyszące mukowiscydozie	II etap
Laktoferycyna H	AM Pharma	przeciwbakteryjny	badania przedkliniczne
MBI-594 AN	Micrologix	trądzik	ukończony II etap
Neuprex (rekombinowana pochodna BPI)	Xoma Corp.	zapalenie opon mózgowych	zakończony III etap, nie dopuszczony do użycia
Omiganan MBI-226	Micrologix	infekcje odcewnikowe	III etap
Pexiganan MSI-78 analog magaininy	Genaera	owrzodzenia stóp u cukrzyków	III etap

Dużą zaletą antybiotyków peptydowych w przeciwieństwie do konwencjonalnych antybiotyków jest niewystępowanie oporności drobnoustrojów na te substancje. Uważa się, że leki oparte na peptydach przeciwdrobnoustrojowych mogą w przyszłości być wykorzystane na kilka możliwości: jako samodzielne substancje lub związki wchodzące w skład preparatów złożonych wykorzystując ich działanie synergistyczne z konwencjonalnymi lekami oraz jako peptydy o działaniu immunomodulującym lub środki neutralizujące endotoksynę (lipopolisacharyd).

Potencjalne zastosowanie peptydów w lecznictwie jest jednak ograniczone przez szereg problemów. Najważniejszym jest koszt produkcji związków peptydowych. Zarówno syntezowane w skali laboratoryjnej jak i w zakładach przemysłowych, peptydy są bardzo drogie w pozyskiwaniu [26]. W przypadku krótkich związków przydatna może okazać się synteza enzymatyczna, z kolei w otrzymywaniu kilkudziesięcioaminokwasowych peptydów należy opracować metody z wykorzystaniem inżynierii genetycznej. Ważne jest też, aby każdy nowy produkt wypadał konkurencyjnie względem poprzedników, m.in. pod względem ekonomicznym. Powinien też być trwały w trakcie przechowywania jak i stosowania.

Nie bez znaczenia są problemy związane z uzyskaniem ochrony patentowej na aktywne substancje. Większość znanych najaktywniejszych peptydów to związki o strukturze występującej w naturze, co uniemożliwia staranie się o ochronę. Otrzymanie analogów syntetycznych o zbliżonej aktywności biologicznej jest trudne i wymaga olbrzymich nakładów już na etapie poszukiwania aktywnych analogów.

Problemem jest też zabezpieczenie peptydów przed degradacją enzymatyczną przewodzie pokarmowym. Niestety stosunkowo duża masa cząsteczkowa peptydów w znaczącym stopniu zmniejsza biodostępność. Obiecujące rezultaty daje zamykanie peptydów w mikrokompartmentowych postaciach leku, stosowanie promotorów sorpcji czy jednoczesne podawanie związków z inhibitorami peptydaz. Problem degradacji enzymatycznej można też ominąć stosując peptydy zbudowane z aminokwasów w konfiguracji D. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe zbudowane z D-aminokwasów przeważanie wykazują taką samą aktywność przeciwdrobnoustrojową jak odpowiedniki zbudowane z L-aminokwasów.

W poszukiwaniu nowych antybiotyków peptydowych, do wyjaśnienia pozostaje też sprawa toksyczności oraz powstawanie alergii przy kolejnym podawaniu peptydów. Dlatego też, na bazie dotychczasowej niespełna dwudziestoletniej wiedzy na temat

peptydów przeciwdrobnoustrojowych czynione są starania do stosowania tych związków głównie w terapii miejscowej.

Pomimo braku wielu informacji na temat peptydów przeciwdrobnoustrojowych w nowych antybiotykach pokłada się duże nadzieje. Ilość zespołów naukowych na świecie zaangażowanych w badania tej grupy związków gwałtownie się zwiększa. Niewątpliwym atutem nowych związków jest też ich naturalne pochodzenie oraz bardzo wysoka aktywność mikrobiologiczna i stosunkowo niewielkie zużycie peptydów w terapii.

2. Badania własne dotyczące projektowania, syntezy i badań peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Celem niniejszej pracy habilitacyjnej było projektowanie, synteza i badania mikrobiologiczne nowych antybiotyków peptydowych. Oprócz testów mikrobiologicznych związki te przebadałem także pod kątem ich zastosowania jako nowoczesne substancje konserwujące oraz środki ochrony roślin. Badania te należy uznać za pionierskie, gdyż podobne zagadnienia nie były wcześniej podejmowane w literaturze naukowej. Na drodze syntezy otrzymałem między innymi nie opisane w literaturze nowe peptydy lub lipopeptydy.

W ramach prowadzonych badań poszerzyłem też wiedzę na temat znanych endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych lub ich analogów przeprowadzając szereg testów mikrobiologicznych, które miały na celu zdobycie wiedzy w zakresie projektowania nowoczesnych chemioterapeutyków, skuteczniejszych w leczeniu opornych szczepów drobnoustrojów. Peptydy posłużyły też do dotychczas mało opisywanych badań nad leczeniem sepsy, czy tworzenia powłok zawierających peptydy przeciwdrobnoustrojowe jako substancje zabezpieczające przed infekcją.

Ponadto opracowałem nowatorską metodę oczyszczania związków peptydowych z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Proces ten pozwolił na znacznie szybsze otrzymywanie nowych związków peptydowych o pożądanej czystości. Prezentowane badania nie były dotąd wykorzystywane w oczyszczaniu syntetycznych polipeptydów.

2. 1. Projektowanie nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Badanie temporyny A oraz retro-analogów

W zakresie projektowania nowych związków chemicznych z wykorzystaniem metod analizy konformacyjnej, zaprojektowałem dwa nowe analogi temporyny A. Temporyna A jest hydrofobowym peptydem zbudowanym z trzynastu reszt aminokwasowych wyizolowanym pierwotnie z europejskiej żaby trawnej (*Rana temporaria*) [27]. Temporyna A wykazuje wysoką aktywność względem bakterii Gram-dodatnich oraz grzybów (m.in. *Candida albicans*). Jednym z poważniejszych

problemów związanych z perspektywicznym zastosowaniem tego peptydu w lecznictwie jest trudność otrzymywania, co jest opisane w literaturze [29]. Peptyd był też przeze mnie wielokrotnie otrzymywany w laboratorium, a proces syntezy został zoptymalizowany z wykorzystaniem najnowszej wiedzy na temat syntezy peptydów. Pomimo wytężonych starań nie udało się opracować metody, która byłaby wystarczająco wydajna w skali przemysłowej. Celem moich badań było znalezienie, na bazie temporyny A, równie skutecznego antybiotyku, ale łatwiejszego w syntezie chemicznej.

