

Abstract: The constantly growing number of multidrug-resistant bacterial strains prompts the search for alternative treatments. Synthetic peptides based on natural antimicrobial peptides, also known as antimicrobial lipopeptides, can become a promising group of “drugs” to fight multi-resistant bacteria. The present paper discusses the origins of synthetic lipopeptides, their classification and antimicrobial properties.

1. Introduction. 2. Antimicrobial peptides. 3. Classification of antimicrobial peptides. 4. Lipopeptide antibiotics. 5. Synthetic lipopeptides. 5.1. Ultrashort lipopeptides. 5.2. Peptidomimetics. 5.3. Multivalent lipopeptides. 5.4. Hydrocarbon-stapled lipopeptides. 5.5. Antimicrobial lipopeptides in laboratory researches. 6. Summary

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa lipopeptydów

Streszczenie: Ciągłe rosnąca liczba szczepów wieloopornych skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia. Obiecującą grupą „leków” do walki z wieloopornymi mikroorganizmami, bazującą na naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych, mogą stać się syntetyczne peptydy określane mianem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych. W pracy omówiono pochodzenie syntetycznych lipopeptydów, ich podział oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

1. Wstęp. 2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe. 3. Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych. 4. Antybiotyki lipopeptydowe. 5. Syntetyczne lipopeptydy. 5.1. Krótkie syntetyczne lipopeptydy. 5.2. Peptidomimetyki. 5.3. Multiwalentne lipopeptydy. 5.4. Lipopeptydy usztywnione kłmrami węglowodorową. 5.5. Lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach laboratoryjnych. 6. Podsumowanie

Key words: antimicrobial activity, lipopeptides, peptides

Słowa kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, lipopeptydy, peptydy

1. Introduction

The efficiency of the first antibiotics was unquestionable for a long period of time. They were widely applied in therapies. Unfortunately, resistant bacterial strains started to appear already in the 1950s. In the following years, the resistance of microorganisms to antibiotics which were introduced into therapy appeared very quickly. The reason for such state of affairs was, and unfortunately still is, the application of antibiotics without documented indications, in inappropriate dosage or during the breeding of livestock [44]. Currently, the number of alert pathogens is constantly increasing and the issue of resistance does not apply only to microorganisms coming from the hospital environment [33]. What is crucial is that if new therapeutic options do not appear, according to Kozińska, by 2050, human mortality will be caused more often by

infections than cancer. It is worth noting that already now infections caused by resistant microorganisms are the cause of 700,000 deaths each year all over the world [44]. It is estimated that by 2050, infections caused by resistant microorganisms will have caused over 300 million deaths [15].

Of course, the work on the development of effective antibiotics is still being conducted. It is performed by modifying existing ones or by searching for entirely new classes of antibiotics with completely different molecular targets in microbial cells [44]. Unfortunately, the process of developing new antibiotics and introducing them into therapy is time-consuming and must be preceded by multiple preclinical and clinical tests. Most of the currently used antibiotics are substances developed over the period of 1940–1960 [67]. According to Cochrane et al., the lack of new antibiotics which are effective against Gram-negative bacteria

* Corresponding author: Paulina Czechowicz, Student of the Pharmaceutical Department with a Division of Laboratory Diagnostic; Students Scientific Society of Microbiologists association at the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Medical University in Wrocław, Chałubińskiego Street 4, 50-368 Wrocław; tel. +48 71 7840065; e-mail: paulina.czechowicz.umedwroc@gmail.com

Corresponding author is a laureate of the competition of young scientists. The prize was awarded by the Competition Commission at the Conference under the patronage of PTM: “Vectors and pathogens in the past and the future”, which took place in Wrocław on 24 November 2017.

is particularly alarming [15]. Especially emphasised by the author is the fact that in the last 50 years, only a few antibiotics (e.g. linezolid or daptomycin) have been approved for the treatment of systemic infections, which, unfortunately, are effective only against Gram-positive bacteria [15].

Despite noticeable progress in medicine and pharmacy, infection therapy is still difficult. The acquisition of new resistance mechanisms by sensitive bacterial cells and constantly increasing number of multidrug-resistant strains prompts the search for alternative treatment methods, which would be effective in the treatment of infections caused by multi-drug resistant strains. It is hoped that antimicrobial peptides (AMPs), may become an effective weapon in the fight against resistant microorganisms and the biofilm produced by them [17, 33]. Being compounds of natural origin, they can be a valuable base for obtaining new synthetic drugs with broad antimicrobial spectrum [33] and completely different, mechanism of action [67] compared to the available antibiotics. Different mechanism of action, as well as new molecular targets in microbial cells, may become particularly important in the context of the slower appearance and development of microbial resistance during their clinical application.

Synthetic peptides, known as antimicrobial lipopeptides may become a promising group of compounds deployed to combat multidrug-resistant microorganisms, based on natural antimicrobial peptides. Like natural peptides they have a broad spectrum of activity, both antibacterial, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and antifungal [15].

2. Antimicrobial peptides

Lysozyme, a cationic protein discovered in 1922 by Alexander Fleming, is presently considered to be the first AMP [78]. Further research on AMPs dates back to 1939, when gramicidin was discovered. This peptide was isolated from *Bacillus brevis* and was characterised by good efficacy in relation to Gram-positive bacteria [5]. There were reports on the effectiveness of gramicidin in topical application (healing of wounds and ulcerations) and its toxicity in intraperitoneal application [5].

In 1941 tyrocidine, which demonstrated activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, was discovered [5]. In the 1950s Skames and Watson obtained leukine, while Hirsch and Cohen phagocytin. Both proteins were isolated from rabbit leukocytes [33]. In subsequent years, antimicrobial peptides were described in moth (cecropin), plants (thionins), crabs (tachyplesins) and mammals (defensins) [33]. Defensins isolated in 1956 were considered the first AMPs derived from animals [5]. Magainins, cationic peptides, were discovered in the 1980s in frogs by Zasloff et al. [33, 59, 82].

In the organisms of these amphibians, peptides play a protective role – they protect their skin against microorganisms, especially bacteria found in water [41]. They are secreted by frogs as a result of being wounded [33]. In order to obtain frog peptides in laboratory conditions, after stimulating frogs (e.g. with norepinephrine) their skin secretion, after collection and extraction, is separated through chromatography to obtain pure compounds [41].

Currently, many peptides are isolated from insect organisms, mainly bees, where they are a component of their immune system. From the haemolymph of these insects' larvae, subjected to chromatographic separation, pure peptides are obtained [41].

There is intensive ongoing research on new peptides, determination of their structure, properties or modes of action [41]. Databases [30], in which information is collected about peptides, their structure, properties, scope of activity or functions provide an opportunity to obtain new synthetic peptides [59].

Antimicrobial peptides are a naturally occurring group of natural compounds. In the peptide database, The Antimicrobial Peptides Database, by mid-February 2018, 2884 peptides had been described, of which 333 are bacteriocins, 4 were isolated from archaeons, 8 from protists, 13 from fungi, 342 were isolated from plants and 2184 are animal peptides [30]. AMPs are produced both by prokaryotes and eukaryotes. In addition, they are an important element of the immune system in eukaryotes [17].

It is believed that besides the destruction of microorganisms by phagocytes, peptides are the oldest element of immunity [79]. In human body they are part of the innate immune system [47], they form the first line of defence on the skin and mucous membranes, they are found in saliva, and they are mainly produced by keratinocytes of the stratum corneum, neutrophils and sweat glands [8]. The lacrimation is a rich source of AMPs. Their high level is also found in the small intestine [47]. They are involved in the elimination of pathogenic microorganisms, but also in the control of the microbiota of our body. AMPs can neutralize endotoxins as well as exert an immunomodulatory effect the immune system [81]. Increased secretion of natural antimicrobial peptides is observed in the area of inflammation resulting from infection [17].

Antimicrobial peptides may have a different secondary structure, but generally contain from 12 to 50 amino acid residues with a molecular weight of 2–10 kDa and net positive charge, which is associated with basic amino acids occurring in their structure [47, 61, 80]. Most peptides are cationic peptides [81]. The spectrum of their antimicrobial activity includes bacteria (both Gram-positive and Gram-negative), viruses,

fungi as well as protozoa [17, 36, 61, 67]. In the case of some AMPs, antitumor [61] and immunomodulatory activities have also been found. In addition, AMPs may stop the tissue destruction process under the influence of enzymes of microorganisms, as well as accelerate the wound healing process [17].

AMPs interact with the cell membrane of the pathogen leading to its destabilisation and cell lysis. Other mechanisms of action of peptides include the cessation of DNA replication process and protein expression, as well as the escape of adenosine triphosphate [59]. Peptide molecules with net positive charge interact with the negatively charged cell membrane, mainly through electrostatic interactions [59]. In Gram-positive bacteria, antimicrobial peptides are attracted by anionic groups present in peptidoglycan and are bound to negatively charged lipids located on the outer side of the cell membrane [11, 59]. In Gram-negative ones, they become bound to lipopolysaccharide [11].

On the basis of the research on the manner in which antimicrobial peptides penetrate the membrane, 4 mechanisms were identified: barrel stave, carpet, toroidal pore (or worm-hole) and disordered toroidal pore. In the first one there is accumulation of AMPs in such a way that the non-polar parts cover the membrane lipids, and their hydrophilic part forms a kind of gap; the whole accumulation resembles the shape of barrel staves or of a barrel made of staves. The peptides are arranged perpendicular to the surface of the membrane, and the „holes” created in the membrane cause leakage of cellular components. In the AMPs carpet mechanism they lay parallel to the membrane, covering it evenly, like a carpet, and by exerting pressure on it, they lead to disrupting its continuity. Detergents work similarly. In the third mechanism of action of peptides, when they are bound to the membrane, membrane lipids bend in the shape of a ring. The peptides become bound to the polar heads of lipids [59, 61, 79, 83]. In the rarest, fourth way in which antimicrobial peptides penetrate through the membrane, i.e. during the formulation of “disordered ring pores”, peptides are located in the membrane at various angles [83].

3. Classification of antimicrobial peptides

There are several AMPs classification systems. They take into account, among others, the source of peptides or their molecular properties. The most commonly used system is based on the amino acid sequence and secondary structure and divides peptides into the following classes [11, 41, 61, 79]:

- linear α -helical peptides,
- peptides rich in cysteine residues,
- peptides with a β -sheet structure,

- peptides containing a predominant number of amino acids of one type, e.g. glycine, histidine and / or proline,
- peptides containing rare, modified amino acids [11].

In addition, it is worth mentioning the criterion for classifying antimicrobial peptides based on their function. Here, we can also distinguish three groups: peptides which destroy cell wall structure, peptides which bind elements and peptides which destructively affect bacterial membranes [33].

4. Lipopeptide antibiotics

The object of interest for this study is the group of compounds constituting one of the classes of AMPs, referred to as lipopeptides. These compounds currently have the largest potential for effective action against multi-resistant microorganisms [43, 53]. However, it is impossible to talk about them, not to mention natural lipopeptides, most of which are already included in lipopeptide antibiotics, and several are used in clinical practice, such as daptomycin or polymyxin.

Lipopeptide antibiotics are synthesised via the non-ribosomal pathway in bacterial and fungal cells during the transformation of various carbon compounds [19, 38, 43, 72, 76]. The lipopeptide molecule is composed of a hydrophilic peptide part covalently linked to the hydrophobic residue, which consists of a fatty acid chain – which ultimately imparts an amphiphilic character to the molecule. The peptide residue may be linear or cyclic, with cyclisation significantly enhancing protection against proteolysis. [4, 43]. The peptide conditions a specific spectrum of antimicrobial activity which is dependent on the sequence of this molecule, as well as its charge; negative or positive [38, 46, 56]. Examples of lipopeptides with net negative charge are daptomycin or surfactin, while examples of a positive one are – polymyxin B and its derivatives, such as colistin or octapeptin [38, 43, 76].

Hydrophobic compounds attached to peptides, such as fatty amines, fatty acids or glycerol esters, also affect the varying degree of antimicrobial activity of lipopeptides. It has been proven that AMPs to which hydrophobic moieties have been attached may exhibit increased antimicrobial activity. An important factor affecting this activity is the length of the alkyl chain [25, 46, 51, 52, 56]. Attempts to remove a fatty acid residue from polymyxin B have shown almost complete loss of antibacterial activity. Detailed studies on the interaction of lipopeptides with microbial membranes have shown that it is the alkyl chain that enhances their affinity for cell membranes, and more specifically the incorporation of membrane lipids, which in turn

disrupts the hydrophobic core of the lipid bilayer [38, 56]. This is because the attachment of the alkyl chain clearly changes the hydrophobicity of the whole compound, and thus, in addition to the affinity mentioned, also affects the tendency to oligomerize and the way the compound is organised in solutions [56, 76].

The main goal of the action of lipopeptide antibiotics is to disintegrate microbial cell membrane, leading to creation of its defects and as a result to loss of membrane potential, reduction of ATP synthesis (ATP – adenosine triphosphate) and cell death. They can also interfere with other cellular processes such as DNA replication, transcription or translation. The selective action of these compounds on bacteria results from differences in membrane structure of prokaryotic cells and human cells. The mammalian cellular membranes are electrostatically neutral outside, made of cholesterol, phosphatidylcholine or sphingomyelin. In contrast, the outer membranes of bacterial cells usually consist of negatively charged phospholipids, such as cardiolipin or phosphatidylglycerol [20, 38, 48, 56, 72, 76, 77]. At the same time, lipopeptides with a high degree of hydrophobicity do not show selectivity of action; they effectively affect almost all types of cells, including bacteria or fungi, which is the reason why these compounds also cause haemolysis of human erythrocytes and cytotoxicity effects on mammalian cells [55, 56]. The lack of one specific structure (e.g. a receptor) as the basis of the mechanism of action significantly hinders the pathogen in acquiring resistance to lipopeptides. Research indicates that resistance to these antibiotics is achieved when microorganisms modify the basic properties of their cell membrane, which is possible after several hundred generations of microorganisms [38, 56, 76]. However, despite all of their advantages, no lipopeptide antibiotic achieves such a broad spectrum of activity as AMPs, and bacterial resistance, although slower, is also increasing for this type of antibiotics [43].

5. Synthetic lipopeptides

The relatively low complexity of lipopeptides, their mechanism of action with good antimicrobial efficacy and the impeded acquisition of resistance to these compounds by microorganisms and the broad spectrum of AMPs activity along with their equally effective methods of action on microorganisms have generated a lot of interest in the possibility of synthesising lipopeptides. Scientific reports have repeatedly provided evidence that cationic peptides of natural origin can be simplified to include only positively charged molecules with attached hydrophobic residues [38]. Initially, semi-synthetic analogues of existing antibiotics were synthesised and tested – linear derivatives of dapto-

mycin, polymyxin B or amphotomycin and cyclic compounds such as lactoferricin, bacteriocins or derivatives of human defensin [38, 43]. Although newer analogues are still successfully obtained, still the most efficiency and spectrum of activity is demonstrated by the natural compounds that these derivatives are derived from [18, 38]. In addition, the compounds produced are characterised by low stability and the possibility of degradation by peptidases along with their high production costs, disproportionate to the pharmacokinetic parameters achieved [14, 43, 77]. Therefore, the possibility of improving properties was taken into account and for this purpose completely synthetic lipopeptides were produced [43].

The general rule of the most optimal structure of the lipopeptide in the form of a short peptide chain (6–7 amino acids of linear or cyclic structure) and the N-terminal substituent of the amide (fatty acid) is the basis for the development of effective antimicrobial agents whose activity spectrum can be modulated just by modification of the N-terminal substituent [46, 56, 76]. It has been proved that the attachment of a moiety containing an alkyl chain to AMPs affects the oligomerization and organisation of the compound in solutions, as well as affinity for the cell membrane due to the change in hydrophobicity and, as a result, analogues of this type can have better antibacterial and antifungal activity [3, 51, 52, 55]. The main aims of the synthesis are to improve stability against AMPs by slowing the rate of degradation, to obtain the possibility of using much lower concentrations of lipopeptides and thereby to this eliminate the problem of cytotoxicity of AMPs and causing haemolysis by those compounds. It is also important to broaden the spectrum of antimicrobial activity against lipopeptide antibiotics and to reduce production costs related to the simplification of the synthesis process [4, 26, 38, 72]. It is known that the synthesis of, for example, short linear lipopeptides generates significantly lower costs of their production [56].

The overall mechanism of antimicrobial activity of synthetic lipopeptides is related to the amphiphilic phenomenon: the lipopeptide is incorporated into the lipid bilayer of the attacked microbial membrane, introducing defects in the packing of its chain and inducing membrane curvature as a consequence causing leakage of cellular components. Then the intracellular potential becomes dispersed and ultimately it leads to the death of cell [38]. Nevertheless, detailed processes taking place during this phenomenon have never been fully explained.

There are also promising results of tests in which attempts were made to combine lipopeptides with conventional antibiotics in therapies. In particular, measurable effects have been observed in the case of those antibiotics in which the difficulties associated

with reaching the molecular target inside the bacterial cell and the emergence of resistance against this background are noticed. The use of lipopeptides to interact with the membrane and increase its permeability is potentially associated with allowing the antibiotic to penetrate and allowing it to achieve the desired clinical effect and kill the microorganisms. Obtaining such an effect also takes place at the significantly lower minimal inhibitory concentration (MIC) for the antibiotic (even by several orders of magnitude!) due to the addition of the lipopeptide to concentrations being already below the MIC value [38].

The safety problems in the potential application of lipopeptides in clinical practice are still a concern that needs to be resolved, due to the observed cytotoxic effects on eukaryotic cells and haemolysis of erythrocytes at MIC concentrations necessary to, for example, eradicate biofilm [46]. It is worth noting, however, that in the case of a large portion of synthetic lipopeptides, toxicity is relatively low. Therefore, for these compounds it gives a considerable advantage. Nevertheless, more accurate analysis is needed before lipopeptides can be used in clinical tests [25].

According to current knowledge, taking into account the structure of synthetic lipopeptides, they can be divided into four groups:

1. ultrashort lipopeptides
2. peptidomimetics,
3. multivalent lipopeptides,
4. hydrocarbon-stapled lipopeptides [43].

It should be noted, however, that new lipopeptides are being constantly designed and synthesised, and most of them are analyzed by laboratories that developed them *de novo* hence, in many research works either completely new compounds or modification of already known structures are the focus of interest.

5.1. Ultrashort lipopeptides

The peptides in this group are the shortest AMPs compounds, i.e. they have the lowest number of amino acid residues. They consist of 2 to 4 amino acids connected to a fatty acid (generally 12 to 16 carbon atoms in the chain) with net positive charge (from +1 to +4). Surprisingly, replacing only one amino acid of two or four results in completely different biological properties [19, 43, 53, 54, 56]. The ultrashort lipopeptides have amphiphilic properties similar to detergents (hydrophilic side of the peptide and hydrophobic lipid), which in turn gives them the opportunity to self-associate and oligomerize to form a hydrophobic core. Essentially, in ultrashort lipopeptides, this possibility is largely limited due to close proximity of the positive peptide charge – the fatty acid chain must be long enough (at least 14 carbon atoms) for this phe-

nomenon to occur [3, 74]. Ultimately, oligomerization may be a way to provide protection against the activity of peptidases, and thus improve stability and resistance to degradation, which may come into play under *in vivo* conditions [56, 68, 70].

The length of the fatty acid chain determines the antimicrobial activity – there are hypotheses regarding its optimal length, saying that for the activity against Gram-positive bacteria, are needed 2 methylene residues more than for activity against Gram-negative bacteria. The same hypothesis states that, in turn, lengthening the chain by more than 10–12 carbon units may cause a decrease in antibacterial activity (but depending on the peptide part), most likely due to hydrophobic mismatch and insufficient defects in the attacked lipid bilayer [38]. Moreover, it has been repeatedly confirmed that the antimicrobial spectrum depends primarily on the composition of the lipopeptide, and hence its affinity to the target membrane, whose most important factor is the hydrophobicity of the molecule [1, 19, 25, 52, 55, 74]. The fatty acid is therefore the most important element in the structure of these compounds. Even a short synthetic peptide Pal-KK-NH₂ consisting of two lysine amino acid residues (K – lysine), having a palmitic acid residue with N-terminal chain of sixteen carbon atoms (Pal/C₁₆ – the palmitic acid residue) is bactericidal and fungicidal [8]. A series of ultrashort synthetic lipopeptides has been successfully produced by combining the fatty acid with inactive short peptides, thus obtaining antimicrobial activity [1, 2, 26, 43]. Importantly, none of the tested lipopeptides of this type caused haemolysis of human erythrocytes [1, 43].

The most common compound among ultrashort lipopeptides is designated as Pal-KGGK-NH₂. In the example shown, “Pal” is the rest of palmitic acid, while “KGGK” corresponds to a specific amino acid sequence (Lys-Gly-Gly-Lys, whereby the second lysine residue is D-enantiomer of the first one; G-glycine). The main purpose of this lipopeptide, like all lipopeptides and AMPs, is to interact with the intrinsic bacterial cell membrane and induce the lysis of this membrane. However, in order for the lipopeptide to act on the internal membrane, an earlier electrostatic interaction between the positively charged side chains of amino acids (primarily lysine) with components of the microorganism cell wall having the net negative charge is necessary. In the case of Gram-positive bacteria, the interaction occurs mainly with lipoteichoic acid, while in Gram-negative with LPS (LPS – lipopolysaccharide) located on the outer membrane. Building of the lipopeptide into a phospholipid bilayer and perforation of the outer membrane, allowing access to the inner membrane of the pathogen, ensues. The activity of this compound leads to a change in the local organization of the lipid membrane and drastic reorganization of the structure

of the entire inner cell membrane, which affects its dynamics and all processes dependent on it [37, 43, 53, 56, 76]. Electrostatic interaction between the peptide part of Pal-KGGK-NH₂ and phospholipids and other components of the outer bacterial membrane is most likely a determinant of the selectivity of this compound against microbial cells – mammalian cell membranes, having a net neutral charge, were not the target of this lipopeptide (*in vitro* studies). At the same time, it is suggested that for the affinity of this compound with the bacterial cells the palmitic acid residue, enabling the oligomerization of the compound and the formation of micelles, interacting with the cellular membrane of microorganisms is responsible [26, 49]. Nevertheless, it was found that the activity of the lipopeptide with the target bacterial membrane can occur in two ways: through the hydrophobic interaction of the fatty acid residue and through the electrostatic interaction of the amino acid residue [26, 43, 49].

Another example is Mir-KYR-NH₂ (Mir/C₁₄ – myristic acid residue with 14 carbon atoms length). KYR is a sequence of three amino acids (Y – tyrosine, R – arginine; Lys-Tyr-Arg sequence) obtained through the hydrolysis of bovine haemoglobin molecule by pepsin. Earlier reports have repeatedly proved that many peptides with different properties, including about 30 with antimicrobial activity, can be obtained by digesting bovine haemoglobin. KYR is naturally located at position 139–141 of the α chain; however, the same molecule, yet synthesized in the laboratory, was used for the study [12, 65]. To improve the antimicrobial properties, the N-terminus was acylated with a fatty acid of various carbon chain lengths (with ten, twelve, fourteen or sixteen carbon atoms), whereby the compound containing the myristic acid residue appears to be the most effective in antimicrobial activity. The mechanism of action of lipopeptides containing the rest of this fatty acid or lauric acid probably consists in combining first with the outer membrane of bacteria, its permeabilization and penetration, later connection with the inner membrane, also permeabilized and additionally depolarized, which results in rapid cell death [64]. These and other structurally similar compounds, most likely also functioning in the described manner, such as Pal-KK-NH₂, Pal-KGK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂ have a very wide spectrum of activity both in relation to Gram-positive and Gram-negative bacteria [43, 75].

Other examples of synthesized short lipopeptides consist of 1 to 5 molecules of ornithine amino acid (Orn – ornithine), formed from arginine under the influence of arginase, which are covalently linked to a fatty acid (with a carbon chain length of 8 to 18 carbon atoms), exhibiting antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. Among the tested ones the synthetic lipopeptide with

the sequence Mir-Orn-Orn-Orn-NH₂, (designated by researchers as LP16) seems to be the most effective in antimicrobial activity. As a non-toxic compound (it did not induce hRBC haemolysis in the tests *in vitro*), easy to synthesize, stable and resistant to trypsin, it is another example confirming that lipopeptides, including ultrashort ones, have great potential to become new and effective antimicrobial compounds [50].

Also synthesized were lipopeptides consisting of one lysine residue in which a single longer chain of fatty acid residue (e.g. 16-carbon palmitic acid) was replaced with two shorter chain length (with eight carbon atoms) residues: C₈-K-C₈. The aim was to improve selectivity without affecting the amphipathic properties which are crucial for antibacterial activity. The activity of the resulting compound was comparable to the activity of a lipopeptide containing a single, double length fatty acid chain, but the new analogue was significantly less haemolytic to human erythrocytes. In addition, another lipopeptide, of asymmetrical construction, synthesized in similar manner, C₈-K-C₁₀, turned out to be completely non-toxic *in vitro* for human epithelial kidney cells (HEK) at concentrations twice as high as the MIC value – however, the minimum concentration necessary to inhibit bacterial growth, both Gram-positive and Gram-negative, was significantly lower than for ultrashort lipopeptides containing a single fatty acid residue [21]. Lack of cytotoxic effects on mammalian cells is surprising primarily because the investigated mechanism of action does not seem to be different and is based on permeabilization and depolarization of the membrane, which in turn leads to the conclusion that it has probably been possible to significantly improve the selectivity of action and affinity for prokaryotic cells. Nevertheless, the authors emphasize that further research on this and similar compounds is required from that perspective [21, 43].

There are many more methods and ideas for modifying ultrashort lipopeptides and in almost every study a different approach can be seen, of which each seems to be beneficial, aimed at seeking new ways to obtain the desired properties of synthesized compounds. The individual methods of obtaining short lipopeptides of different structure thus influence both the spectrum of action and the occurrence of a potential cytotoxic and haemolytic effect in relation to human cells [43].

Different strategies for the use of these lipopeptides are also tested, for example, coupling with other molecules to improve antibacterial properties. Trials are carried out on coupling with cationic polyanionic compounds, spermidine, putrescine, etc., which perform many different roles in the modification of nucleic acids or proteins.

In separate studies, lipopeptides with potential anti-biofilm activity, comparable to those of vancomycin or

daptomycin, such as Mir-KK-NH₂ or Mir-RRR-NH₂ have been addressed (of which the latter also exhibits synergy of action with vancomycin) [43, 60]. Subsequent compounds tested for anti-biofilm activity include Pal-KGGK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KAAK-NH₂ and Pal-KLLK-NH₂ (L – leucine) – especially the last two with promising eradicating activity were also tried when coupled with biodegradable polymers (PLACO – Poly (lactic acid-castrol oil)) and P (SARA) – Ricinoleic acid based poly (ester-anhydride)) to obtain antibacterial therapeutic agents with prolonged action, applied topically in oral infections – with promising results, undoubtedly requiring confirmation in further studies [19].

5.2. Peptidomimetics

The term ‘peptidomimetic’ is a broad concept and encompasses any arbitrary sequence designed to mimic the structure and/or function of natural AMPs, but its backbone is not based solely on α -amino acids; thus, peptidomimetics can be both semi-synthetic analogues and fully synthetic molecules. Its synthesis as antimicrobial agents, first of all, assumes solution of the problem of proteolytic degradation, which concerns almost all lipopeptides and AMPs [20, 22, 35, 43, 77]. Possibilities and methods of synthesis differ significantly depending on the idea for obtaining specific properties of a peptidomimetic. Although compounds belonging to this group, obtained with different methods, show similar antibacterial or antifungal activity, they are characterized by a completely different structure, which determines achievement of different properties; both beneficial and undesirable. New compounds with a unique structure are constantly being developed, hence such a large diversity within peptidomimetics. In this group of lipopeptides, we can distinguish oligoacyllysines, lipo- α - and - γ -AA-peptides, peptoids, polyamides or arylamides, which have already been the subject of a large number of scientific reports [22, 27, 28, 43, 66]. It is impossible to discuss all these mentioned in this work, therefore only the first two groups of compounds will be presented.

Oligoacyllysines, or oligomers of acylated lysine (OAKs), are linear molecules composed of alternating chains of fatty acids and cationic amino acids. Such arrangement prevents formation of secondary structure. Due to the basic structure, OAKs can be divided into two categories, depending on the type of the so-called block occurring in the structure: α or β . The α block consists of the amino-X-lysine sequence, and the β block: lysine-amino-X-lysine, where the fatty acid residue has an appropriate number of carbon atoms at the X-site. An example of OAKs from the α group is C₁₂K-7 α ₈. This notation means that to the rest of lauric acid (C₁₂) and lysine amino acid (K) is attached to

the α block in seven replications (7 α ₈, where 7 is the number of blocks α , 8 – number of carbon atoms in the acyl chain attached to lysine). [23, 71]. Since the analogues obtained in this way are not small molecules, many researchers also synthesize much shorter derivatives, not devoid of antimicrobial activity, such as the representative of the group β : C₁₂(ω ₇)K- β ₁₂. This compound contains only 3 lysine residues and 2 fatty acid residues (C₁₂(ω ₇) symbolizes the rest of dodecanoic acid with a double bond at the seventh carbon) [22, 23, 73]. Of course, there are a lot of synthesized compounds qualified for these categories and each of them is subject to multiple and in-depth analysis in terms of mechanisms of action, antibacterial properties, pharmacokinetics or potential toxicity, and the differences between individual analogues are often small. The above-mentioned compound C₁₂(ω ₇)-K- β ₁₂ in subinhibitory concentrations, quickly causes a depolarization effect in the attacked membrane, depriving bacteria of primarily the proton-motive force activity necessary for active pumping of substances from cytoplasm (*efflux pump*). It is one of the many known mechanisms of resistance in microorganisms basing on active removal of various compounds and antibiotics from the cell, and thus preventing their action. Since the effect of these compounds is depolarization of the cell membrane potential, they can appear to be extremely effective means with which to achieve selective control of microbial cell proliferation, and, at the same time, disrupt many processes based on the proton-motive force. First of all, it is a key source of energy necessary for the functioning of the membrane pump, hence the emergence of resistance using the mechanism of active pumping can be almost completely eliminated. The greatest advantage of OAKs may be the possibility to sensitise the prokaryotic cells (especially Gram-negative bacteria), e.g. to erythromycin or rifampicin [23, 31, 32, 43]. Although the detailed mechanism of depolarization caused by the impact of OAKs is not yet well understood, it is thought that these peptidomimetics can effectively increase the access of antibiotics to the cytoplasm, thus helping their proper functioning and, as a result, leading to the inhibition of the bacterial growth [22, 23, 31, 43]. Importantly, the studies of the pharmacokinetics of these compounds have shown that to achieve the desired effects of depolarization and the OAKs concentrations required for this purpose *in vivo* (mouse model) subcutaneous injections may be quite sufficient [23]. Currently, the use of oligoacyllysines is considered a very positive and promising approach to expanding the rapidly shrinking possibilities of fighting Gram-negative bacteria with antibiotics [23, 31, 43, 71].

It is important to mention a similar synergistic strategy of action of other substances with the peptidomimetic – but in much lower concentrations than the MIC

for the lipopeptide alone. Several more detailed studies of peptidomimetics have shown that it is possible that compounds in concentrations below the value of MIC sensitise the bacterial cells not only to the antibiotics, as described above, but also to the innate defence mechanisms, including AMPs found naturally in human plasma like lysozyme or defensin. It is now considered that the mechanisms of action of natural AMPs, present in the body (and not administered externally) are highly underestimated and many researchers point to the necessity of scrutinising them and developing methods and compounds that could enhance or enable their action – most likely peptidomimetics [14, 32].