Syntezę peptydów przeprowadziłem z wykorzystaniem metody Merrifielda na stałym nośniku polimerowym. Grupy α-aminowe aminokwasów chroniłem osłoną 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc), zaś łańcuchy boczne ugrupowaniami powszechnie stosowanymi w chemii peptydów [28]. Peptydy odszczepiałem od nośnika roztworem kwasu trifluorooctowego (TFA) z dodatkiem triizopropylosilanu i wody. Po odsączeniu od ziaren nośnika, peptydy wytrącałem schłodzonym eterem, odwirowywałem, po czym poddawałem procesowi suszenia liofilizacyjnego. Peptydy oczyszczałem metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) w układzie gradientowym rozpuszczalników woda-acetonitryl z dodatkiem TFA. Frakcje zawierające peptydy o czystości powyżej 97% liofilizowałem. Peptydy scharakteryzowałem metodą analitycznej HPLC przy długości fali λ = 226 nm oraz metodą spektrometrii mas na spektrometrze z jonizacją metodą desorpcji laserowej na matrycy (MALDI-TOF).

Badania mikrobiologiczne wykonałem z wykorzystaniem szczepów referencyjnych pochodzących z Polskiej Kolekcji Drobnoustrojów (PAN, Wrocław). W testach zastosowałem następujące drobnoustroje: bakterie Gram-dodatnie (*Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Enterococcus hirae* ATCC 10541*, Rhodococcus equi* ATCC 6939*, Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990*, Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 20229), bakterie Gram-ujemne (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus vulgaris* NCTC 4635, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Serratia marcescens* ATCC 274*, Stenotrophomonas maltophila* ATCC 12714) oraz grzyby (*Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404). Badania minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC) wykonałem metodą mikrorozcieńczeń w płynnym podłożu Mueller-Hinton (dla bakterii) lub Sabouraud (dla grzybów) na 96-dołkowych płytkach polipropylenowych. Minimalne stężenie bójcze (MBC) oznaczałem wysiewając próbki hodowli płynnych na podłoże stałe. Sposób

oznaczeń mikrobiologicznych był zgodny z bieżącymi zaleceniami NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

W tym miejscu pragnę dodać, że wykonywanie badań doświadczalnych z zakresu pracy z drobnoustrojami zostało poprzedzone ukończeniem przeze mnie na poziomie akademickim kilku przedmiotów związanych z mikrobiologią, immunologią, biologią molekularną oraz krótkimi praktykami w specjalistycznych laboratoriach mikrobiologicznych gdańskich uczelni.

W trakcie badań nad analogami temporyny A udało mi się otrzymać szereg nowych peptydów o zmodyfikowanej strukturze pierwszorzędowej. Dwa z analogów posiadały aktywność przeciwdrobnoustrojową porównywalną z temporyną A. Do związków tych należała retro-temporyna oraz (6-1)(7-13)-temporyna. Oba analogi miały identyczny skład aminokwasowy jak temporyna A, a różniły się, zgodnie z przyjętą strategią projektowania pochodnych, kolejnością połączenia aminokwasów. Badane peptydy wykazywały wysoką aktywność względem bakterii Gram-dodatnich i grzybów oraz niską względem bakterii Gram-ujemnych. Analog (6-1)(7-13)-TA w bardzo niewielkim stopniu aktywnością przeciwdrobnoustrojową ustępował temporynie A, co w związku z prostotą jego otrzymywania czyni go bardzo obiecującą substancją do potencjalnych zastosowań. Struktury pierwszorzędowe temporyny A (TA) oraz retro-analogów przedstawiono na rysunku 4.

TA	Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Gly-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Ile-Leu-NH_2
retro-TA	Leu-Ile-Gly-Ser-Leu-Val-Arg-Gly-Ile-Leu-Pro-Leu-Phe-NH_2
(6-1)(7-13)-TA	Gly-Ile-Leu-Pro-Leu-Phe-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Ile-Leu-NH_2

Rys. 4. Struktura pierwszorzędowa temporyny A (TA) oraz jej retro-analogów.

Retro-analogi oraz temporyna A zostały przeze mnie przebadane na szczepach referencyjnych bakterii Gram-dodatnich, bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów. Wszystkie trzy peptydy wykazywały podobną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Widma dichroizmu kołowego (CD) oraz ich analizę strukturalną przeprowadziła dr Sylwia Rodziewicz-Motowidło z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Widma CD temporyny A były też wcześniej wykonywane przez innych autorów. Peptydy były analizowane w wodnych roztworach trifluoroetanolu (TFE), w buforze fosforanowym oraz buforze fosforanowym zawierającym siarczan dodecylu sodu (SDS). Zarówno

temporyna A jak i analog (6-1)(7-13)-TA w 30% trifluoroetanolu przyjmowały strukturę α-helisy. W obecności micelli SDS oba peptydy tworzyły α-helisę w roztworach o różnym pH. Może to sugerować, że takie struktury ważne są dla obu peptydów dla zachowania aktywności względem błon biologicznych. Niższa aktywność mikrobiologiczna retro-temporyny A może być związana z zaobserwowanymi różnicami w badaniach CD. Analog ten zarówno w roztworach TFE, buforze fosforanowym, jak i w obecności SDS wykazywał strukturę nieuporządkowaną. Pomimo iż posiada aktywność niższą aniżeli temporyna A, zastosowanie go w praktyce może być jednak korzystne ze względu na łatwość otrzymywania na drodze syntezy chemicznej. Otrzymanie nowych, aktywnych mikrobiologicznie analogów temporyny A może w przyszłości zaowocować szerszym zainteresowaniem zespołów naukowych potencjalnym zastosowaniem tego typu związków w lecznictwie. Wyniki badań dotyczące tej grupy związków zostały opublikowane [30].