The second group of peptidomimetics, discussed here and equally unique, are lipidated AA-peptides. The design, like in other lipopeptides, assumes the combination of a hydrophobic fatty acid residue with a positively charged hydrophilic peptide part to obtain a molecule with amphipathic properties. The difference is in the use of AA-peptides as a peptide moiety. Structurally AA-peptides are oligomers composed of the so-called building blocks. Each block is based on a chiral peptide nucleic acid (PNA) backbone (PNA is a polynucleotide analogue of DNA and RNA), which containing N-acetyl-N-aminoethyl-amino acid residues. There is a lateral functional group (or several groups) identical to that in the peptide which a given AA-peptide mimics in its structure and function, which is attached to the chain. These peptides can be divided into categories: α and γ depending on the position of the side chain; also cyclic-AA-peptides are synthesised and tested. The AA-peptides are a known group of compounds characterised mainly by resistance to proteolytic degradation, hence the interest in these molecules as possible therapeutics, also ones that could have antimicrobial effect [27, 28, 42, 66]. Adding the fatty acid residue also in the case these molecules results in improved antibacterial activity [66]. Mimicking the structure, function and mechanism of action of AMPs, as well as the molecular stability, proteolytic resistance and the unlimited possibility of introducing modifications make AA-peptides a highly attractive matrix for the synthesis of advanced antibacterial compounds. Additionally, their biological activity can be easily changed and strengthened by attaching a series of additional hydrophobic and cationic groups [28, 42, 43, 69, 72].

For example, studies on lipo- α -AA-peptides showed that the short dimers of these lipopeptides show antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. Adding another block to the dimer and creating a trimer triggers activity against Gram-negative bacteria, and adding one more to form a tetramer molecule – broadening the spectrum of action against these bacteria and higher activity [27, 43, 72]. It has also been proven that a certain level of hydrophobicity must first be

achieved to allow antimicrobial activity; hydrophobicity increases both the presence of fatty acid residues and the attachment of further molecules to oligomers. As in all lipopeptides, acylation and the increase of hydrophobicity significantly raises the antibacterial activity and the spectrum of action of compounds, in this case relating to Gram-negative bacteria (for the Gram-positive spectrum is not extended) [27, 43, 72].

Both categories of the discussed lipo-AA-peptides (α and γ) show a similar mechanism of action, with the cell membrane as a target, and there is also no significant difference in the spectrum of action between them. An exception is the anionic lipo- γ -AA-peptide analogues; while the cationic ones show a broad and comparable spectrum against Gram-negative bacteria, anionic compounds proved to be entirely devoid of the antibacterial activity. It is probably the result of the lack of electrostatic interactions of these compounds with a negatively charged bacterial cell membrane. The γ -AA-peptide group, after conjugation with the unsaturated fatty acid chain, also has a possibly lower aggregation tendency and reduced haemolytic activity relative to human erythrocytes, as well as the higher antimicrobial activity than the α -AA-peptide group, despite a similar spectrum of antibacterial activity. Most likely the γ analogues have action based on carpet or carpet-like mechanisms. They permeabilize the membrane selectively and structurally modify it, leading to the previously described loss of membrane potential, leakage of intracellular substances and cell death. It was observed that mammalian cell membranes with the neutral charge, containing cholesterol, are practically not at all attacked by these lipopeptides, which is probably the cause of relatively high selectivity and low toxicity [42, 43, 72]. In this group of peptidomimetics, apart from lipo- γ -AA-peptides, there are also many compounds modified in another way, for example, sulfonated (sulfone- γ -AA-peptides). They mimic the action of magainins very well, having a wider spectrum of activity and higher resistance to proteolytic degradation [20, 72].

The disadvantage of the discussed compounds is the complicated production process – lipo-AA-peptides are long molecules that require multistage synthesis, which is also associated with rather high costs [37, 45]. For this reason, other things studied were the short peptidomimetics, obtained by hydrolysis of finished lipo-AA-peptides of the category α and γ , containing the most frequently 1 block of lipo- γ -AA-peptide and the rest of lysine – were found to be active e.g. against MRSA strains (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), MRSE (Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli* (MIC from 2 to 5 $\mu\text{g/ml}$) [43].

Cyclic lipo-AA-peptides in turn have been designed to further enhance antimicrobial properties. They are

supposed to demonstrate a higher activity against microorganisms than linear analogues due to the more fixed and therefore more stable amphipathic structure. The results of the preliminary research confirmed this hypothesis – cyclic compounds proved to be effective against a number of strains of multi-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria [43, 72]. They are also applied experimentally to the biofilm, including *S. epidermidis* or *P. aeruginosa*, with promising results [69]. They imitate AMPs also in terms of the modulation properties of the immune system [43, 69, 72]. Unfortunately, at the same time they are much more haemolytic [43].

AA-peptides of a helical structure as well as various ways of combining these compounds with each other are also studied. Their preliminary research results are also promising [72].

To sum up, lipo-AA-peptides with a broad spectrum of antibacterial activity, an increased stability of the molecule and unlimited potential to modify the structure and function are also candidates for potential therapeutic measures against multiresistant pathogens [43, 69, 77].

Thanks to the relatively easy synthesis of most peptidomimetics and the easiness of modifying their structure, together with resistance to the activity of proteases, they are attractive antimicrobial compounds targeted at the bacterial membrane [20, 43, 77].

5.3. Multivalent lipopeptides

The group of multivalent lipopeptides is surely the most diverse one of these mentioned in this division. A common feature of this group is the process of oligomerization or conjugation of subsequent newly formed peptides and lipopeptides with each other in order to improve the properties and achieve better antimicrobial activity, which go hand in hand with minimized cytotoxicity and haemolytic activity against human red blood cells [7, 43].

Defensins, having primarily the ability to cause rapid death of bacterial cells, as well as a wide spectrum of activity and a low percentage of resistant strains generated (*in vitro*), are often the starting structure for the synthesis of new compounds. During the synthesis of multivalent lipopeptides, researchers decided to use analogues of the C-terminal fragment of human defensin 3, consisting of 10 amino acid residues as an active sequence or scaffold for further multivalent modifications with the use of lysine residues [6, 7, 43, 48]. For example, the resulting compound B2088 (a dimer) is also characterized by the ability to kill quickly, shows promising selectivity against bacterial membranes, and the build-up of resistance against it is negligible. To enhance the antibacterial activity, the N-terminal conjugation with two fatty acid residues was certainly

used, thanks to which the desired interaction with the bacterial LPS was achieved. Dimers were coupled with fatty acid residues of different carbon chain length (8 to 16 atoms), obtaining satisfactory effects against Gram-negative bacteria in the case of compounds containing caprylic acid residues (8 carbon atoms long – Kapr or C₈) and capric (10 carbon atoms long – C₁₀). At the same time, the influence of oligomerization was compared and significantly weaker activity of N-lipidated monomers was demonstrated. Haemolysis was not observed for any synthesized compound [7, 43, 45], and cytotoxicity was neither [7]. Researchers came to a conclusion that attaching fatty acid residues also to this type of molecules significantly improves the antibacterial activity, although the use of fatty acids with more than fourteen carbon atoms in the chain results in the reduction of this activity. An increased tendency for auto-aggregation was also observed along with further extension of the fatty acid chain and, as a result, a lower antimicrobial activity. Ultimately, the best compound obtained in this way turned out to be C₈-B2088; high antibacterial activity, the highest selectivity, the ability to kill bacteria quickly and excellent biocompatibility were obtained. The lipopeptide also demonstrated activity synergy with conventional antibiotics [7, 43, 45, 48].

As part of the research on the possibility of action against bacterial lipopolysaccharide, compounds named multivalent β -Boomerangs have been synthesized. They are peptides that accept precisely the boomerang-like conformation of the β -sheet in the complex with LPS [10, 43, 62]. N-termini of these peptides were acylated with butane and octanoic acid, and part of the chain was replaced with a cysteine residue and multivalent β -Boomerangs connected by a disulphide bridge were generated. Next, the interest was focused on the influence of the fatty acid chain length; the study showed similar activity of all analogues against Gram-negative bacteria, however only compounds with a fatty acid residue composed of eight carbon atoms show activity against Gram-positive bacteria. It has been observed that the presence of aromatic amino acids in the structure is also significant – when converting amino acids into non-aromatic ones, antibacterial properties have been completely lost. It turned out that in LPS neutralization it is crucial to strictly adapt it to the structure of β -Boomerang, which is possible due to the replacement of aliphatic amino acids with the aromatic ones in the discussed compounds [10, 63]. Once again, the extremely beneficial influence of acylation on the improvement of antimicrobial activity has been confirmed [10, 43, 63].

Other studies also used the formation of a disulphide bond between dimers – but between homo- and hetero-dimers of a peptide N-terminal analogues of lactoferricin and various short lipopeptides containing

ornithine and a fatty acid residue of twelve carbon atoms. The obtained compounds showed high activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria as well as against fungi (though not against e.g. *Candida albicans*). The greater part of the homodimers did not have better properties than the corresponding monomers – in contrast to heterodimers, which turned out to be much more attractive compounds. Heterodimers of the N-terminal derivative of lactoferricin with a short lipopeptide containing ornithine showed a significantly higher antimicrobial activity than other dimers and monomers, while showing the lowest haemolytic activity against human erythrocytes [40, 43].

Researchers also deal with synthesizing dendrimers. They can be divided into two categories, depending on the number of amphiphilic branches: A and B. Group A contains many more of them, while category B consists of more lipophilic linear structures. Both compounds classified as A and B are lipidized using mainly fatty acid residues of eight or twelve carbon atoms. In the case of molecules containing a lauric acid residue these actions led to an improvement of antibacterial properties and increase of selectivity against different *Candida* strains; the length of the fatty acid residue chain did not affect the activity against Gram-positive or Gram-negative bacteria (in all synthetics this activity was identical). Detailed analysis of these compounds' activity demonstrates that fungal death is triggered by the outflow of potassium ions from the inside of their cells. But at the same time their inhibitory effect on β -(1,3)-glucanase *Candida* synthase was also observed. The effect depends on concentration of dendrimer at the target position [34, 43].

5.4. Hydrocarbon-stapled lipopeptides

Hydrocarbon-Stapled Lipopeptides (HSLPs) form a relatively new and promising group of compounds. A unique structure is based on “stapling” with hydrocarbon including the double replacement reaction and ring-closing (Ring-Closing Metathesis – RCM) and formation of a cyclic compound. It occurs between two α -substituents of non-natural amino acids, which have unbranched side chains with olefinic groups at specific positions [37, 43]. These positions are important since they determine the likelihood of a catalytic cyclization, which is coupling of hydrocarbon [37]. Simply put, a covalent bond is formed between the side chains of the lipopeptides [37, 57]. Such modification significantly stabilises and stiffens the peptide structure, its conformation, and potentially enhances resistance to proteolytic degradation and the peptide's antimicrobial activity. This may also exert a positive effect on the interaction with the target membrane and possibly prolong the biological half-life of the lipopeptide [37,

43, 57]. For the sake of this reaction, various lipopeptides of known structure are used, creating new cyclic lipopeptides [43]. The effect of newly formed analogues stiffened with a hydrocarbon buckle was compared to lipopeptides activity, which serve as the initial structure used for their synthesis. This comparison demonstrated that all of the above mentioned compounds show a similar spectrum of activity against Gram-positive bacteria, interacting with the outer membrane, and then permeabilizing the inner membrane of the pathogen. However, none was active on Gram-negative pathogens [37].

Interestingly, stiffening with a hydrocarbon staple is not a new technique; it has been used for a long time especially for therapeutics development, which are used e.g. in oncology, dietetics, cardiology or HIV therapy, mainly thanks to the benefits such as stability improvement, resistance to proteolytic degradation, and increased biological activity of the compounds formed this way. Chemically, stapling may occur not only via hydrocarbon stapling but also via triazole, azobenzene, thiol, lactam, or thioether “stapling” – each of them generates completely different properties, molecular stability, and bioactivity. The interest in this technique grew when it was observed that staple-stiffened molecules affect the protein-protein interactions in target cells, e.g. tumour cells, which as a result inhibits various proteins. Interfering with, for example, the activity of the Bcl-2 family of proteins, β -catenin, hormones (including oestrogen), and various transcription factors [29, 57] through the use of the compounds discussed is described.

As of today, this trend does not seem to be less attractive than other strategies employed in search of new, effective, and safe means to fight microorganisms.

5.5. Antimicrobial lipopeptides in laboratory researches

Many research centres and research teams, both Polish and global, showed great interest in lipopeptides, confirming through the results of their studies, both *in vivo* as well as *in vitro*, the high antimicrobial potential of this group of compounds.

Dawgul et al. analysed the antimicrobial activity of lipopeptides in relation to *Staphylococcus aureus* clinical strains. As Dawgul writes, the possibility of using short lipopeptides in treatment of skin infections caused by *S. aureus* would be a great therapeutic opportunity. Lipopeptides are also characterized by good surface active properties, which additionally makes it possible to use them as emulsifiers or preservatives in a medicinal preparation.

The research material were clinical strains *S. aureus* from patients with folliculitis, furunculosis and atopic dermatitis, 5 synthetic lipopeptides (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂, Pal-KG-NH₂ and Pal-

KGK-NH₂), and conventional antibiotics (chloramphenicol, erythromycin, penicillin G and vancomycin). The tests results showed the analysed compounds' effectiveness in the case of the microorganisms used in the study, at the same time not demonstrating diversity in their activity between the strains. What is important is the activity of lipopeptides in the case of the strains resistant to erythromycin, penicillin, and chloramphenicol that the authors demonstrated. High activity was observed for lipopeptide Pal-KK-NH₂ [16]. It is worth adding that the examined lipopeptides were characterized by bactericidal properties in concentrations equal to or twice as high as their MIC in relation to the analysed strains [16].

Dawgul et al. also evaluated the influence of antimicrobial peptides, including lipopeptides Pal-KK-NH₂ and Pal-RR-NH₂, on the adhesion process, biofilm formation and its eradication. A reference strain was selected for the analysis *C. albicans* (ATCC 10231), and a silicone Foley catheter served as a biomaterial. Applied lipopeptides demonstrated an ability to eradicate biofilm. They were already active in concentrations lower than their MIC value. For comparison, it is worth noting that nystatin was only active in concentration equivalent to four times its MIC value. Analysing the impact of peptides on prevention of biofilm formation process and eradication of its mature structures, both peptides were effective at concentrations below the MIC value. In the case of the Pal-RR-NH₂ these concentrations were many times lower than the MIC value [17].

Kamysz et al. also evaluated antifungal activity of Pal-KK-NH₂ lipopeptide in relation to yeast-like fungi. For the analysis were selected both the clinical strains (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*) as well as the reference strains, and to evaluate the efficacy of the lipopeptide – traditional antifungal drugs (fluconazole, amphotericin B, capsosungin). The authors provided evidence for a synergistic interaction between the lipopeptide and traditional antifungal drugs, especially capsosungin. As the authors of the study point out, in the future the demonstrated synergy may turn out to be a good therapeutic opportunity for the treatment of invasive fungal infections [39].

Barchiesi et al. also analysed the activity of the aforementioned peptide Pal-KK-NH₂ against isolates *Cryptococcus neoformans*. 14 strains derived from cerebrospinal fluid and blood were analysed. All strains tested demonstrated susceptibility to amphotericin B and fluconazole. The research group demonstrated a synergistic interaction of lipopeptide with amphotericin B in 3 analysed strains and much more rapid fungicidal effect in relation to one strain than amphotericin B. The Pal-KK-NH₂ lipopeptide's fungicide activity was observed, after 24 hours of incubation. The obtained results allow to conclude that Pal-KK-NH₂ may in the

future be a good alternative in the treatment of infections caused by *C. neoformans* [9].

The antibacterial and antifungal properties of short synthetic lipopeptides were also analysed by Greber et al. Antimicrobial activity of selected compounds that differ from each other in the length of the fatty acid chain, they were evaluated in relation to the reference strains, Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. The results obtained by the authors of the work indicate a high antibacterial activity, both bacteriostatic and bactericidal, lipopeptide containing the residue of the palmitic acid in its structure. This activity was definitely higher in relation to Gram-positive bacteria. A strong bacteriostatic effect was demonstrated for analogues with more than one amino acid composition of alkaline (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂, Pal-KGK-NH₂ and Pal-KGKG-NH₂), in contrast to lipopeptides with one amino acid (Pal-K-NH₂ and Pal-KG-NH₂). Myristic modified lipopeptides were characterised by high bacteriostatic activity against *Bacillus subtilis* and *S. epidermidis*, while modified with lauric acid – low activity against the strains analysed at work. Diversified activity was noted for lipopeptides with two and three lysine residues (Laur-KK-NH₂, Laur-KKK-NH₂; C₁₂ / Laur – a lauric acid residue with a length of 12 carbon atoms). Caprylic acid-modified lipopeptides showed low antibacterial activity or a complete lack of it. Antifungal activity has been demonstrated for Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂ and Pal-KKKK-NH₂. Of the palmitic acid analogues, the lowest antifungal activity has been demonstrated for lipopeptides with one lysine residue – Pal-K-NH₂. Different antifungal activity has been demonstrated by myristic acid lipopeptides. It has been shown that they are active at the same concentrations *C. albicans*, *C. tropicalis* and *Aspergillus brasiliensis*. Caprine-acid-modified lipopeptides showed no activity against fungi *Candida* and *A. brasiliensis* [24].

The authors of the study, in addition to the antimicrobial assessment of lipopeptides, also examined their haemolytic properties. Lipopeptides, modified with palmitic acid, caused severe haemolysis of erythrocytes. High toxicity was demonstrated for palmitic derivatives with the rest of lysine (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂ and Pal-KKKK-NH₂) [24].

Also, the activity of synthetic lipopeptides against bacterial biofilms has been studied. Microorganisms that form the biofilm structure are characterised by much greater resistance to antimicrobial compounds than their planktonic counterparts. Therefore, new formulations are constantly being sought, which would show activity in relation to such a structure. This would allow, on the one hand, the eradication of the biofilm, and thus a faster and more effective therapy of infections with the formation of its structures. On the other hand, it would be possible to prevent the

formation of this antimicrobial structure resistant to antimicrobial preparations.

Min et al. analysed the activity and stability of cyclic synthetic lipopeptide CLP-4 (CLP-4 – cyclic lipopeptide 4; fusaricidin analogue) with respect to *Streptococcus mutans* – both planktonic cells and the biofilm structure. In addition, the authors assessed the effect of the lipopeptide subjected to analysis on human cells. Researchers showed that the lipopeptide was bactericidal against *S. mutans* and showed a concentration-dependent rate of killing, leading to cell lysis only at higher concentrations. The lipopeptide was characterised by high activity against biofilm. The authors suggest that the CLP-4 peptide may have a different mechanism of action, depending in some way on its concentration. At low concentrations, the peptide probably interferes with some of the cellular processes necessary for the growth of the microorganism, while at high concentrations it kills the bacterial cells by damaging their cell membrane. What is also important, CLP-4 was also active against mature biofilms. When testing the effect of the lipopeptide on mature biofilm, a concentration-dependent decrease in viability was demonstrated *S. mutans*. The authors emphasise that the analysed peptide was characterised by strong bactericidal activity, both on planktonic cells and those in the biofilm structure. Additionally, what is worth emphasising was stability and low cytotoxicity in reference to human cells. As the authors of the work underline, the CLP lipopeptide is a new antimicrobial peptide with the possibility of its application in the future in prophylaxis as well as in the treatment of caries [58].

Cirioni et al. analysed the activity of lipopeptides in combination with vancomycin in relation to *S. aureus*, against both planktonic and biofilm forms. The material for analysis was short lipopeptides (Pal-Lys-Lys-NH₂, Pal-Lys-Lys) and vancomycin, and the main aim of the study was to assess the activity of the analysed compounds on the rat model of infection caused by *S. aureus*. Test results against planktonic cells *S. aureus* showed synergism when using vancomycin in combination with lipopeptide. All tested compounds were characterised by similar activity, while the use of all lipopeptides in combination with vancomycin improved their effectiveness. The strongest effect was demonstrated in the case of combination of the Pal-Lys-Lys-NH₂ with vancomycin [13].

6. Summary

The constantly increasing number of multiresistant microorganisms significantly hinders the treatment of infections, especially those serious and life-threatening to patients. As shown in the literature, synthetic anti-

microbial lipopeptides may become a very good alternative in the treatment of such infections and these are currently associated with hopes in the context of the fight against multiresistant organisms [43]. The broad spectrum of action of these compounds and their synergistic effect in combination with conventional antibiotics seems to be important, especially with those with a difficult access to the interior of the bacterial cell. Attempts to modify lipids and acquire new ones give hope for their future use in monotherapy as well as in combination therapy. The problem of safety of the potential use of lipopeptides in clinical practice remains to be resolved due to their possible cytotoxicity and haemolytic properties.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

1. Avrahami D., Shai Y.: A new group of antifungal and antimicrobial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 12277–12285 (2004)
2. Avrahami D., Shai Y.: Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: A plausible mode of action. *Biochemistry – US*, **42**, 14946–14956 (2003)
3. Avrahami D., Shai Y.: Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly and cell selectivity. *Biochemistry – US*, **41**, 2254–2263 (2002)
4. Azmi F., Elliot A.G., Marasini N., Ramu S., Ziora Z., Kavanagh A.M., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A., Skwarczynski M., Toth I.: Short cationic lipopeptides as effective antibacterial agents: Design, physicochemical properties and biological evaluation. *Bioorgan. Med. Chem.* **24**, 2235–2241 (2016)
5. Bahar A.A., Ren D.: Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, **6**, 1543–1575 (2013)
6. Bai Y., Liu S.P., Jiang P., Zhou L., Li J., Tang C., Verma C., Mu Y.G., Beuerman R.W., Pervushin K.: Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin. *Biochemistry – US*, **48**, 7229–7239 (2009)
7. Bai Y., Liu S.P., Li J.G., Lakshminarayan R., Sarawathi P., Tang C., Ho D.C., Verma C., Beuerman R.W., Pervushin K.: Progressive Structuring of a Branched Antimicrobial Peptide on the Path to the Inner Membrane Target. *J. Biol. Chem.* **287**, 26606–26617 (2012)
8. Barańska-Rybak W., Piłkuła M., Dawgul M., Kamysz W., Trzaskowski P., Roszkiewicz J.: Safety profile of antimicrobial peptides: Camel, Citropin, Protegrin, Temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. *Acta. Pol. Pharm.* **70**, 795–801 (2013)
9. Barchiesi F., Giacometti A., Cirioni O., Arzeni D., Silvestri C., Kamysz W., Abbruzzetti A., Riva A., Kamysz E., Scalise G.: *In vitro* activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂ alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Peptides*, **28**, 1509–1513 (2007)
10. Bhunia A., Mohanram H., Domadia P.N., Torres J., Bhattacharya S.: Designed beta-Boomerang Antiendotoxic and Anti-

- microbial peptides. Structures and activities in lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.* **284**, 21991–22004 (2009)
11. Błażewicz I., Jaśkiewicz M., Piechowicz L., Kamysz W., Nowicki R., Barańska-Rybak W.: Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w wybranych dermatozach. *Przegl. Dermatol.* **103**, 227–232 (2016)
 12. Catiau L., Traisnel J., Delval-Dubois V., Chihib N.E., Guillochon D., Nedjar-Arroume N.: Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, **32**, 633–638 (2011)
 13. Cirioni O., Scalise G. i wsp.: The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides*, **28**, 1299–1303 (2007)
 14. Citterio L., Franzyk H., Palarasah Y., Andersen T.E., Mateiu R.V., Gram L.: Improved *in vitro* evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptidomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria, *Res. Microbiol.* **167**, 72–82 (2016)
 15. Cochrane A.S., Findlay B., Bakhtiyari A., Acedo J.Z., Rodriguez-Lopez E.M., Mercier P., Vederas J.C.: Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A1 selectively binds to Gram-negative lipid II. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 11561–11566 (2016)
 16. Dawgul M., Barańska – Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Nowicki R., Łukasiak J., Kamysz W.: Aktywność przeciwbakteryjna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia Astma Immunologia*, **16**, 31–36 (2001)
 17. Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na biofilm *Candida*. *Alergia Astma Immunologia*, **15**, 220–225 (2010)
 18. Dawgul M., Maciejewska M., Jaskiewicz M., Karafova A., Kamysz W.: Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm, *Acta. Pol. Pharm.* **71**, 39–47 (2014)
 19. Eckhard L.H., Houri-Haddad Y., Sol A., Zeharia R., Shai Y., Beyth S., Domb A.J., Bachrach G., Beyth N.: Sustained release of Antibacterial Lipopeptides from Biodegradable Polymers against Pral Pathogens, *Plos One*, **11**, e0162537 (2016)
 20. Fenyous She, Nimmagadda A., Teng P., Su M., Zuo X.B., Cai J.F.: Helical 1:1 alpha/Sulfono-gamma-AA heterogeneous peptides with antimicrobial activity, *Biomacromolecules*, **17**, 1854–1859 (2016)
 21. Ghosh C., Konai M.M., Sarkar P., Samaddar S., Haldar J.: Design simple lipidates lysines: bifurcation imparts selective antimicrobial activity. *Chem. Med. Chem.* **11**, 2367–2371 (2016)
 22. Giuliani A., Rinaldi A.C.: Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2255–2266 (2011)
 23. Goldberg K. Sarig H., Zakoon F., Espand R.F., Espand R.M., Mor A.: Sensitization of gram-negative bacteria by targeting the membrane potential. *Faseb J.* **27**, 3818–3826 (2013)
 24. Greber K.E., Dawgul M., Kamysz W., Sawicki W.: Cationic net charge and counter ion type as antimicrobial activity determinant factors of short lipopeptides. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.00123 (2017)
 25. Greber K.E., Ciura K., Belka M., Kawczak P., Nowakowska J., Baczek T., Sawicki W.: Characterization of antimicrobial and hemolytic properties of short synthetic cationic lipopeptides based on QSAR/QSTR approach, *Amino acids*, DOI: 10.1007/s00726-017-2530-2 (2017)
 26. Horn J.N., Sengillo J.D., Lin D.J., Romo T.D., Grossfield A.: Characterization of a potent antimicrobial lipopeptide via coarse-grained molecular dynamics, *BBA.-Biomembranes*, **1818**, 212–218 (2012)
 27. Hu Y.G., Amin M.N., Padhee S., Wang R.S.E., Qiao Q., Bai G., Li Y.Q., Mathew A., Cao C.H., Cai J.F.: Lipidated peptidomimetics with improved antimicrobial activity. *ACS. Med. Chem. Lett.* **3**, 683–686 (2012)
 28. Hu Y.G., Li X.L., Sebt S.M., Chen J.D., Cai J.F.: Design and synthesis of AApeptides: a new class of peptide mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 1469–1471 (2011)
 29. Iyer V.: A review of stapled peptides and small molecules to inhibit protein-protein interactions in cancer. *Curr. Med. Chem.* **23**, 3025–3043 (2016)
 30. The APD: The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (24.02.2018)
 31. Jammal J., Zakoon F., Kaneti G., Goldberg K., Mor A.: Sensitization of gram-negative bacteria to rifampin and OAK combinations. *Sci. Rep.* – UK, DOI: 10.1038/srep09216
 32. Jammal J., Zaknoon F., Kaneti G., Herhkovits A.S., Mor A.: Sensitization of Gram-negative Bacilli to Host Antimicrobial Proteins, *JPN. J. Infect. Dis.* **215**, 1599–1607 (2017)
 33. Janiszewska J.: Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery*, **59**, 699–707 (2014)
 34. Janiszewska J., Sowinska M., Rajnisz A., Solecka J., Lacka I., Milewski S., Urbanczyk-Lipkowska Z.: Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1388–1393 (2012)
 35. Jansen R.O., Sandberg-Schaal A., Fridodt-Moller N., Nielsen H.M., Franzyk H.: End group modification: Efficient tool for improving activity of antimicrobial peptide analogues towards Gram-positive bacteria, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **95**, 40–46 (2015)
 36. Jaśkiewicz M., Neubauer D., Kamysz W.: Comparative study on antistaphylococcal activity of lipopeptides in various culture media. *Antibiotics*, DOI:10.3390/antibiotics6030015 (2017)
 37. Jenner Z.B., Crittenden C.M., Gonzales M., Brodbelt J.S., Bruns K.A.: Hydrocarbon-stapled lipopeptides exhibit selective antimicrobial activity, *Biopolymers*, **108**, e23006 (2017)
 38. Jerala R.: Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives, *Expert. Opin. Inv. Drug.* **16**, 1159–1169 (2007)
 39. Kamysz E., Barchiesi F. i wsp.: *In vitro* activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. *Peptides*, **32**, 99–103 (2011)
 40. Kamysz E., Sikorska E., Dawgul M., Tyszkowski R., Kamysz W.: Influence of dimerization of lipopeptide Laur-Orn-Orn-Cys-NH₂ and N-terminal peptide of human lactoferricin on biological activity. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **21**, 39–46 (2015)
 41. Kamysz W.: Projektowanie, synteza i badania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Akademia Medyczna. Gdańsk, 2007
 42. Kaur P., Li Y.Q., Cai F.J., Song L.K.: Selective membrane disruption mechanism of an antibacterial gamma-AApeptide defined by EPR spectroscopy. *Biophys. J.* **110**, 1789–1799 (2016)
 43. Koh J.J., Lin S.M., Beuerman R.W., Liu S.P.: Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: design and synthetic approaches, *Amino acids*, **49**, 1653–1677 (2017)
 44. Kozińska A., Sitkiewicz I.: „Nowe” i „Stare” antybiotyki – mechanizmy działania i strategie poszukiwania leków przeciwbakteryjnych. *Kosmos*, **66**, 109–124 (2017)
 45. Lakshminarayanan R., Beuerman R.W. i wsp.: Branched peptide, B2088, disrupts the supramolecular organization of lipopolysaccharides and sensitizes the Gram-negative bacteria, *Sci. Rep.* – UK, **6**, DOI: 10.1038/srep25905 (2016)
 46. Laverty G., McLaughlin M., Shaw C., Gorman S.P., Gilmore B.E.: Antimicrobial Activity of Short, Synthetic Cationic Lipopeptides, *Chem. Biol. Drug. Des.* **75**, 563–569 (2010)
 47. Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W.: Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* DOI: 10.3389/fnins.2017.00073 (2017)