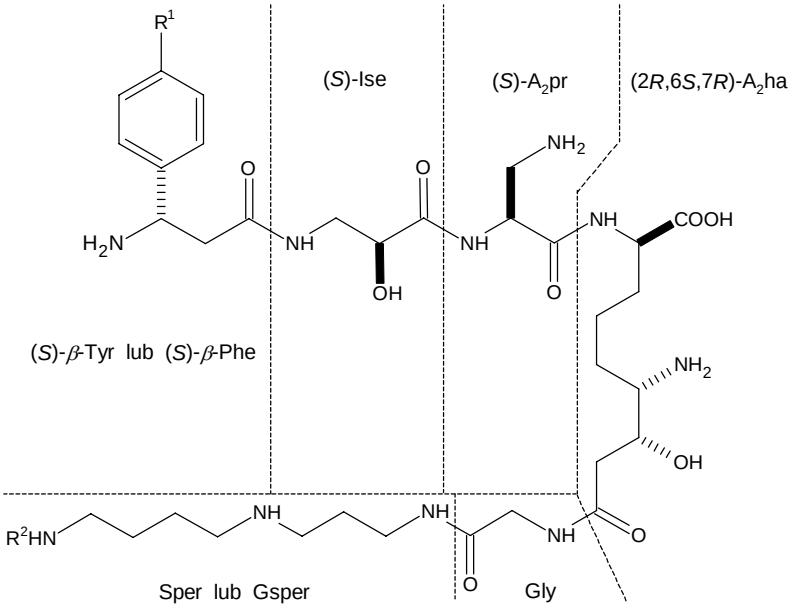
Badanie analogów edeiny

Współpraca naukowa z prof. Ryszardem Andruszkiewiczem z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej zaowocowała badaniami nad analogami edein. Edeiny to antybiotyki peptydowe będące amidami pentapeptydów, które posiadają w swym składzie poliaminę – spermidynę lub guanylospermidynę, glicynę oraz cztery aminokwasy niebiałkowe, włączając kwas (2*R*,6*S*,7*R*)-2,6-diamino-7-hydroksyazelainowy (oryginalny aminokwas występujący wyłącznie w edeinach, którego metoda syntezy ze względu na złożoną strukturę cząsteczki nie została dotychczas opracowana) [31]. Budowę chemiczną izomerów α edein przedstawiono na rysunku 5. Związki te wykazują znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową obejmującą bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne oraz grzyby. Niestety stosunkowo wysoka toksyczność antybiotyków edeinowych w stosunku do organizmów zwierzęcych ogranicza ich zastosowanie w lecznictwie jako związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Edeiny posiadają też zdolność hamowania translacji w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych, przez co stanowią bardzo użyteczne narzędzie do badania tego procesu. Istotną cechą antybiotyków edeinowych jest ich działanie immunosupresyjne, które wykazano na modelu mysim. Problemem związanym z zastosowaniem edein jest też możliwość wewnątrzcząsteczkowej izomeryzacji aktywnych biologicznie izomerów α, a co za tym idzie niska trwałość tych

związków w zasadowym roztworze wodnym. Migracja reszty acylowej z grupy α-aminowej kwasu (*S*)-2,3-diaminopropanowego (izomer α) powoduje powstanie stanu równowagowego ze związkiem z acylowanym ugrupowaniem β-aminowym tego kwasu (nieaktywny biologicznie izomer β).

W trakcie badań mikrobiologicznych nad analogami edein wykorzystałem związki otrzymane podczas pracy doktorskiej dr. Zbigniewa Czajguckiego [32]. Testy mikrobiologiczne wykonałem według procedury opisanej dla temporyny A oraz analogów (rozdz. 2.1). Badania nowych analogów edeiny A oraz edeiny D, w których główną zmianą struktury było zastąpienie reszty kwasu (2*R*,6*S*,7*R*)-2,6-diamino-7-hydroksyazelainowego ugrupowaniami zawierającymi reszty kwasu (3*R*,4*S*)- lub (3*S*,4*S*)-4,5-diamino-3-hydroksypentanowego (Rys. 5) uwidoczniły niską aktywność mikrobiologiczną tych związków. Badania związane z właściwościami immunologicznymi analogów edein nie wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej, są w toku. Brak aktywności mikrobiologicznej analogów może okazać się korzystny w dalszych badaniach biologicznych dotyczących immunosupresji.

Wyniki badań dotyczących syntezy i testów mikrobiologicznych grupy analogów edeinowych zostały opublikowane [33].



Edeina	R^1	R^2
A	–OH	–H
B	–OH	$–C(NH)NH_2$
D	–H	–H
F	–H	$–C(NH)NH_2$

(*S*)-*β*-Tyr – (*S*)-*β*-tyrozyna
(*S*)-*β*-Phe – (*S*)-*β*-fenylo-*β*-alanina
(*S*)-Ise – (*S*)-izoseryna
(*S*)-A_2pr – kwas (*S*)-2,3-diaminopropanowy
(2*R*,6*S*,7*R*)-A_2ha – kwas (2*R*,6*S*,7*R*)-2,6-diamino-7-hydroksyazelainowy
Gly – glicyna
Sper – spermidyna
Gsper – guanylospermidyna

Rys. 5. Struktura chemiczna izomerów α edein A, B, D i F.

2. 2. Ekstrakcja do fazy stałej jako nowa metoda oczyszczania syntetycznych peptydów

W ramach poszukiwania nowych technik otrzymywania peptydów zaproponowałem po raz pierwszy tanią i prostą technikę oczyszczania syntetycznych peptydów.

Oczyszczanie peptydów jest jednym z najtrudniejszych etapów w procesie otrzymywania tych związków. W „surowej" próbce znajduje się szereg zanieczyszczeń poprocesowych o strukturze peptydów, związków używanych w trakcie syntezy do ochrony grup funkcyjnych, odczynników dodawanych podczas deprotekcji peptydów od ziaren nośnika. Najtrudniejsze w rozdzieleniu są zanieczyszczenia o charakterze peptydowym. Oczyszczanie peptydów jest więc procesem trudnym i pracochłonnym. Obecnie do najczęściej stosowanych technik w warunkach laboratoryjnych oczyszczania „surowych" peptydów należy wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Dużo rzadziej stosuje się filtrację żelową na złożach typu Sephadex czy chromatografię jonowymienną.

Zarówno w skali laboratoryjnej jak i oczyszczaniu na skalę przemysłową z użyciem metod chromatograficznych stosuje się podobne złoża takie jak krzemionka modyfikowana łańcuchami alkilowymi C8 lub C18 oraz analogiczną taktykę rozdziału jak w HPLC. Peptydy eluuje się ze złoża w układzie gradientowym woda-acetonitryl (skala laboratoryjna) lub woda-etanol (skala przemysłowa). Etap oczyszczania peptydów z wykorzystaniem HPLC jest jednym z droższych w procesie pozyskiwania czystych związków i znacząco wpływa na końcowy koszt pozyskania nowej substancji. Wymaga użycia kosztownego sprzętu, materiałów eksploatacyjnych (kolumny preparatywne) oraz dużej ilości rozpuszczalników organicznych.

Mając na uwadze fakt, że niektóre peptydy po syntezie z użyciem metodologii Fmoc są tylko w niewielkim stopniu zanieczyszczone, można rozdzielanie tego typu związków prowadzić z pominięciem preparatywnej HPLC. Opracowałem procedurę oczyszczania peptydów w oparciu o technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Dotychczas nie było doniesień dotyczących oczyszczania syntetycznych peptydów tą techniką. Metodą SPE oczyściłem m.in. temporynę A (FLPLIGRVLSGIL-NH_2) oraz kalcyterminę (VAIALKAAHYHTHKE) otrzymane przeze mnie do badań w ramach realizacji projektu naukowego dotyczącego peptydowych środków konserwujących [34]. Doświadczenia przeprowadziłem z zastosowaniem klasycznych kolumienek do

ekstrakcji do fazy stałej o średnicy ziaren 40 μm. Efekty na takich wypełnieniach były niezadowalające, dlatego do oczyszczania zastosowałem złoża powszechnie używanego jako wypełnienie do kolumn HPLC (Kromasil C8, średnica ziaren 5 μm). Ze względu na bardzo małe rozmiary sorbentu i niebezpieczeństwo przedostawania się go przez komercyjne kartridże zastosowałem kolumienki własnej konstrukcji. Peptydy eluowałem z kolumienki porcjami wodnych roztworów o rosnącym stężeniu acetonitrylu. W ramach opublikowanej pracy przedstawiłem oczyszczanie w skali 20 mg oraz 200 mg [35]. Peptydy rozdzielałem na kolumienkach zawierających 0,5 lub 2,5 g sorbentu Kromasil. Następnie frakcje poddawałem analizom z wykorzystaniem HPLC. Otrzymane wyniki, dotyczące czystości peptydów jak i uzyskane wydajności podczas oczyszczania były porównywalne z wynikami otrzymywanymi dla oczyszczania z użyciem HPLC.

Ekstrakcja do fazy stałej może być też doskonałą techniką zatężania próbek zawierających peptydy po utlenianiu grup tiolowych do wiązań disulfidowych lub podczas wymiany przeciwjonów w trakcie przygotowywania peptydów do badań biologicznych.

Zastosowanie tej techniki wiąże się z bardzo małym zużyciem eluentów, niewielkim kosztem wykonania kolumienki oraz bardzo szybkim procesem chromatograficznego rozdziału wynoszącym około 5-10 minut. Ekstrakcja do fazy stałej jest doskonałą alternatywą dla preparatywnego HPLC, szczególnie w przypadkach mało skomplikowanych mieszanin zawierających surowe peptydy. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane [35].

2.3. Badania *in vitro* peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Uwagi ogólne

Badania *in vitro* miały na celu poszerzenie wiedzy na temat właściwości i spektrum działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Publikowane dotychczas wyniki zawierały przeważnie dane uzyskiwane na wąskim spektrum drobnoustrojów oraz bardzo rzadko zawierały porównanie w jednym doświadczeniu kilku peptydów przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku syntetycznych analogów peptydów dane literaturowe są bardzo ubogie, co znacząco utrudnia odpowiednie zaprojektowanie dalszych badań biologicznych. W ramach tej części pracy otrzymałem też kilka nowych, niepublikowanych wcześniej związków chemicznych.

Peptydy badane w testach *in vitro* otrzymałem metodą na stałym nośniku polimerowym z wykorzystaniem metodologii Fmoc, zgodnie ze schematem postępowania jak w przypadku temporyny A oraz jej analogów (rozdz. 2.1). Odpowiednio scharakteryzowane peptydy, z wykorzystaniem chromatografii RP-HPLC oraz spektrometrii MALDI-TOF, były badane pod kątem aktywności mikrobiologicznej.

W badaniach *in vitro* wykorzystałem ponad 120 związków peptydowych, przy czym badania dotyczące dziesięciu najaktywniejszych struktur oraz ich właściwości mikrobiologicznych zostały opublikowane. Do grupy całkowicie nowych związków należą krótkie di- i tripeptydy modyfikowane resztą kwasu palmitynowego, których otrzymałem dziewięć. Spośród nich dwie najbardziej aktywne cząsteczki zostały poddane testom mikrobiologicznym wobec bakterii Gram-dodatnich (Rys. 6). Wyniki prac dotyczących projektowania, syntezy i badań mikrobiologicznych tej grupy związków zostały opublikowane [36].

Palm-Lys-Lys

Palm-Lys-Lys-NH_2

Rys. 6. Sekwencje aminokwasowe lipopeptydów, analogów lizylolizyny acylowanych resztą kwasu palmitynowego.

W testach mikrobiologicznych wykorzystałem też peptydy występujące w przyrodzie: aureinę, citropinę, protegrynę, uperynę i temporynę (Rys. 7). Wyniki badań mikrobiologicznych tych peptydów, opisane w literaturze, są raczej skromne, co skłoniło mnie do rozszerzenia badań nad ich aktywnością.

aureina 1.2	Gly-Leu-Phe-Asp-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Ala-Glu-Ser-Phe-NH_2
citropina 1.1	Gly-Leu-Phe-Asp-Val-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-Ile-Gly--Gly-Leu-NH_2
protegryna 1	Arg-Gly-Gly-Arg-Leu-Cys-Tyr-Cys-Arg-Arg-Arg-Phe-Cys--Val-Cys-Val-Gly-Gly-Arg-NH_2
uperyna 3.6	Gly-Val-Ile-Asp-Ala-Ala-Lys-LysVal-Val-Asn-Val-Leu-Lys--Asn-Leu-Phe-NH_2
temporyna A	Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Gly-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Ile-Leu-NH_2

Rys. 7. Sekwencje aminokwasowe naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych występujących w przyrodzie.

W grupie badanych związków, otrzymanych na drodze syntezy, były też analogi naturalnych peptydów, takich jak m.in. histatyna, protegryna, magainina oraz indolicydyna o zmodyfikowanej strukturze niewystępującej w przyrodzie. Peptydy będące w trakcie badań klinicznych, z którymi wiąże się duże nadzieje aplikacyjne w konkretnych przypadkach klinicznych, to: demegen P-113 (analog histatyny) proponowany do leczenia zapaleń dziąseł i zakażeń drożdżakami jamy ustnej; iseganan IB-367 (analog protegryny) będący w badaniach dotyczących leczenia owrzodzeń jamy ustnej oraz infekcji płucnych towarzyszących mukowiscydozie; omiganan (analog MBI-226) badany pod kątem leczenia opryszczki oraz pexiganan MSI-78 (analog magaininy) mający znaleźć zastosowanie w leczeniu owrzodzeń stóp i podudzi u cukrzyków (Rys. 8) [37-40]. Do analogów naturalnych peptydów należy też CAMEL, peptyd zbudowany z fragmentów melityny i cekropiny, będący w trakcie badań przedklinicznych [41].

CAMEL	Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Gly-Ala-Val--Leu-Lys-Val--Leu- NH_2
demegen P-113	Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys--Phe-His-NH_2
iseganan IB-367	Arg-Gly-Gly-Leu-Cys-Tyr-Cys-Arg-Gly-Arg-Phe--Cys-Val-Cys-Val-Gly-Arg-NH_2
omiganan MBI-226	Ile-Leu-Arg-Trp-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg-Arg--Lys-NH_2
pexiganan MSI-78	Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys--Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Lys-Ile-Leu-Lys-Lys--NH_2

Rys. 8. Sekwencje aminokwasowe syntetycznych analogów peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Właściwe testy mikrobiologiczne *in vitro* na szczepach klinicznych bakterii i grzybów poprzedziłem testami peptydów na szczepach referencyjnych zgodnie z procedurami NCCLS. Wstępne badania na szczepach referencyjnych przeprowadzałem zgodnie z metodami zalecanymi przez NCCLS do oceny aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych analogicznie jak dla temporyny A oraz analogów (rozdz. 2.1). Z wyjątkiem badań na szczepach klinicznych drożdżaków *Candida*, wszystkie pozostałe badania na drobnoustrojach klinicznych zostały wykonane we współpracy ze specjalistycznymi ośrodkami mikrobiologicznymi.

W ramach tych badań współpracowałem z następującymi ośrodkami: Katedrą Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (AMG), Katedrą Biotechnologii z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG, Zakładem Mikrobiologii Jamy Ustnej AMG oraz Kliniką Chorób Zakaźnych w Ankonie (Włochy) i Centrum Medycznym Uniwersytetu w Ohio (USA).