48. Li J.G., Liu S.P., Lakshminarayanan R., Bai Y., Pervushin K., Verma C., Beuerman R.W.: Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability, *BBA.-Biomembranes*, **1828**, 1112–1121 (2013)
49. Lin D.J., Grossfield A.: Thermodynamics of antimicrobial lipopeptide binding to membranes: origins of affinity and selectivity. *Biophys. J.* **107**, 1862–1872 (2014)
50. Lohan S., Cameotra S.S., Bisht G.S.: Systematic study of non-natural short cationic lipopeptides as novel broad-spectrum antimicrobial agents. *Chem. Biol. Drug. Des.* **82**, 557–566 (2013)
51. Majerle A., Kidric J., Jerala R.: Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J. Antimicrob. Chemoth.* **51**, 1159–1165 (2003)
52. Mak P., Pohl J., Dubin A., Reed M.S., Bowers S.E., Fallon M.T., Shafer W.M.: The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **21**, 13–19 (2003)
53. Makovitzky A., Avrahami D., Shai Y.: Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15997–16002 (2006)
54. Makovitzky A., Baram J., Shai Y.: Antimicrobial lipopolypeptides composed of palmitoyl di- and tricationic peptides: *in vitro* and *in vivo* activities, self-assembly to nanostructures and plausible mode of action. *Biochemistry – US*, **47**, 10630–10636 (2008)
55. Malina A., Shai Y.: Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of cationic biologically inactive peptide, *Biochem. J.* **390**, 695–702 (2005)
56. Mangoni M.L., Shai Y.: Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences in cell specificities and modes of action, *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 2267–2280 (2011)
57. Migon D., Neubauer D., Kamysz W.: Hydrocarbon Stapled Antimicrobial Peptides. *Protein J.* DOI: 10.1007/s10930-018-9755-0 (2018)
58. Min K.R., Galvis A., Williams B., Rayala R., Cudic P., Ajdic D.: Antibacterial and Antibiofilm Activities of a Novel Synthetic Cyclic Lipopeptide against Cariogenic *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob. Agents. Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.00776-17 (2017)
59. Mirski T., Gryko R., Bartoszcze M., Bielwaska-Drózd A., Tyszkiewicz W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – nowe możliwości zwalczania infekcji u ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* **67**, 517–521 (2011)
60. Mishra B., Lushnikova T., Wang G.S.: Small lipopeptides possess anti-biofilm capability comparable to daptomycin and vancomycin. *RSC. Adv.* **5**, 59758–59769 (2015)
61. Mizerska-Dudka M., Andrejko M., Kondefer-Szerszeń M.: Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Post. Mikrobiol.* **50**, 209–216 (2011)
62. Mohanram H., Bhattacharjya S.: ‘Lollipop’-shaped helical structure of a hybrid antimicrobial peptide of temporin B – lipopolysaccharide binding motif and mapping cationic residues in antibacterial activity, *BBA.-Gen. Subjects.* **1860**, 1362–1372 (2016)
63. Mohanram H., Bhattacharjya S.: beta-Boomerang Antimicrobial and antiendotoxic peptides: lipidation and disulfide bond effects on activity and structure. *Pharmaceuticals*, **7**, 482–501 (2014)
64. Nasompag S., Dechsiri P., Hongsing N., Phonimdaeng P., Daduang S., Klaynongsruang S., Camesano T.A., Patramanon R.: Effect of acyl chain length on therapeutic activity and mode of action of the C-X-KYR-NH₂ antimicrobial lipopeptide. *BBA.-Biomembranes*, **1848**, 2351–2364 (2015)
65. Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje E.Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D.: Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, **29**, 969–977 (2008)
66. Niu Y.H., Cai J.F. I wsp.: Lipo-gamma-AApeptides as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* **55**, 4003–4009 (2012)
67. Omardien S., Brul S., Zaat S.A.J.: Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front. Cell. Dev. Biol.* DOI: 10.3389/fcell.2016.00111 (2016)
68. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y.: Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* **341**, 501–513 (1999)
69. Padhee S., Li Y.Q., Cai J.F.: Activity of lipo-cyclic gamma-AApeptides against biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 2565–2569 (2015)
70. Papo N., Oren Z., Pag U., Sahl H.G., Shai Y.: The consequence of sequence alternation of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* **277**, 33913–33921 (2002)
71. Radziszewsky I.S., Rotem S., Bourdetsky D., Navon-Venezia S., Carmeli Y., Mor A.: Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers. *Nat. Biotechnol.* **25**, 657–659 (2007)
72. Sang P., Shi Y., Teng P., Cao A.N., Xu H., Li Q., Cai J.F.: Antimicrobial AApeptides, *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 1266–1279 (2017)
73. Sarig H., Livne L., Held-Kutnetsov V., Zakoon F., Ivankin A., Gidalevitz D., Mor A.: A miniature mimic of host defense peptides with systematic antibacterial efficacy. *Faseb J.* **24**, 1904–1913 (2010)
74. Shai Y., Makovitzky A., Avrahami D.: Host defense peptides and lipopeptides: mode of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 479–486 (2006)
75. Sikorska E., Dawgul M., Greber K., Iłowska E., Pogorzelska A., Kamysz W.: Self-assembly and interactions of short antimicrobial lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *BBA.-Biomembranes*, **1838**, 2625–2634 (2014)
76. Straus S.K., Hancock R.E.W.: Mode of action of the new antibiotic for gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *BBA.-Biomembranes*, **1758**, 1215–1223 (2006)
77. Teng P., Cai J.F. I wsp.: Small Antimicrobial Agents Based on Acylated Reduced Amide Scaffold, *J. Med. Chem.* **59**, 7877–7887 (2016)
78. Wang G.: Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Method. Mol. Cell Biol.* **1268**, 43–66 (2015)
79. Wiesner J., Vilcinskas A.: Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, **1**, 440–64 (2010)
80. Wódz K., Brzezińska-Błaszczuk E., Katelicydyny – endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe. *Postępy Biochemii*, **61**, 93–101 (2015)
81. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Cytryńska M.: Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. *Kosmos*, **66**, 563–574 (2017)
82. Zhang L.J., Gallo R.L.: Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **26**, 14–19 (2016)
83. Żyłowska M., Wysznińska A., Jagusztyn-Krynicka E. K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* **50**, 223–234 (2011)

Paulina Czechowicz*, Joanna Nowicka

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w lipcu 2018 r.

Streszczenie: Ciągłe rosnąca liczba szczepów wieloopornych skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia. Obiecującą grupą „leków” do walki z wieloopornymi mikroorganizmami, bazującą na naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych, mogą stać się syntetyczne peptydy określane mianem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych. W pracy omówiono pochodzenie syntetycznych lipopeptydów, ich podział oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe

1. Wstęp. 2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe. 3. Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych. 4. Antybiotyki lipopeptydowe. 5. Syntetyczne lipopeptydy. 5.1. Krótkie syntetyczne lipopeptydy. 5.2. Peptidomimetyki. 5.3. Multiwalentne lipopeptydy. 5.4. Lipopeptydy usztywnione kłamarą węglowodorową. 5.5. Lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach laboratoryjnych. 6. Podsumowanie

Antimicrobial activity of lipopeptides

Abstract: The constantly growing number of multidrug-resistant bacterial strains prompts the search for alternative treatments. Synthetic peptides based on natural antimicrobial peptides, also known as antimicrobial lipopeptides, can become a promising group of “drugs” to fight multi-resistant bacteria. The present paper discusses the origins of synthetic lipopeptides, their classification and antimicrobial properties.

1. Introduction. 2. Antimicrobial peptides. 3. Classification of antimicrobial peptides. 4. Lipopeptide antibiotics. 5. Synthetic lipopeptides. 5.1. Ultrashort lipopeptides. 5.2. Peptidomimetics. 5.3. Multivalent lipopeptides. 5.4. Hydrocarbon-stapled lipopeptides. 5.5. Antimicrobial lipopeptides in laboratory research. 6. Summary

Słowa kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, lipopeptydy, peptydy

Key words: antimicrobial activity, lipopeptides, peptides

1. Wstęp

Efektywność pierwszych antybiotyków przez wiele lat była niepodważalna. Znajdowały one szerokie zastosowanie terapeutyczne. Niestety, oporne szczepy bakterii zaczęły pojawiać się już w latach 50. dwudziestego wieku. W kolejnych latach oporność mikroorganizmów na wprowadzane do terapii antybiotyki pojawiała się bardzo szybko. Przyczyną takiego stanu rzeczy było, i niestety nadal jest, nadużywanie antybiotyków, stosowanie ich bez udokumentowanych wskazań, w nieodpowiednich dawkach czy podczas hodowli zwierząt gospodarskich [44]. Obecnie stale rośnie liczba patogenów alarmowych, a oporność nie dotyczy tylko mikroorganizmów pochodzących ze środowiska szpitalnego [33]. Istotne jest to, że jeżeli nie pojawią się nowe opcje terapeutyczne to, jak pisze Kozłowska, do 2050 roku przyczyną zgonów u ludzi częściej będą infekcje niż nowotwory. Warto dodać, że już teraz na całym świecie zakażenia powodowane przez oporne mikroorga-

nizmy są przyczyną 700 tysięcy zgonów każdego roku [44]. Szacuje się, że do 2050 zakażenia powodowane przez oporne mikroorganizmy będą przyczyną ponad 300 milionów zgonów [15].

Oczywiście nadal prowadzone są prace nad pozyskaniem skutecznych antybiotyków. Odbywa się to poprzez modyfikację tych już istniejących lub poszukuje się całkowicie nowych klas antybiotyków z zupełnie odmiennymi celami molekularnymi w komórkach drobnoustroju [44]. Niestety, proces opracowania nowych antybiotyków i wprowadzania ich do terapii jest długotrwały i musi być poprzedzony wielokrotnymi badaniami przedklinicznymi i klinicznymi. Większość obecnie stosowanych antybiotyków to substancje opracowane w latach 1940–1960 [67]. Według Cochrane i wsp. szczególnie alarmujący jest brak nowych antybiotyków skutecznych wobec bakterii Gram-ujemnych [15]. Szczególnie podkreślony przez autora jest fakt, że w ubiegłych 50 latach, zatwierdzono do leczenia infekcji układowych jedynie parę antybiotyków (np. linezolid

* Autor korespondencyjny: Paulina Czechowicz, Student Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów działające przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 71 784 00 65; e-mail: paulina.czechowicz.umedwroc@gmail.com

Autorka korespondencyjna pracy jest laureatką konkursu prac młodych naukowców. Nagroda została przyznana przez Komisję Konkursową na Konferencji pod patronatem PTM: „Wektory i patogeny w przeszłości i przyszłości”, która odbyła się we Wrocławiu 24 listopada 2017 r.

czy daptomycyna), niestety skutecznych wyłącznie wobec bakterii Gram-dodatnich [15].

Pomimo zauważalnego postępu w medycynie i farmacji, terapia zakażeń jest nadal trudna. Nabywanie nowych mechanizmów oporności przez wrażliwe komórki bakterii i ciągle rosnąca liczba szczepów wielolekoopornych skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia, takich metod, które byłyby skuteczne w terapii zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy. Nadzieje pokładane są w peptydach przeciwdrobnoustrojowych (AMP – Antimicrobial Peptides), które mogą stać się skuteczną bronią w walce z opornymi mikroorganizmami oraz wytwarzanym przez nie biofilmem [17, 33]. Jako związki o naturalnym pochodzeniu mogą stanowić wartościową bazę do pozyskiwania nowych syntetycznych leków o szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym [33] i zupełnie odmiennym, w porównaniu do dostępnych antybiotyków, mechanizmie działania [67]. Odmienny mechanizm działania jak i nowe cele molekularne w komórkach drobnoustroju mogą stać się szczególnie istotne w kontekście wolniejszego pojawiania się i rozwijania oporności mikroorganizmów podczas ich klinicznego stosowania.

Obiecującą grupą związków do walki z wielolekoopornymi mikroorganizmami, bazującą na naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych, mogą stać się syntetyczne peptydy określane mianem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych. Podobnie jak peptydy naturalne charakteryzują się one szerokim spektrum działania, zarówno przeciwbakteryjnym, wykazując aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak i przeciwgrzybiczym [15].

2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Lizozym, białko kationowe odkryte w 1922 roku przez Aleksandra Fleminga, uznawany jest dzisiaj za pierwszy AMP [78]. Kolejne badania nad AMP datuje się na rok 1939, kiedy to odkryto gramicydynę. Peptyd ten został wyizolowany z *Bacillus brevis* i charakteryzował się dobrą skutecznością w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich [5]. Donoszono o efektywności gramicydyny przy stosowaniu miejscowym (leczenie ran i owrzodzeń) i toksyczności przy jej zastosowaniu dootrzewnowym [5].

W 1941 odkryto tyrocydynę, wykazującą aktywność zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [5]. W latach 50. XX wieku Skames i Watson uzyskali leukinę, a Hirsch i Cohen fagocytynę. Oba białka wyizolowane zostały z leukocytów królika [33]. W kolejnych latach peptydy przeciwdrobnoustrojowe opisano u ciem (cekropina), roślin (tioniny), krabów (tachyplezyny) jak i u ssaków

(defensyny) [33]. To właśnie defensyny, wyizolowane w 1956 roku zostały uznane za pierwsze peptydy AMP pochodzące od zwierząt [5]. Magaininy, kationowe peptydy, odkryto w latach 80. u żab przez Zasloff'a i wsp. [33, 59, 82]. W organizmach tych płazów peptydy pełnią rolę ochronną – chronią ich skórę przed mikroorganizmami, szczególnie bakteriami znajdującymi się w wodzie [41]. Wydzielane są przez żaby w wyniku zranienia [33]. Aby uzyskać peptydy żabie w warunkach laboratoryjnych, po stymulacji żab (np. norepinefryną) wydzielinę ich skóry, po zebraniu i ekstrakcji, rozdziela się chromatograficznie otrzymując czyste związki [41].

Obecnie wiele peptydów izoluje się z organizmów owadów, głównie pszczoł, będąc składową ich układu odpornościowego. Z hemolimfy larw tych owadów, poddanej rozdzielaniu chromatograficznemu, uzyskuje się czyste peptydy [41].

Nadal trwają intensywne badania nad nowymi peptydami, określeniem ich struktury, właściwości czy sposobów działania [41]. Bazy danych [30], w których gromadzone są informacje na temat peptydów, ich budowy, właściwości, zakresie działania czy funkcji dają możliwość uzyskania nowych syntetycznych peptydów [59].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są rozpowszechnioną w przyrodzie grupą związków pochodzenia naturalnego. W bazie peptydów, The Antimicrobial Peptides Database, do połowy lutego 2018 roku opisano 2884 peptydy, z czego 333 stanowią bakteriocyty, 4 izolowano z archeonów, 8 z protistów, 13 pochodzi od grzybów, 342 izolowano z roślin, a 2184 to peptydy zwierzęce [30]. AMP, produkowane są zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Ponadto, stanowią istotny element układu odpornościowego u eukariota [17].

Uważa się, że obok niszczenia mikroorganizmów przez fagocyty, peptydy to najstarszy element odporności [79]. W organizmie człowieka są one częścią wrodzonego układu odpornościowego [47], stanowią pierwszą linię obrony na skórze i błonach śluzowych, występują w ślinie, a produkowane są głównie przez keratynocyty warstwy rogowej naskórka, neutrofile i gruczoły potowe [8]. Bogatym źródłem AMP jest płyn łzowy. Wysoki ich poziom stwierdza się również w jelicie cienkim [47]. Są zaangażowane w eliminację mikroorganizmów chorobotwórczych, ale także w kontrolę mikrobioty naszego organizmu. AMP mogą neutralizować endotoksyny, jak i wpływać immunomodulacyjnie na układ odpornościowy [81]. Zwiększone wydzielanie naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych obserwuje się w obszarze stanu zapalnego będącego następstwem zakażenia [17].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą mieć różną strukturę drugorzędową, ale na ogół zawierają od 12 do 50 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 2–10 kDa i wypadkowym ładunku dodatnim, co jest

związane z występującymi w ich strukturze aminokwasami zasadowymi [47, 61, 80]. Większość peptydów to peptydy kationowe [81]. Spektrum ich działania przeciwdrobnoustrojowego obejmuje bakterie (zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne), wirusy, grzyby, a także pierwotniaki [17, 36, 61, 67]. W przypadku niektórych AMP stwierdzono także aktywność przeciwnowotworową [61] i immunomodulującą. Ponadto, AMP mogą wstrzymywać proces destrukcji tkanek pod wpływem enzymów mikroorganizmów, a także przyspieszać proces gojenia ran [17].