W ramach niniejszej rozprawy interesującym było zaproponowanie kilku kierunków badań z wykorzystaniem zsyntezowanych przeze mnie związków. Na

podstawie wyników aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków wobec szczepów referencyjnych otrzymane peptydy były badane wielokierunkowo na drobnoustrojach uzyskiwanych z materiału klinicznego.

Badania mikrobiologiczne peptydów

We współpracy z prof. Ewą Łojkowską z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-AMG przebadano dwa peptydy (CAMEL oraz Iseganan) względem szczepów klinicznych oraz referencyjnych. W testach porównano aktywność peptydów do chemioterapeutyku grupy fluorochinolonów, cyprofloksacyny. Badania te wykazały wysoką skuteczność przeciwbakteryjną peptydów, a uzyskane wyniki MIC i MBC, z wyjątkiem bakterii *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, były zbliżone do cyprofloksacyny [42]. W przypadku drobnoustrojów *Acinetobacter baumanii* oraz *Staphylococcus aureus* MRSA syntetyczne polipeptydy znacząco przewyższały aktywnością cyprofloksacynę.

W tym samym laboratorium przeprowadzono badania na patogenach roślin. W testach wykorzystano peptydy iseganan, CAMEL oraz pexiganan. Doświadczenia te udowodniły wysoką skuteczność peptydów w hamowaniu infekcji bakteryjnych roślin [43]. W testach wykorzystano szczepy *Pectobacterium carotovorum* i *Pectobacterium chrysanthemum* powodujących bakteryjne gnicie roślin uprawnych. Ze względu na wysoki koszt otrzymywania peptydów, perspektywiczne zastosowanie tych związków w prewencji zakażeń organizmów roślinnych, jest znacząco utrudnione. Tym niemniej uzyskane wyniki mogą zachęcać do poszukiwania związków o prostszej budowie chemicznej lub opracowywania przemysłowych metod syntezy peptydów do ochrony roślin.

Część badań wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej była poświęcona poszukiwaniom związków o możliwie najprostszej budowie chemicznej, ale zachowujących aktywność naturalnych peptydów. W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałem dziewięć nowych lipopeptydów. Po przebadaniu na szczepach referencyjnych najaktywniejsze związki (Palm-Lys-Lys oraz Palm-Lys-Lys-NH_2) poddano badaniu na drobnoustrojach klinicznych [36]. Obecnie badania te są kontynuowane. Związki te, ze względu na bardzo niski koszt i prostotę otrzymywania, są doskonałymi kandydatami na leki.

Duży nacisk w trakcie poszukiwania nowych zastosowań dla peptydów przeciwdrobnoustrojowych został położony na leczenie ciężkich zakażeń u ludzi. Do takich należą m.in. zakażenia drobnoustrojami oportunistycznymi u chorych z niewydolnością jednego lub kilku odpornościowych mechanizmów obronnych. Niedobory odpowiedzi immunologicznej najczęściej zdarzają się w przypadku zaawansowanego zakażenia (np. wirusem HIV), urazu, zabiegu chirurgicznego oraz stanów po przeszczepie narządów (głównie immunosupresja) lub chemioterapii nowotworów. Upośledzenie układu odpornościowego powoduje, że dotąd niepatogenne (awirulentne) mikroorganizmy mogą prowadzić do zakażeń zagrażających życiu pacjenta.

W ramach współpracy z prof. Anną Kędzią z Zakładu Mikrobiologii Jamy Ustnej syntetyczne peptydy przebadano na drożdżakach z rodzaju *Candida* wyizolowanych od pacjentów z zakażeniami jamy ustnej i dróg oddechowych. W testach mikrobiologicznych wykorzystałem 34 szczepy należące do 6 gatunków grzybów: *Candida albicans* (18), *C. tropicalis* (3), *C. kefyr* (2), *C. krusei* (2), *C. parapsilosis* (5) oraz *C. glabrata* (4). W badaniach przetestowałem 7 peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz dwa konwencjonalne leki przeciwgrzybiczne, amfoterycynę i nystatynę. Wszystkie badane peptydy działały przeciwgrzybiczo. Najaktywniejszym związkami były: iseganan, aureina oraz uperyna. Wartości MIC uzyskane dla peptydów były wyższe niż dla konwencjonalnych chemioterapeutyków. Tym niemniej, naturalne pochodzenie tych związków oraz niższa toksyczność w badaniach na komórkach eukariotycznych są dużą zaletą peptydów. Wstępne wyniki uzyskane w teście wywoływania hemolizy oraz wpływu na komórki ludzkie potwierdziły hipotezę, że w stężeniach terapeutycznych peptydy te nie działają toksycznie. Badania dotyczące toksyczności peptydów są obecnie wykonywane we współpracy z Centrum Onkologii w Gliwicach i nie wchodzą w skład przedstawionej rozprawy habilitacyjnej. Nowością pracy, dotyczącej badania aktywności przeciwgrzybicznej peptydów względem drożdżaków, jest porównanie w jednym doświadczeniu oraz zgodnie z zalecanymi wytycznymi dotyczącymi badania tej grupy mikroorganizmów wielu dotąd osobno testowanych peptydów [44]. Badania takie nie były dotąd prezentowane w literaturze.

W ramach badań *in vitro*, we współpracy z Kliniką Chorób Zakaźnych w Ankonie (Włochy), przeprowadzono testy peptydów na szczepach klinicznych drobnoustrojów uzyskiwanych od chorych cierpiących na choroby nowotworowe, zapalenie płuc,

infekcje dróg moczowych, infekcje narządów wewnętrznych oraz posiadających zakażone rany chirurgiczne. Badaniami objęto następujące peptydy: citropinę, CAMEL, demegen, pexiganan, temporynę, uperynę. W badaniach wykorzystano kilkaset szczepów klinicznych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych: *Acinetobacter baumanii* (20), *Escherichia coli* (20), *Enterococcus faecalis* (42), *Pseudomonas aeruginosa* (20), *Rhodococcus equi* (12), *Staphylococcus aureus* (30), *Staphylococcus epidermidis* (30), *Stenotrophomonas maltophila* (20). Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC) oraz minimalnego stężenia bójczego (MBC) poszerzono o badania kinetyki zahamowania wzrostu oraz badanie synergizmu badanych peptydów z powszechnie stosowanymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi (FIC). Wszystkie uzyskane wyniki odnoszono do wartości uzyskanych dla konwencjonalnych chemioterapeutyków. W zależności od rodzaju drobnoustroju zastosowano następujące związki: amikacynę, ampicylinę, amoksycylinę, ceftriakson, cyprofloksacynę, doksycyklinę, imipenem, linezolid, klarytromycynę, kolistynę, polimyksynę E, rifampicynę oraz wankomycynę. Badane peptydy wykazywały bardzo wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową. W wielu testach działały też synergistycznie z konwencjonalnymi antybiotykami w ramach terapii skojarzonej. Badania kinetyki zahamowania wzrostu dowiodły, że związki te skutecznie działają bójczo na drobnoustroje w ciągu zaledwie kilku minut. Uzyskane wyniki oraz ich liczba stanowią podstawę do projektowania nowych leków na bazie peptydów do najtrudniejszych zakażeń związanych z upośledzeniem odporności [45-53].