AMP oddziałują z błoną komórkową patogenu prowadząc do jej destabilizacji i lizy komórki. Inne mechanizmy działania peptydów to wstrzymanie procesu replikacji DNA i ekspresji białek, a także ucieczka adenozynotrójfosforanu [59]. Częsteczki peptydów, o wypadkowym ładunku dodatnim, oddziałują z ujemnie naładowaną błoną komórkową, głównie poprzez oddziaływania elektrostatyczne [59]. U bakterii Gram-dodatnich peptydy przeciwdrobnoustrojowe są przyciągane przez obecne w peptydoglikanie grupy anionowe, wiążąc się z ujemnie naładowanymi lipidami znajdującymi się po zewnętrznej stronie błony komórkowej [11, 59]. U Gram-ujemnych łączą się z lipopolisacharydami [11].

Na podstawie badań nad sposobem wnikania peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez błonę wytypowano 4 mechanizmy: klepek beczki, dywanowy, pierścieniowy i nieuporządkowanych pierścieniowych porów. W pierwszym zachodzi gromadzenie AMP w taki sposób, że niepolarne ich części pokrywają lipidy błony, a ich część hydrofilowa tworzy rodzaj szczeliny; całość przypomina kształt klepek czy też beczkę zbudowaną z klepek. Peptydy ułożone są prostopadle do powierzchni błony, a utworzone w błonie „otwory” wywołują wyciek składników komórki. W mechanizmie dywanowym AMP układają się równolegle do błony, równomiernie ją wyścielają pokrywając jak dywan, a wywierając na nią nacisk, doprowadzają do przerwania jej ciągłości. Podobnie działają detergenty. W trzecim mechanizmie oddziaływania peptydów po ich połączeniu z błoną dochodzi do wygięcia lipidów błony na kształt pierścienia. Peptydy zostają połączone z polarnymi głowami lipidów [59, 61, 79, 83]. W najrzadszym, czwartym sposobie wnikania peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez błonę, czyli podczas formułowania „nieuporządkowanych pierścieniowych porów”, peptydy umiejscowione są w błonie pod różnym kątem [83].

3. Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Istnieje kilka systemów klasyfikacji AMP. Bierze się w nich pod uwagę m.in. źródło pochodzenia peptydów czy ich właściwości molekularne. Najczęściej stosowany

system oparty jest na sekwencji aminokwasowej oraz strukturze drugorzędowej i dzieli peptydy na następujące klasy [11, 41, 61, 79]:

- liniowe peptydy α -helikalne,
- peptydy bogate w reszty cysteiny,
- peptydy o strukturze β -kardki,
- peptydy zawierające przeważającą liczbę aminokwasów jednego typu, np. glicyny, histydyny i/lub proliny,
- peptydy zawierające rzadkie, modyfikowane aminokwasy [11].

Dodatkowo warto wspomnieć o kryterium klasyfikacji peptydów przeciwdrobnoustrojowych na podstawie ich funkcji. Tu również możemy wydzielić trzy grupy: peptydy niszczące strukturę ściany komórkowej, peptydy wiążące pierwiastki oraz peptydy działające destrukcyjnie na membrany bakteryjne [33].

4. Antybiotyki lipopeptydowe

Przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy jest grupa związków stanowiących jedną z klas AMP, określana jako lipopeptydy. W związkach tych upatruje się obecnie największego potencjału skutecznego działania wobec mikroorganizmów wieloopornych [43, 53]. Nie sposób jednak o nich mówić nie wspominając o naturalnych lipopeptydach, z których dziś większość jest już zaliczana do antybiotyków lipopeptydowych, a kilka stosowanych jest w praktyce klinicznej, takich jak chociażby daptomycyna czy polimyksyna.

Antybiotyki lipopeptydowe są syntezowane drogą nierybosomalną w komórkach bakterii oraz grzybów w trakcie przemian różnych związków węglowych [19, 38, 43, 72, 76]. Częsteczka lipopeptydu zbudowana jest z hydrofilowej części peptydowej połączonej kowalencyjnie z częścią hydrofobową, na którą składa się łańcuch kwasu tłuszczowego – co ostatecznie nadaje cząsteczce charakter amfifilowy. Część peptydowa może być liniowa lub cykliczna, przy czym cyklizacja znacznie wzmacnia ochronę przed proteolizą [4, 43]. Peptyd warunkuje określone spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, które jest zależne od sekwencji tej cząsteczki, a także jej ładunku, ujemnego lub dodatniego [38, 46, 56]. Przykładami lipopeptydów o wypadkowym ładunku ujemnym są daptomycyna czy surfaktyna, zaś dodatnim – polimyksyna B i jej pochodne, takie jak kolistyna czy oktapeptyna [38, 43, 76].

Dołączone do peptydów hydrofobowe związki, takie jak aminy tłuszczowe, kwasy tłuszczowe czy estry gliceryny również wpływają na zróżnicowany stopień aktywności przeciwdrobnoustrojowej lipopeptydów. Udowodniono, że AMP, do których przyłączone zostały ugrupowania hydrofobowe mogą wykazywać zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Istotnym czynnikiem wpływającym na ową aktywność jest długość

łańcucha alkilowego [25, 46, 51, 52, 56]. Próby polegające na usunięciu z polimyksyny B reszty kwasu tłuszczowego wykazały niemal całkowitą utratę aktywności przeciwbakteryjnej. Szczegółowe badania oddziaływań lipopeptydów z błonami mikroorganizmów wykazały, że to właśnie łańcuch alkilowy wzmacnia ich powinowactwo do błon komórkowych, a dokładniej wbudowywanie pomiędzy lipidy błonowe, co z kolei zaburza hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej [38, 56]. Dzieje się tak dlatego, że przyłączenie łańcucha alkilowego zmienia w sposób oczywisty hydrofobowość całego związku, a poprzez to, oprócz wspomnianego powinowactwa, wpływa także na tendencję do oligomeryzacji oraz sposób organizacji związku w roztworach [56, 76].

Zasadniczym celem działania antybiotyków lipopeptydowych jest dezintegracja błony komórkowej drobnoustrojów, prowadząca do powstania jej defektów i w efekcie do utraty potencjału błonowego, redukcji zdolności syntezy ATP (ATP – adenosynotrójfosforan) i śmierci komórki. Mogą one też zaburzać inne procesy komórkowe, takie jak replikacja DNA, transkrypcja czy translacja. Selekttywne działanie tych związków wobec bakterii wynika z różnic w budowie błon komórek prokariotycznych i komórek ludzkich. Błony ssaczych komórek są na zewnątrz elektrostycznie obojętne, zbudowane z cholesterolu, fosfatydylocholinoi czy sfingomieliny. Natomiast błony zewnętrzne komórek bakteryjnych zwykle składają się z ujemnie naładowanych fosfolipidów, takich jak kardiolipina czy fosfatydyloglicerol [20, 38, 48, 56, 72, 76, 77]. Jednocześnie lipopeptydy o wysokim stopniu hydrofobowości nie wykazują selektywności działania; efektywnie oddziałują niemal na wszystkie rodzaje komórek, w tym bakterii czy grzybów, co jest powodem wywoływania przez te związki również hemolizy erytrocytów ludzkich oraz cytotoksycznego działania wobec komórek ssaczych [55, 56]. Brak jednej określonej struktury (na przykład receptora) jako podstawy mechanizmu działania w istotny sposób utrudnia patogenowi nabywanie oporności na lipopeptydy. Badania wskazują, że osiągnięcie oporności na te antybiotyki następuje, gdy drobnoustroje zmodyfikują podstawowe właściwości swojej błony komórkowej, co jest możliwe po upływie kilkuset pokoleń mikroorganizmów [38, 56, 76]. Jednak pomimo wszystkich swoich zalet, żaden antybiotyk lipopeptydowy nie osiąga tak szerokiego spektrum działania jak AMP, a oporność bakterii, choć wolniej, narasta również na ten rodzaj antybiotyków [43].

5. Syntetyczne lipopeptydy

Stosunkowo mało skomplikowana budowa lipopeptydów, ich mechanizm działania o dobrej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej i utrudnione naby-

wanie oporności na te związki przez mikroorganizmy oraz szerokie spektrum aktywności AMP wraz z ich równie efektywnymi sposobami działania na drobnoustroje sprawiły, że zainteresowano się możliwością syntezy lipopeptydów. Doniesienia naukowe wielokrotnie dostarczały dowodów, że można uprościć kationowe peptydy pochodzenia naturalnego tak, aby obejmowały jedynie dodatnio naładowane cząsteczki z dołączonymi hydrofobowymi resztami [38]. Początkowo syntezyowano i badano półsyntetyczne analogi istniejących już antybiotyków – liniowe pochodne daptomycyny, polimyksyny B czy amfomicyny oraz cykliczne związki, takie jak laktoferycyna, bakteriocyny czy pochodne ludzkiej defensyny [38, 43]. Choć z powodzeniem nadal uzyskuje się coraz nowsze analogi, to jednak wciąż najlepszą skuteczność i spektrum działania wykazują naturalne związki, z których wspomniane pochodne się wywodzą [18, 38]. Dodatkowo, wytwarzane związki cechują się małą stabilnością i możliwością degradacji przez peptydazy oraz dużymi kosztami produkcji, niewspółmiernymi do osiągniętych parametrów farmakokinetycznych [14, 43, 77]. Wzięto więc pod uwagę możliwość poprawy właściwości i w tym celu wyprodukowano całkowicie syntetyczne lipopeptydy [43].

Ogólna zasada mówiąca o najbardziej optymalnej strukturze lipopeptydu w postaci krótkiego łańcucha peptydowego (6–7 aminokwasów o budowie liniowej lub cyklicznej) i N-końcowego podstawnika amidowego (kwasu tłuszczowego) stanowi bazę pod opracowanie skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych, których spektrum aktywności może być modulowane przez modyfikację właśnie N-końcowego podstawnika [46, 56, 76]. Wykazano, że przyłączenie ugrupowania zawierającego łańcuch alkilowy do AMP wpływa na oligomeryzację i organizację związku w roztworach, a także na powinowactwo do błony komórkowej dzięki zmianie hydrofobowości i w efekcie analogi tego typu mogą charakteryzować się lepszą aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą [3, 51, 52, 55]. Główne cele syntezy to poprawa stabilności w stosunku do AMP poprzez zwolnienie szybkości degradacji, uzyskanie możliwości stosowania znacznie niższych stężeń lipopeptydów i poprzez to również wyeliminowanie problemu cytotoksyczności AMP i powodowania przez te związki hemolizy. Równie istotne jest także poszerzenie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego względem antybiotyków lipopeptydowych i obniżenie kosztów produkcji związane z uproszczeniem procesu syntezy [4, 26, 38, 72]. Wiadomo, że synteza na przykład krótkich liniowych lipopeptydów generuje istotnie mniejsze koszty ich wytwarzania [56].

Ogólny mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego syntetycznych lipopeptydów jest związany ze zjawiskiem amfifilowości: lipopeptyd wbudowuje się

w dwuwarstwą lipidową atakowanej błony mikroorganizmu, wprowadzając defekty w upakowaniu jej łańcucha i indukuje powstawanie krzywizn błony, a w konsekwencji wyciek składników komórkowych. Wówczas dochodzi do rozproszenia potencjału wewnątrzkomórkowego i ostatecznie śmierci komórki [38]. Niemniej jednak szczegółowe procesy zachodzące w trakcie tego zjawiska nie zostały do końca wyjaśnione.

Obiecujące są również wyniki badań, w których podejmowano próby terapii skojarzonej lipopeptydów z konwencjonalnymi antybiotykami. W szczególności wymierne efekty obserwowane były w przypadku tych antybiotyków, u których zauważa się trudności związane z dotarciem do celu molekularnego znajdującego się wewnątrz komórki bakteryjnej i powstawaniem oporności na tym tle. Zastosowanie lipopeptydów celem ich interakcji z błoną i zwiększenia jej przepuszczalności wiąże się potencjalnie z umożliwieniem antybiotykowi penetracji, osiągnięciem pożądanego efektu klinicznego i zabicia drobnoustrojów. Uzyskanie takiego efektu zachodzi ponadto przy znacznie mniejszym minimalnym stężeniu hamującym (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) dla antybiotyku (nawet o kilka rzędów wielkości!) dzięki dodaniu lipopeptydu już w stężeniach poniżej wartości MIC [38].

Do rozwiązania nadal pozostają problemy bezpieczeństwa potencjalnego stosowania lipopeptydów w praktyce klinicznej z uwagi na obserwowane efekty cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych oraz hemolizę erytrocytów w stężeniach MIC niezbędnych na przykład do eradykacji biofilmu [46]. Warto jednak zauważyć, że w przypadku dużej części syntetycznych lipopeptydów toksyczność jest relatywnie niska. Dlatego też dla owych związków daje to niemałą przewagę. Niemniej konieczne są dokładniejsze analizy, zanim będzie możliwe użycie lipopeptydów w badaniach klinicznych [25].

Zgodnie z obecną wiedzą, biorąc pod uwagę strukturę syntetycznych lipopeptydów, można je podzielić na cztery grupy:

1. krótkie syntetyczne lipopeptydy,
2. peptydomimetyki,
3. multiwaleńtne lipopeptydy,
4. lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową [43].

Należy jednak zaznaczyć, że stale projektowane i syntezowane są nowe lipopeptydy, a większość z nich badana jest przez laboratorium je opracowujące *de novo*, stąd w wielu pracach badawczych obiektem zainteresowania są albo zupełnie nowe związki, albo modyfikacja już poznanych struktur.

5.1. Krótkie syntetyczne lipopeptydy

Peptydy z tej grupy są najkrótszymi związkami spośród AMP, tzn. posiadają najmniejszą liczbę reszt aminokwasowych. Składają się z 2 do 4 aminokwasów

połączonych z kwasem tłuszczowym (na ogół o długości od 12 do 16 atomów węgla w łańcuchu) o wypadkowym ładunku dodatnim (od +1 do +4). Co zaskakujące, zastąpienie tylko 1 aminokwasu z dwóch lub czterech skutkuje otrzymaniem zupełnie odmiennych właściwości biologicznych [19, 43, 53, 54, 56]. Krótkie syntetyczne lipopeptydy mają właściwości amfifilowe podobnie jak detergenty (hydrofilowa strona peptydu i hydrofobowa lipidu), co z kolei daje im możliwość samoasocjacji i oligomeryzacji z wytworzeniem hydrofobowego rdzenia. Zasadniczo w krótkich lipopeptydach możliwość ta w dużej mierze jest ograniczona ze względu na bliskie sąsiedztwo dodatniego ładunku peptydu – łańcuch kwasu tłuszczowego musi być więc dostatecznie długi (co najmniej 14 atomów węgla) do wystąpienia tego zjawiska [3, 74]. Ostatecznie oligomeryzacja może być sposobem na ochronę przed działaniem peptydaz, a więc poprawiać stabilność i odporność na degradację, co może znaleźć swoje przełożenie w warunkach *in vivo* [56, 68, 70].

Długość łańcucha kwasu tłuszczowego determinuje aktywność przeciwdrobnoustrojową – istnieją hipotezy dotyczące jego optymalnej długości mówiące, że dla aktywności skierowanej przeciwko bakteriom Gram-dodatnim potrzebne są 2 reszty metylenowe więcej, niż dla aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych. Ta sama hipoteza mówi, że z kolei wydłużenie tegoż łańcucha powyżej 10–12 jednostek węglowych może powodować spadek aktywności przeciwbakteryjnej (ale zależnie od części peptydowej), najprawdopodobniej na skutek niedopasowania hydrofobowego i niedostatecznych defektów w atakowanej dwuwarstwie lipidowej [38]. Ponadto wielokrotnie potwierdzano, że spektrum przeciwdrobnoustrojowe zależy przede wszystkim od składu lipopeptydu, a więc i jego powinowactwa do błony docelowej, którego najważniejszym czynnikiem jest hydrofobowość cząsteczki [1, 19, 25, 52, 55, 74]. Kwas tłuszczowy jest więc najważniejszym elementem struktury tych związków. Nawet krótki syntetyczny peptyd Pal-KK-NH₂ składający się z dwóch reszt aminokwasu lizyny (K – lizyna), posiadający resztę kwasu palmitynowego o łańcuchu zbudowanym z szesnastu atomów węgla na N-końcu (Pal/C₁₆ – reszta kwasu palmitynowego) jest bakterio- i grzybobójczy [8]. Z sukcesem wytworzono serię krótkich syntetycznych lipopeptydów poprzez połączenie z kwasem tłuszczowym nieaktywnych krótkich peptydów i uzyskanie w ten sposób aktywności przeciwdrobnoustrojowej [1, 2, 26, 43]. Co ważne, żaden z przebadanych lipopeptydów tego typu nie powodował hemolizy erytrocytów ludzkich [1, 43].

Najpowszechniejszy związek wśród krótkich syntetycznych lipopeptydów oznaczany jest jako Pal-KGGK-NH₂. W tak przedstawionym zapisie „Pal” stanowi resztę kwasu palmitynowego, natomiast „KGGK” odpowiada konkretnej sekwencji aminokwasowej

(Lys-Gly-Gly-Lys, przy czym druga reszta lizyny jest D-enancjomerem pierwszej; G – glicyna). Głównym celem działania tego lipopeptydu, podobnie jak wszystkich lipopeptydów oraz AMP, jest interakcja z wewnętrzną błoną komórkową bakterii i indukcja lizy tej błony. Jednak aby lipopeptyd mógł zadziałać na wewnętrzną błonę, konieczna jest wcześniejsza elektrostatyczna interakcja pomiędzy dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi aminokwasów (przede wszystkim lizyny) z posiadającymi wypadkowy ładunek ujemny komponentami ściany komórkowej drobnoustroju. W przypadku bakterii Gram-dodatnich oddziaływanie zachodzi głównie z kwasem lipoteichojowym, natomiast u Gram-ujemnych z LPS (LPS – lipopolisacharyd) zlokalizowanym na błonie zewnętrznej. Następuje wbudowywanie się lipopeptydu w dwuwarstwę fosfolipidową i perforacja błony zewnętrznej, umożliwiającą dostęp do błony wewnętrznej patogenu. Aktywność omawianego związku doprowadza do zmiany miejscowej organizacji błony lipidowej i drastycznej reorganizacji struktury całej wewnętrznej błony komórkowej, co ma wpływ na jej dynamikę i wszystkie procesy od niej zależne [37, 43, 53, 56, 76]. Elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy częścią peptydową Pal-KGGK-NH₂ a fosfolipidami i innymi składnikami zewnętrznej błony bakteryjnej jest najprawdopodobniej czynnikiem warunkującym selektywność tego związku wobec komórek drobnoustrojów – błony komórek ssaczych, posiadające wypadkowy ładunek obojętny, nie były celem działania tego lipopeptydu (w badaniach *in vitro*). Sugeruje się jednocześnie, że za powinowactwo omawianego związku do komórek bakteryjnych odpowiedzialna jest reszta kwasu palmitynowego, umożliwiającą oligomeryzację związku i powstawanie micelli, oddziaływujących z błoną komórkową mikroorganizmów [26, 49]. Niemniej ustalono, że aktywność lipopeptydu z docelową błoną bakteryjną może zachodzić w dwojaki sposób: na drodze hydrofobowego oddziaływania reszty kwasu tłuszczowego oraz poprzez elektrostatyczną interakcję reszty aminokwasowej [26, 43, 49].

Inny przykład stanowi Mir-KYR-NH₂ (Mir/C₁₄ – reszta kwasu mirystynowego o długości 14 atomów węgla). KYR to sekwencja trzech aminokwasów (Y – tyrozyna; R – arginina; sekwencja Lys-Tyr-Arg) uzyskana poprzez hydrolizę cząsteczki hemoglobiny wołowej przez pepsynę. Wcześniejsze doniesienia wielokrotnie udowodniały, że poprzez trawienie hemoglobiny wołowej można uzyskać wiele peptydów o różnych właściwościach, w tym około 30 o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. KYR naturalnie znajduje się w pozycji 139–141 łańcucha α; jednak do badań wykorzystywano identyczną cząsteczkę, lecz zsyntezowaną w laboratorium [12, 65]. Dla poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowej N-koniec został acylowany kwasem tłuszczowym o różnej długości łańcucha

węglowego (z dziesięcioma, dwunastoma, czternastoma lub szesnastoma atomami węgla), przy czym związek zawierający resztę kwasu mirystynowego wydaje się być najefektywniejszym w działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Mechanizm działania lipopeptydów posiadających w składzie reszty tego kwasu tłuszczowego lub kwasu laurynowego prawdopodobnie polega na połączeniu najpierw z zewnętrzną błoną bakterii, jej permeabilizacją i przeniknięciem, późniejszym połączeniem z błoną wewnętrzną, również permeabilizowaną i dodatkowo depolaryzowaną, co skutkuje szybką śmiercią komórki [64]. Te i inne podobne strukturalnie związki, najprawdopodobniej również działające w opisanym sposobie, takie jak Pal-KK-NH₂, Pal-KGK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂ posiadają bardzo szerokie spektrum działania zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [43, 75].

Inne przykładowe syntezowane krótkie lipopeptydy składają się z 1 do 5 cząsteczek aminokwasu ornityny (Orn – ornityna), powstającego z argininy pod wpływem arginazy, które są kowalencyjnie połączone z kwasem tłuszczowym (o długości łańcucha węglowego od 8 do 18 atomów węgla), wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów. Wśród testowanych syntetyk o sekwencji Mir-Orn-Orn-Orn-NH₂, (oznaczany przez badaczy jako LP16) wydaje się być najskuteczniejszy w działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Jako związek nietoksyczny (nie wywoływał hemolizy hRBC w testach *in vitro*), łatwy do syntezy oraz stabilny i odporny na działanie trypsyny jest kolejnym przykładem potwierdzającym, że lipopeptydy, w tym krótkie syntetyczne, mają duży potencjał, aby stać się nowymi i efektywnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi [50].

Zsyntezowano również lipopeptydy składające się z jednej reszty lizyny, w których pojedynczy dłuższy łańcuch reszty kwasu tłuszczowego (na przykład szesnastowęglowy kwas palmitynowego) zastąpiono dwoma resztami o krótszej długości łańcucha tłuszczowego (z ośmioma atomami węgla): C₈-K-C₈. Celem była poprawa selektywności bez wpływu na właściwości amfipatyczne, kluczowe dla działania przeciwbakteryjnego. Aktywność powstałego związku była porównywalna z aktywnością lipopeptydu zawierającego pojedynczy, dwukrotnie dłuższy łańcuch kwasu tłuszczowego, jednak nowy analog był znacząco mniej hemolityczny wobec erytrocytów ludzkich. Ponadto inny, niesymetryczny w budowie lipopeptyd zsyntezowany w podobny sposób, C₈-K-C₁₀, okazał się zupełnie nietoksyczny *in vitro* dla ludzkich embrionalnych komórek nerek (HEK – Human Epithelial Kidney cells) w stężeniach dwukrotnie wyższych niż wartość MIC – przy czym minimalne stężenie niezbędne do zahamowania wzrostu bakterii, zarówno

Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, było znacznie niższe niż w przypadku krótkich syntetycznych lipopeptydów, zawierających pojedynczą resztę kwasu tłuszczowego [21]. Brak wpływu cytotoksycznego na ssacze komórki jest zaskakujący przede wszystkim dlatego, że zbadany mechanizm działania nie wydaje się odmienny i opiera się na permeabilizacji i depolaryzacji błony, co z kolei prowadzi do wniosku, że prawdopodobnie udało się znacząco poprawić selektywność działania i powinowactwo do komórek prokariotycznych. Niemniej autorzy podkreślają, że wymagane są dalsze badania tego i podobnych związków pod tym kątem [21, 43].

Metod i pomysłów modyfikacji krótkich syntetycznych lipopeptydów jest znacznie więcej i niemal w każdej pracy można spotkać się z odmiennym do nich podejściem, z których każde wydaje się być korzystne, nastawione na poszukiwanie nowych sposobów otrzymania pożądaných właściwości syntezowanych związków. Poszczególne metody uzyskiwania krótkich lipopeptydów o różnej budowie wpływają więc zarówno na spektrum działania, jak i na występowanie potencjalnego efektu cytotoksycznego i hemolitycznego w stosunku do komórek ludzkich [43].

Testowane są też różne strategie zastosowania tych lipopeptydów, na przykład sprzęganie z innymi cząsteczkami dla poprawy właściwości antybakteryjnych. Prowadzone są próby sprzęgania z kationowymi związkami polianionowymi, spermidyną, putresyną etc., pełniącymi wiele różnych ról w modyfikacji kwasów nukleinowych czy białek.

W osobnych badaniach zajęto się również lipopeptydami o potencjalnym działaniu przeciwbiofilmowym, porównywalnym do działania wankomycyny czy daptomocyny, jak Mir-KK-NH₂ czy Mir-RRR-NH₂ (z których drugi wymieniony wykazuje w tym zakresie także synergizm działania z wankomycyną) [43, 60]. Kolejne związki badane pod kątem aktywności przeciwbiofilmowej to między innymi Pal-KGGK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KAAK-NH₂ i Pal-KLLK-NH₂ (L – leucyna) – zwłaszcza dwa ostatnie o obiecującym działaniu eradykującym próbowano także sprzęgać z biodegradowalnymi polimerami (PLACO – Poly(lactic acid castrol oil) oraz P(SARA) – Ricinoleic acid based poly(ester-anhydride)) celem uzyskania przeciwbakteryjnych środków terapeutycznych o przedłużonym działaniu, stosowanych miejscowo w infekcjach jamy ustnej – z obiecującymi wynikami, niewątpliwie wymagającymi potwierdzenia w dalszych badaniach [19].

5.2. Peptydomimetyki

Termin peptydomimetyk jest pojęciem szerokim i obejmuje właściwie każdą, dowolną sekwencję zaprojektowaną w celu naśladowania struktury i/lub

funkcji naturalnych AMP, ale której szkielet nie opiera się wyłącznie na α-aminokwasach; peptydomimetykami mogą więc być zarówno półsyntetyczne analogi, jak i w pełni syntetyczne cząsteczki. Ich synteza jako środków przeciwdrobnoustrojowych zakłada przede wszystkim rozwiązanie problemu degradacji proteolitycznej, która dotyczy niemalże wszystkich lipopeptydów oraz AMP [20, 22, 35, 43, 77]. Możliwości i sposoby syntezy znacząco różnią się zależnie od pomysłu na uzyskanie konkretnych właściwości peptydomimetyku. Choć związki należące do tej grupy, uzyskane odmiennymi metodami, wykazują podobną aktywność przeciwbakteryjną czy przeciwgrzybiczą, to cechują się one zupełnie odrębną strukturą, która warunkuje uzyskanie różnych właściwości; zarówno korzystnych, jak i niepożądanych. Nieustannie opracowywane są nowe związki o unikatowej strukturze, stąd tak duża różnorodność w obrębie peptydomimetyków. W tej grupie lipopeptydów wyróżnić możemy m.in. oligoacylilizyny, lipo-α- i -γ-AA-peptydy, peptoidy, poliamidy czy arylamidy, którym poświęcono już немало doniesień naukowych [22, 27, 28, 43, 66]. Nie sposób omówić wszystkich wymienionych w niniejszej pracy, dlatego zaprezentowane zostaną jedynie dwie pierwsze grupy związków.

Oligoacylilizyny, czy też oligomery acylowanej lizyny (Oligoacyllisines – OAK), są to liniowe cząsteczki złożone z naprzemiennie ułożonych łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz kationowych aminokwasów. Ułożenie w taki sposób zapobiega tworzeniu się struktury drugorzędowej. Ze względu na podstawową strukturę, OAK można podzielić na dwie kategorie, zależnie od rodzaju tzw. bloku występującego w strukturze: α lub β. Na blok α składa się sekwencja amino-X-lizyna, natomiast na blok β: lizyna-amino-X-lizyna, gdzie w miejscu X występuje reszta kwasu tłuszczowego o odpowiedniej ilości atomów węgla. Przykładem OAK z grupy α jest C₁₂K-7α₈. Zapis ten oznacza, że do reszty kwasu laurynowego (C₁₂) i aminokwasu lizyny (K) dołączony jest właśnie blok α w siedmiu powtórzeniach (7α₈, gdzie 7 oznacza liczbę bloków α, 8 – liczbę atomów węgla w łańcuchu acylowym dołączonym do lizyny). [23, 71]. Ponieważ analogi uzyskane w ten sposób nie są małymi cząsteczkami, wielu badaczy syntetyzuje także znacznie krótsze pochodne, niepozbawione aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jak chociażby przedstawiciel grupy β: C₁₂(ω₇)K-β₁₂. W skład tego związku wchodzi jedynie 3 reszty lizyny oraz 2 reszty kwasu tłuszczowego (C₁₂(ω₇) symbolizuje resztę kwasu dodekanowego z podwójnym wiązaniem przy węglu siódmym) [22, 23, 73]. Oczywiście syntetyzowanych związków zaliczanych do tych kategorii jest sporo i każdy z nich podlega wielokrotnej i wnikliwej analizie pod kątem mechanizmów działania, właściwości przeciwbakteryjnych, farmakokinetyki czy potencjalnej toksyczności,

a różnice pomiędzy poszczególnymi analogami są często niewielkie. Przytoczony powyżej związek $C_{12}(\omega_7)$ -K- β_{12} w stężeniach subinhibicyjnych szybko wywołuje efekt depolaryzacji atakowanej błony, pozbawiając bakterie przede wszystkim działania pompy protonowej, niezbędnej do aktywnego wypompowywania substancji z cytoplazmy (*efflux pump*). Jest to jeden z wielu znanych mechanizmów oporności mikroorganizmów, polegający na aktywnym usuwaniu z komórki różnych związków, w tym leków i antybiotyków, i przez to uniemożliwianiu ich działania. Skoro efektem działania tych związków jest depolaryzacyjny wpływ na potencjał błony komórkowej, to mogą one okazać się niezwykle skutecznymi środkami do osiągnięcia selektywnej kontroli proliferacji komórek drobnoustrojów i jednocześnie zaburzać wiele procesów, których siłą napędzającą jest pompa protonowa. Przede wszystkim jest ona kluczowym źródłem energii niezbędnym do działania pompy błonowej, stąd powstawanie oporności wykorzystującej mechanizm aktywnego wypompowywania może zostać niemal całkowicie zlikwidowane. Największą zaletą OAK może okazać się możliwość uwrażliwiania komórek prokariotycznych (przede wszystkim bakterii Gram-ujemnych) np. na erytromycynę czy ryfampicynę [23, 31, 32, 43]. Choć szczegółowy mechanizm depolaryzacji spowodowanej wpływem OAK nie jest jeszcze dokładnie poznany, uważa się, że te peptydomimetyki mogą skutecznie zwiększyć dostęp antybiotyków do cytoplazmy, wspomagając w ten sposób ich prawidłowe działanie i w efekcie doprowadzać do zahamowania wzrostu bakterii [22, 23, 31, 43]. Co istotne, badania nad farmakokinetyką tych związków wykazały, że do osiągnięcia pożądaných efektów depolaryzacji i wymaganych w tym celu stężeń OAK *in vivo* (model myszy) zupełnie wystarczające mogą okazać się podania podskórne [23]. Obecnie wykorzystanie oligoacylolizyn uznawane jest za bardzo dobre i obiecujące podejście poszerzania raptownie kurczących się możliwości walki za pomocą antybiotyków z bakteriami Gram-ujemnymi [23, 31, 43, 71].