W badaniach *in vitro* syntetyczne peptydy, citropina oraz protegryna zostały przebadane w teście konserwacji wg procedury zalecanej przez Farmakopeę Polską VI. Uzyskane wyniki wykazały wysoką skuteczność przeciwdrobnoustrojową związków, czyniąc je potencjalnymi substancjami mogącymi zastąpić klasyczne konserwanty [54].

W ramach szeroko prowadzonych badań otrzymane peptydy były badane pod kątem aktywności w stosunku do pierwotniaków we współpracy z zespołem dr. Bradforda McGwire (Centrum Medycznym Uniwersytetu w Ohio, USA). O tym, że peptydy przeciwrobnoustrojowe pełnią doniosłą rolę w zwalczaniu infekcji pierwotniakowych świadczyć może fakt, iż enzymy zdolne do degradacji peptydów, produkowane przez niektóre organizmy chorobotwórcze są istotnym czynnikiem wirulencji. Przykładem może być *Leishmania*, pierwotniak posiadający na swojej powierzchni leiszmanolizynę. Mutanty pozbawione funkcji tego enzymu wykazują

znaczną wrażliwość na peptydy przeciwdrobnoustrojowe, podczas gdy szczep dziki cechuje się opornością [55].

2.4. Badania *in vivo* peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Peptydy w leczeniu sepsy

Na podstawie wyników testów *in vitro*, we współpracy z Kliniką Chorób Zakaźnych w Ankonie (Włochy), przeprowadzono pionierskie badania peptydów pod kątem leczenia zespołu objawów wstrząsu septycznego, jednej z głównych przyczyn umieralności chorych w szpitalnych oddziałach intensywnej terapii. Powikłania septyczne, rozwijające się przeważnie po operacji lub urazie, są powodowane przez wyselekcjonowaną populację drobnoustrojów opornych na wiele leków i stanowią przyczynę wysokiej liczby zejść śmiertelnych wśród osób zakażonych. Na świecie z powodu ciężkiej sepsy umiera rocznie ok. 750 tys. ludzi (ponad 1400 osób dziennie). Czynnikiem wywołującym sepsę są lipopolisacharydy (LPS), które są głównym immunologicznie czynnym elementem strukturalnym ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Dzięki wysokiemu powinowactwu peptydów przeciw-drobnoustrojowych do LPS, antybiotyki te są skutecznym narzędziem hamującym rozwój posocznicy.

W badaniach dotyczących leczenia sepsy u zwierząt doświadczalnych wykorzystano analogi naturalnych peptydów: analog histatyny (demegen), analog magaininy (pexiganan) oraz analog protegryny (iseganan) [56-60]. Badania wykonano także wykorzystując temporynę, citropinę oraz uperynę [61,62]. Doświadczenia były prowadzone za zgodą właściwej dla wykonania badań *in vivo* lokalnej komisji etycznej Uniwersytetu w Ankonie (Włochy). Testy wykonywano na szczurach rasy Wistar lub myszach w trzech podstawowych modelach doświadczalnych. Szok septyczny został wywołany trzema niezależnymi metodami: dootrzewnowym podaniem LPS (model 1), indukcją zapalenia otrzewnej przez bakterie (model 2), poprzez przewiązanie i nakłucie brzegu przeciwkrezkowego kątnicy (model 3). W toku prowadzonych doświadczeń w końcowej fazie badań określono odsetek pozytywnych kultur krwi, liczbę bakterii w płynie jamy brzusznej, odsetek śmiertelności oraz zawartość endotoksyny i czynnika martwicy nowotworu (TNF) w surowicy.

Aktywność związków w testach *in vivo* porównywano do wartości uzyskanych dla konwencjonalnych antybiotyków stosowanych w leczeniu sepsy. W badaniach wykorzystano polimyksynę B, piperacylinę i imipenem. Badane związki dorównywały lub przewyższały aktywnością konwencjonalne związki chemiczne, leki używane w leczeniu takich przypadków klinicznych jak sepsa. Szczególnie dobre rezultaty uzyskano w leczeniu skojarzonym z zastosowaniem peptydów oraz klasycznych antybiotyków.

Impregnacja materiałów medycznych peptydami przeciwdrobnoustrojowymi

Badania *in vivo* prowadzone w ramach tej pracy dotyczyły również testów związanych z immobilizowaniem fizycznym peptydów na materiałach medycznych implantowanym zwierzętom doświadczalnym. Zakażenia związane z wprowadzaniem do ciała pacjenta wszelkiego rodzajów implantów stanowią poważny problem kliniczny. Komplikacje takie dotyczą rutynowego używania cewników, jak i skomplikowanych przypadków związanych z uzupełnianiem ubytków naczyń krwionośnych czy wszczepów zastawek serca. Tworzenie przez drobnoustroje biofilmu uniemożliwia prawidłową odpowiedź ze strony układu odpornościowego pacjenta, ale utrudnia też prawidłową terapię farmakologiczną związaną z leczeniem tych zakażeń. W większości przypadków zakażone materiały trzeba usunąć z organizmu pacjenta, osobę z infekcją poddawać intensywnej antybiotykoterapii oraz ponownie wszczepić nowy materiał. Działanie takie naraża pacjenta na bardzo duże niebezpieczeństwo, często prowadzi także do zejść śmiertelnych.

Badania dotyczące prewencji zakażeń drobnoustrojowych zostały wykonane we współpracy z Kliniką Chorób Zakaźnych w Ankonie (Włochy). W badaniach wykorzystano citropinę, temporynę oraz antybiotyki stosowane w lecznictwie, wankomycynę, rifampicynę, teikoplaninę, minocyklinę oraz linezolid. Szczególnie dobre rezultaty osiągnięto w zakażeniach gronkowcowych kojarząc temporynę z linezolidem, nowoczesnym lekiem z grupy oksazolidynonów oraz temporynę z peptydem RIP otrzymanym w zespole prof. Naomi Balaban (Szkoła Medycyny Klinicznej Mayo, Rochester, USA) [63-65].

3. Podsumowanie

Endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz ich syntetyczne analogi mogą stanowić źródło do pozyskiwania nowych, skuteczniejszych antybiotyków stosowanych w zakażeniach u człowieka. Potrzeba ta jest w głównej mierze umotywowana powstawaniem coraz większej ilości szczepów drobnoustrojów opornych na działanie konwencjonalnych antybiotyków.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy pokazują, iż badane związki nie opisane dotychczas w literaturze (analogi temporyny oraz lipopeptydy) jak i peptydy występujące w przyrodzie oraz ich syntetyczne analogi mogą stanowić dobrą matrycę i punkt wyjścia do konstrukcji efektywnych oraz bezpiecznych związków przeciwbakteryjnych o szerokim zastosowaniu. Jednocześnie aktywność tych związków pozwala na perspektywiczne wykorzystanie ich jako nowoczesne konserwanty, bądź środki ochrony roślin. Przedłożony w ramach rozprawy habilitacyjnej cykl publikacji prezentuje wyniki badań dotyczących projektowania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz szerokiego wachlarza badań mikrobiologicznych wykonywanych w testach *in vitro* oraz *in vivo*. Otrzymane rezultaty udowadniają wysoką skuteczność peptydów w leczeniu nawet tak trudnych przypadków jak powikłania septyczne oraz prewencji zakażeń materiałów medycznych. Duża liczba przebadanych związków na szerokim spektrum drobnoustrojów (bakterie Gram-dodatnie, bakterie Gram-ujemne, grzyby) nie wyklucza też zastosowania tych peptydów w innych trudnych przypadkach klinicznych.

Podczas syntezy peptydów po raz pierwszy zdecydowałem się na modyfikację drogiego i czasochłonnego procesu, jakim jest oczyszczenie peptydu po syntezie. W strategii otrzymywania związku peptydowego zastosowałem niewykorzystywaną dotychczas metodę ekstrakcji do fazy stałej w chemii peptydów.

4. Wnioski

W ramach niniejszej pracy otrzymałem około 120 związków o strukturze peptydowej. Na drodze syntezy otrzymałem między innymi nie opisane w literaturze retro-analogi temporyny i krótkie lipopetydy oraz wiele peptydów pochodzenia naturalnego i ich analogów strukturalnych.

1. Dziesięć najaktywniejszych związków przebadałem pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej w testach *in vitro* oraz *in vivo*. Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują na celowość wytypowania tej grupy związków do poszukiwania nowych antybiotyków.
2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów poddanych badaniu była porównywalna z konwencjonalnymi antybiotykami, stosowanymi w lecznictwie.
3. Przebadane peptydy działały synergistycznie z antybiotykami konwencjonalnymi. Aspekt ten jest szczególnie ważny i może być wykorzystywany podczas leczenia m. in. zespołu objawów wstrząsu septycznego w terapii skojarzonej.
4. Wytypowane związki do badań szczegółowych, wykazywały także aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec grzybów, szczególnie drożdżaków, które są główną przyczyną zakażeń grzybiczych u ludzi. Ponadto związki te zostały przebadane wobec patogenów roślin, a wyniki tych prac potwierdzają możliwość projektowania na bazie tych związków środków ochrony roślin.
5. Wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów oraz niska toksyczność powoduje, że mogą one być przydatne również w konserwacji produktów leczniczych i kosmetyków.
6. Dodatkowym, niewątpliwym elementem nowości naukowej, jest także zastosowanie metody ekstrakcji do fazy stałej (SPE) jako skutecznego sposobu oczyszczania związków peptydowych. Dzięki zastosowaniu tej metody otrzymywałem więcej nowych związków w krótszym czasie, przy zachowaniu wysokiej czystości związku finalnego oraz maksymalnym obniżeniu kosztów pozyskania czystego peptydu.
7. Zastosowanie techniki immobilizacji fizycznej do tworzenia aktywnych przeciwdrobnoustrojowo powierzchni implantów oraz materiałów medycznych może znaleźć w przyszłości zastosowanie w chirurgii rekonstrukcyjnej.

Piśmiennictwo

1. Spellberg B., Powers J.H., Brass E.P., Miller L.G., Edwards J.E. Jr.: Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis*, 2004;38(9):1279-86.
2. Lopez A.D., Mathers C.D., Ezzati M., Jamison D.T., Murray C.J.: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 2006;367(9524):1747-57.
3. World Health Organization (WHO). Death by cause, sex and mortality stratum in WHO Regions, estimates for 2002. The World Health Report – 2003, Geneva: WHO, 2003.
4. Nagappan V., Kazanjian P.: Bacterial infections in adult HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*, 2005;6(4):213-28.
5. DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G.: The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ*, 2003;22(2):151-85.
6. Gabay J.E.: Ubiquitous natural antibiotics. *Science,* 1994;264(5157):373-4.
7. Kleinkauf H., von Dohren H.: Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem*, 1990;192(1):1-15.
8. Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.: Microbiol Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Microbiol Rev*, 1995;59(2):171-200.
9. Sahl H.G.: Gene-encoded antibiotics made in bacteria. *Ciba Found Symp,* 1994:186:27-42.
10. Nissen-Meyer J., Nes I.F.: Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 1997;167(2/3):67-77.
11. Smarda J., Smajs D.: Colicins-exocellular lethal proteins of Escherichia coli. *Folia Microbiol (Praha)*,1998;43(6):563-82.
12. McAuliffe O., Ross R.P., Hill C.: Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev,* 2001;25(3):285-308.
13. Guder A., Wiedemann I., Sahl H.G.: Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopolymers*, 2000;55(1):62-73.
14. Bower C.K., Bothwell M.K., McGuire J.: Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001;22(4):259-265.

15. Allgaier H., Jung G., Werner R.G., Schneider U., Zahner H.: Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. *Eur J Biochem*, 1986;160(1):9-22.
16. Naruse N., Tenmyo O., Tomita K., Konishi M., Miyaki T., Kawaguchi H., Fukase K., Wakamiya T., Shiba T.: Lanthiopeptin, a new peptide antibiotic. Production, isolation and properties of lanthiopeptin. *J Antibiot (Tokyo),* 1989;42(6):837-45.
17. Kido Y., Hamakado T., Yoshida T., Anno M., Motoki Y., Wakamiya T., Shiba T.: Isolation and characterization of ancovenin, a new inhibitor of angiotensin I converting enzyme, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo),* 1983;36(10): 1295-9.
18. Kamysz W., Okrój M., Łukasiak J.: Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol*, 2003;50(2):461-9.
19. Shai Y.: Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 2002;66(4):236-48.
20. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., Mocchegiani F., D'amato G., Silvestri C., Riva A., Del Prete M. S., Saba V., Scalise G.: Antiendotoxin activity of antimicrobial peptides and glycopeptides. *J Chemother*, 2003;15(2):129-33.
21. Kamysz W., Łukasiak J.: Endogenne antybiotyki peptydowe. *Farm Pol*, 2002;58(13):617-623.
22. Boman H.G., Steiner H.: Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1981;94-95:75-91.
23. Nascimento A.C., Fontes W., Sebben A., Castro M.S.: Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept Lett*, 2003;10(3):227-38.
24. Malina A., Shai Y.: Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*, 2005;390(3):695-702.
25. Kamysz W.: Are antimicrobial peptides an alternative for conventional antibiotics? *Nucl Med Rev Cent East Eur,* 2005;8(1):78-86.
26. Bruckdorfer T., Marder O., Albericio F.: From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol,* 2004;5(1):29-43.
27. Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S., Miele R., Mangoni M.L. Barra D.: Temporins, antimicrobial peptides from the european red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem*, 1996;242:788-92.

28. Harjunpaa I., Kuusela P., Smoluch M.T., Silberring J., Lankinen H., Wade D.: Comparison of synthesis and antibacterial activity of temporin A. *FEBS Lett,* 1999;449(2-3):187-90.
29. Fields G.B., Noble R.L: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenyl-methoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*, 1990;35(3):161-214.
30. Kamysz W., Mickiewicz B., Rodziewicz-Motowidło S., Greber K., Okrój M.: Temporin A and its retro-analogues: synthesis, conformational analysis and antimicrobial activities. *J Pept Sci*, 2006;12(6):533-7.
31. Kuryło-Borowska Z.: Isolation and properties of pure edenie, an antibiotic of strain *Bacillus brevis* Vm4. *Bull Inst Marine Med Gdańsk,* 1959;10:151-63.
32. Czajgucki Z.: Synteza i właściwości biologiczne nowych analogów antybiotyków edeinowych. Praca doktorska. Politechnika Gdańska, 2007.
33. Czajgucki Z., Andruszkiewicz R., Kamysz W.: Structure activity relationship studies on the antimicrobial activity of novel edeine A and D analogues. *J Pept Sci*, 2006;12(9):653-62.
34. Prokopowicz M., Kamysz W., Łukasiak J.: Peptydowe środki konserwujące. Projekt KBN nr 3P05F 04124.
35. Kamysz W., Okrój M., Łempicka E., Ossowski T., Łukasiak J.: Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. *Acta Chromatographica*, 2004;14:180-6.
36. Kamysz W., Silvestri C., Cirioni C., Giacometti A., Licci A., Vittoria A.D., Okroj M., Scalise G.: In vitro activity of lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH2 and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant Gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother,* 2007;51(1): 354-8
37. Van Dyke T., Paquette D., Grossi S., Braman V., Massaro J., D'Agostino R., Dibart S., Friden P. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis: a phase-2 multi-center study. *J Clin Periodontol*, 2002;29(2):168-76.
38. Giles F.J., Redman R., Yazji S., Bellm L.: Iseganan HCl: a novel antimicrobial agent. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002;11(8):1161-70.
39. Sader H.S., Fedler K.A., Rennie R.P., Stevens S., Jones R.N.: Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004;48(8):3112-8.

40. Lamb H.M., Wiseman R.L.: Pexiganan acetate. *Drugs*, 1998;56(6):1047-52.
41. Oh H., Hedberg M., Wade D., Edlund C. Activities of synthetic hybrid peptides against anaerobic bacteria: aspects of methodology and stability. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000;44(1):68-72.
42. Bogucka K., Królicka A., Kamysz W., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E.: Activities of synthetic peptides against human pathogenic bacteria. *Pol J Microb*, 2004;53(1):41-4.
43. Kamysz W., Królicka A., Bogucka K., Ossowski T., Łukasiak J., Łojkowska E.: Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *J Phytopathol*, 2005;153:313-7.
44. Kamysz W., Nadolski P., Kędzia A., Cirioni O., Barchiesi F., Giacometti A., Scalise G., Łukasiak J., Okrój M.: In vitro activity of synthetic antimicrobial peptides against *Candida. Pol J Microb,* 2006;55(4):303-7.
45. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics. *J Antimicrob Chemother,* 2005;55(2):272-4.
46. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Licci A., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients. *Int J Antimicrob Agents*, 2005;26(3):235-40.
47. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Licci A., D'Amato G., Nadolski P., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of uperin 3.6 against gram-positive cocci isolated from immunocompromised patients. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2005; 49(9):3933-6.
48. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. *Peptides,* 2005;26(11):2110-6.
49. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., Riva A., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of the histatin derivative P-113 against multidrug-resistant pathogens responsible for pneumonia in immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother,* 2005;49(3):1249-52.

50. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of citropin 1.1 against gram-positive pathogens causing skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005;49(6):2507-2509.
51. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*. *J Antimicrob Chemother,* 2005;55(7):410-2.
52. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M. S., Łukasiak J., Scalise G.: In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH(2) on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis,* 2004;49(3):197-200.
53. Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Łukasiak J., Scalise G.: Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH_2 against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*, 2003;24(9):1315-8.
54. Kamysz W., Turecka K.: Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol Pharm,* 2005 ;62(5):341-4.
55. Kulkarni M.M., McMaster W.R., Kamysz E., Kamysz W., Engman D.M., McGwire BS.: The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol,* 2006;62(5):1484-97.
56. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Orlando F., Kamysz W., D'Amato G., Mocchegiani F., Łukasiak J., Silvestri C., Saba V., Scalise G.: Potential therapeutic role of histatin derivative P-113d in experimental rat models of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *J Infect Dis*, 2004;190(2):356-64.
57. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., Kamysz W., Rocchi M., D'Amato G., Mocchegiani F., Silvestri C., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. *Peptides*, 2005;26(2):207-16.

58. Giacometti A., Ghiselli R., Cirioni O., Mocchegiani F., D'Amato G., Orlando F., Sisti V., Kamysz W., Silvestri C., Naldoski P., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. *J Antimicrob Chemother*, 2004;54(3):654-60.
59. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Viticchi C., Orlando F., D'Amato G., Del Prete M.S., Kamysz W., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock. *Peptides,* 2003;24(11):1747-52.
60. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., D'Amato G., Del Prete M.S., Orlando F., Kamysz W., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Administration of protegrin peptide IB-367 to prevent endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats. *Gut,* 2003; 52(6):874-8.
61. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Kamysz W., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis,* 2005;192(9):1613-20.
62. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli F., Mocchegiani F., Silvestri C., Orlando F., Kamysz W., D'Amato G., Kamysz E., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Amphibian peptides prevent endotoxemia and bacterial translocation in bile duct-ligated rats. *Crit Care Med,* 2006;34(9):2415-20.
63. Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Orlando F., D'Amato G., Kamysz W., Mocchegiani F., Sisti V., Silvestri C., Rocchi M., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Temporin A soaking in combination with intraperitoneal linezolid prevents vascular graft infection in a subcutaneous rat pouch model of infection with *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. *Antimicrob Agents Chemother,* 2004;48(8):3162-4.
64. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Kamysz W., Orlando F., Mocchegiani F., Silvestri C., Licci A., Chiodi L., Łukasiak J., Saba V., Scalise G.: Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides,* 2006;27(6):1210-6.

65. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Dell'Acqua G., Gov Y., Kamysz W., Łukasiak J., Mocchegiani F., Orlando F., D'Amato G., Balaban N., Saba V., Scalise G.: Prophylactic efficacy of intraperitoneal temporin A combined with topical RNAIII-inhibiting peptide in a subcutaneous rat pouch model of graft infection due to staphylococci with intermediate resistance to glycopeptides. *Circulation,* 2003;108(6):767-71.