Wspomnieć też należy o podobnej strategii działania synergistycznego także innych substancji z peptydomimetykiem – ale w stężeniach znacznie niższych, niż MIC dla samego lipopeptydu. Szereg bardziej szczegółowych badań peptydomimetyków wykazał, że istnieje możliwość, że związki te właśnie w stężeniach poniżej wartości MIC uwrażliwiają komórki bakteryjne nie tylko na działanie antybiotyków, jak opisano powyżej, ale również na działanie wrodzonych mechanizmów obronnych, włączając w to naturalnie występujące w osoczu ludzkim AMP, jak lizozym czy defensyny. Obecnie uważa się, że mechanizmy działania naturalnych AMP obecnych w organizmie (a nie podawanych zewnątrz) są mocno niedocenione i wielu badaczy zwraca uwagę na konieczność przyjrzenia się

im i opracowywania metod i związków, które mogłyby wzmacnić lub umożliwić ich działanie – jak najprawdopodobniej peptydomimetyki [14, 32].

Drugą omawianą i równie unikatową grupą peptydomimetyków są lipidowane AA-peptydy. Projekt, podobnie jak w innych lipopeptydach, zakłada połączenie hydrofobowej reszty kwasu tłuszczowego z hydrofilową częścią peptydową o ładunku dodatnim, celem uzyskania cząsteczki o właściwościach amfipatycznych. Różnica polega na wykorzystaniu AA-peptydów jako ugrupowania peptydowego. Strukturalnie AA-peptydy stanowią oligomery, złożone z tak zwanych bloków budujących. Każdy blok opiera się na szkielecie kwasu peptydonukleinowego (PNA), czyli polinukleotydowego analogu DNA i RNA, wykazującym chiralność i zawierającym reszty N-acetylo-N-aminoetyloaminokwasów. Do szkieletu dołączona jest boczna grupa funkcyjna (lub kilka), identyczna, jak w peptydzie, które dany AA-peptyd naśladuje pod względem budowy i funkcji. Peptydy te można podzielić na kategorie: α i γ zależnie od pozycji łańcucha bocznego; syntezuje się i bada także cykliczne-AA-peptydy. AA-peptydy są znaną grupą związków, cechującą się przede wszystkim opornością na degradację proteolityczną, stąd zainteresowanie tymi cząsteczkami jako możliwymi terapeutykami, również takimi, które mogłyby działać przeciwdrobnoustrojowo [27, 28, 42, 66]. Dołączenie reszty kwasu tłuszczowego również w przypadku tych cząsteczek skutkuje poprawą aktywności przeciwbakteryjnej [66]. Naśladowanie struktury, funkcji i mechanizmu działania AMP, a także stabilność cząsteczki, odporność na proteolizę i nieograniczona możliwość wprowadzania modyfikacji czynią z AA-peptydów bardzo atrakcyjną matrycę do syntezy nowoczesnych związków przeciwbakteryjnych. Dodatkowo, ich aktywność biologiczna może być łatwo zmieniana i wzmacniania dzięki wprowadzaniu szeregu dodatkowych grup hydrofobowych i kationowych [28, 42, 43, 69, 72].

Przykładowo, lipo- α -AA-peptydy poddano badaniom i okazało się, że krótkie dimery tych lipopeptydów wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Dodanie do dimeru kolejnego bloku i utworzenie trimeru nadaje aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, a dodanie jeszcze jednego i powstanie cząsteczki tetramerowej – poszerzenie spektrum działania przeciwko tym bakteriom oraz wyższą aktywność [27, 43, 72]. Udowodniono przy tym, że najpierw musi zostać osiągnięty pewien stopień hydrofobowości, aby umożliwić aktywność przeciwdrobnoustrojową; hydrofobowość zwiększa zarówno obecność reszt kwasów tłuszczowych, jak i przyłączanie kolejnych cząsteczek do oligomerów. Jak we wszystkich lipopeptydach, acylacja i wzrost hydrofobowości znacząco podwyższa aktywność antibakteryjną oraz spektrum działania

związków, w tym przypadku w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (dla Gram-dodatnich spektrum nie jest poszerzane) [27, 43, 72].

Obie kategorie omawianych lipo-AA-peptydów (α i γ) wykazują podobny mechanizm działania, z błoną komórkową jako celem, nie różni się też między nimi znacząco spektrum działania. Wyjątek stanowią anionowe analogi lipo- γ -AA-peptydów; podczas gdy kationowe wykazują szerokie i porównywalne spektrum przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, związki anionowe okazały się zupełnie pozbawione działania przeciwbakteryjnego. Prawdopodobnie jest to skutek braku oddziaływań elektrostatycznych tych związków z bakteryjną membraną komórkową także posiadającą ładunek ujemny. Grupa γ -AA-peptydów po koniugacji z nienasyconym ogonem kwasu tłuszczowego wykazuje również potencjalnie mniejszą skłonność do agregacji oraz zmniejszoną aktywność hemolityczną w stosunku do ludzkich erytrocytów, jak również wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż grupa α -AA-peptydów, pomimo zbliżonego spektrum działania przeciwbakteryjnego. Najprawdopodobniej analogi γ wykazują działanie opierające się na mechanizmie dywanowym lub dywanopodobnym. Selektywnie permeabilizują błonę i strukturalnie ją modyfikują, prowadząc do opisywanego wcześniej efektu utraty potencjału błonowego, wycieku substancji wewnątrzkomórkowych i śmierci komórki. Zaobserwowano, że błony ssaczych komórek o wypadkowym ładunku obojętnym, zawierające cholesterol, nie są praktycznie wcale atakowane przez te lipopeptydy, co prawdopodobnie jest przyczyną względnie wysokiej selektywności i niskiej toksyczności [42, 43, 72]. W omawianej grupie peptydomimetyków oprócz lipo- γ -AA-peptydów znajduje się także wiele związków modyfikowanych w inny sposób, na przykład sulfonowanych (sulfono- γ -AA-peptydy). Bardzo dobrze naśladują one działanie magainin, posiadając szersze spektrum aktywności i większą odporność na degradację proteolityczną [20, 72].

Wadą omawianych związków jest skomplikowany proces produkcji – lipo-AA-peptydy są długimi cząsteczkami, wymagającymi wieloetapowej syntezy, co wiąże się również z dość wysokimi kosztami [37, 45]. Z tego powodu badano również krótkie peptydomimetyki, uzyskane poprzez hydrolizę gotowych lipo-AA-peptydów kategorii α i γ , zawierających najczęściej 1 blok lipo- γ -AA-peptydu i resztę lizyny – okazały się one aktywne np. w stosunku do szczepów MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), MRSE (Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli* (MIC od 2 do 5 $\mu\text{g/ml}$) [43].

Cykliczne lipo-AA-peptydy z kolei zostały zaprojektowane w celu dalszej poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Z założenia powinny one wykazy-

wać wyższą aktywność przeciwko mikroorganizmom od liniowych analogów z uwagi na sztywniejszą, a więc i stabilniejszą strukturę amfipatyczną. Rezultaty wstępnych badań potwierdziły tę hipotezę – cykliczne związki okazały się być skuteczne wobec szeregu szczepów wieloopornych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [43, 72]. Próbuje się je także stosować wobec biofilmu, m.in. *S. epidermidis* czy *P. aeruginosa* z obiecującymi wynikami [69]. Imitują one AMP również pod względem właściwości modulowania układu odpornościowego [43, 69, 72]. Niestety, są przy tym również znacznie bardziej hemolityczne [43].

Bada się także między innymi AA-peptydy o strukturze heliakalnej, jak również różne kombinacje połączeń tych związków ze sobą, których wstępne wyniki badań także są obiecujące [72].

Podsumowując, lipo-AA-peptydy z szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, zwiększoną stabilnością cząsteczki i nieograniczonymi możliwościami modyfikacji struktury oraz funkcji są kolejnymi kandydatami na potencjalnie środki terapeutyczne przeciwko patogenom wieloopornym [43, 69, 77].

Dzięki względnie łatwej syntezie większości peptydomimetyków oraz łatwości modyfikowania ich struktury, wraz z opornością na działanie proteaz są one atrakcyjnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi nakierowanymi na membranę bakteryjną [20, 43, 77].

5.3. Multiwaleentne lipopeptydy

Grupa multiwaleentnych lipopeptydów jest z pewnością najbardziej różnorodną z wymienianych w tym podziale. Cechą wspólną tej grupy jest proces oligomeryzacji czy też koniugacji kolejnych nowo powstałych peptydów i lipopeptydów ze sobą, celem poprawienia właściwości i osiągnięcia lepszej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, idących w parze ze zminimalizowaną cytotoxycznością i aktywnością hemolityczną w stosunku do ludzkich krwinek czerwonych [7, 43].

Defensyny, posiadające przede wszystkim zdolność powodowania szybkiej śmierci komórek bakterii, a także szerokie spektrum działania i niski odsetek generowanych szczepów opornych (*in vitro*), niejednokrotnie stanowią strukturę wyjściową do syntezy nowych związków. Podczas syntezy multiwaleentnych lipopeptydów badacze postanowili wykorzystać analogi C-końcowego fragmentu ludzkiej defensyny 3, składającego się z 10 reszt aminokwasowych jako aktywną sekwencję lub rusztowanie dla dalszych multiwaleentnych modyfikacji za pomocą reszt lizyny [6, 7, 43, 48]. Przykładowo, powstały związek B2088 (dimer) również cechuje się zdolnościami szybkiego zabijania, wykazuje obiecującą selektywność w stosunku do błon bakteryjnych, a narastanie wobec niego oporności jest znikome. Dla wzmożenia aktywności przeciwbakteryjnej

oczywiście zastosowano koniugację N-końca z dwiema resztami kwasu tłuszczowego, dzięki której osiągnięto pożądaną interakcję z bakteryjnym LPS. Dimery sprzęgano z resztami kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha węglowego (8 do 16 atomów), uzyskując zadowalające efekty przeciwko bakteriom Gram-ujemnym w przypadku związków zawierających reszty kwasów kaprylowego (o długości 8 atomów węgla – Kapr lub C_8) i kaprynowego (o długości 10 atomów węgla – C_{10}). Jednocześnie porównano wpływ oligomeryzacji i wykazano znacznie słabszą aktywność N-lipidowanych monomerów. Hemoliza nie była obserwowana dla żadnego syntezowanego związku [7, 43, 45], podobnie cytotoksyczność [7]. Badacze doszli do wniosku, że przyłączanie reszt kwasów tłuszczowych również do tego typu cząsteczek znacząco wpływa na poprawę aktywności przeciwbakteryjnych, choć użycie kwasów tłuszczowych posiadających w łańcuchu więcej niż czternaście atomów węgla skutkuje obniżeniem tej aktywności. Obserwowano także zwiększoną tendencję do autoagregacji wraz z dalszym wydłużaniem łańcucha kwasu tłuszczowego i w efekcie niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ostatecznie najlepszym związkiem otrzymanym w ten sposób okazał się C_8 -B2088; uzyskano wysoką aktywność przeciwbakteryjną, najwyższą selektywność, zdolność szybkiego zabijania bakterii oraz świetną biokompatybilność. Lipopeptyd ten wykazywał również synergizm działania z konwencjonalnymi antybiotykami [7, 43, 45, 48].

W ramach badań nad możliwością działania przeciwko bakteryjnemu lipopolisacharydowi zsyntezowano związki nazwane multiwalentnymi β -bumerangami (β -Boomerangs). Są to peptydy przyjmujące właśnie bumerangopodobną konformację β -kartki w kompleksie z LPS [10, 43, 62]. N-końce tych peptydów acylowano kwasem butanowym i oktanowym, a część łańcucha zastąpiono resztą cysteiny i wytworzono multiwalentne β -bumerangi połączone mostkiem dwusiarczkowym. Zainteresowano się następnie zarówno wpływem długości łańcucha kwasu tłuszczowego; badanie wykazało podobną aktywność wszystkich analogów wobec bakterii Gram-ujemnych, jednak tylko związki posiadające resztę kwasu tłuszczowego zbudowaną z ośmiu atomów węgla wykazują działanie wobec bakterii Gram-dodatnich. Zaobserwowano, że nie bez znaczenia jest także obecność aminokwasów aromatycznych w strukturze – przy zamianie aminokwasów na niearomatyczne całkowicie utracono właściwości przeciwbakteryjne. Okazało się, że kluczowym w neutralizacji LPS jest jego ścisłe dopasowanie ze strukturą β -bumeragu, możliwe dzięki zastąpieniu aminokwasów alifatycznych na aromatyczne w omawianych związkach [10, 63]. Potwierdzono również po raz kolejny niezwykle korzystny wpływ acylacji na poprawę działania przeciwdrobnoustrojowego [10, 43, 63].

W innych badaniach również wykorzystano tworzenie wiązania dwusiarczkowego pomiędzy dimerami – ale homo- i hetero-dimerami peptydowych N-końcowych analogów laktoferyny oraz różnych krótkich lipopeptydów zawierających ornitynę i resztę kwasu tłuszczowego o długości dwunastu atomów węgla. Otrzymane związki wykazały wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, a także wobec grzybów (choć nie wobec np. *Candida albicans*). Większa część homodimerów nie cechowała się lepszymi właściwościami, niż odpowiadające im monomery – w przeciwieństwie do heterodimerów, które okazały się znacznie atrakcyjniejszymi związkami. Heterodimery N-końcowej pochodnej laktoferyny z krótkim lipopeptydem zawierającym ornitynę wykazywały znacząco wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż pozostałe dimery i monomery, jednocześnie wykazując najniższą aktywność hemolityczną wobec erytrocytów ludzkich [40, 43].

Badacze zajmują się także syntezowaniem dendrymerów. Można je podzielić na dwie kategorie, zależnie do ilości rozgałęzień amfifilowych: A i B. Grupa A zawiera ich znacznie więcej, podczas gdy kategoria B składa się z większej ilości lipofilnych struktur liniowych. Zarówno związki klasyfikowane jako A, jak i B lipiduje się z użyciem głównie reszt kwasów tłuszczowych o długości ośmiu lub dwunastu atomów węgla. Działania te w przypadku cząsteczek zawierających resztę kwasu laurynowego doprowadziły do poprawy właściwości przeciwbakteryjnych oraz zwiększenia selektywności w stosunku do różnych szczepów *Candida*; długość łańcucha reszty kwasu tłuszczowego nie wpływała na aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich ani Gram-ujemnych (we wszystkich syntetykach aktywność ta była identyczna). Szczegółowe analizy aktywności tych związków wykazały, iż śmierć grzybów następuje wskutek wpływu jonów potasu z wnętrza ich komórek, ale jednocześnie zaobserwowano także ich hamujący wpływ na aktywność syntazy β -(1,3)-glukanowej *Candida*, zależny od stężenia dendrymeru w miejscu docelowym [34, 43].

5.4. Lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową

Lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową (Hydrocarbon-Stapled Lipopeptides – HSLP) stanowią stosunkowo nową i obiecującą grupę związków. Unikalna struktura opiera się na „zszyciu” węglowodorowym, obejmującym reakcję podwójnej wymiany i zamknięcia pierścienia (Ring-Closing Metathesis – RCM) i utworzenia związku cyklicznego. Zachodzi ona pomiędzy dwoma α -podstawnikami niewystępujących naturalnie aminokwasów, zawierających nierozgałęzione łańcuchy boczne z grupami olefinowymi

w konkretnych pozycjach [37, 43]. Pozycje te są ważne, ponieważ warunkują możliwość zajścia katalitycznej reakcji cyklizacji, czyli właśnie spięcia węglowodorowego [37]. Upraszczając, dochodzi do formowania wiązania kowalencyjnego pomiędzy łańcuchami bocznymi lipopeptydów [37, 57]. Taka modyfikacja znacząco stabilizuje i usztywnia strukturę peptydu, konformację oraz potencjalnie wzmacnia oporność na degradację proteolityczną i aktywność przeciwdrobnoustrojową peptydu. Może to w efekcie również wpływać korzystnie na oddziaływanie z docelową błoną i być może wydłużać biologiczny czas półtrwania lipopeptydu [37, 43, 57]. Do reakcji tej używa się różnych lipopeptydów o poznanej strukturze, tworząc nowe lipopeptydy cykliczne [43]. Porównano działanie nowo powstałych analogów usztywnionych kłamrą węglowodorową z aktywnością lipopeptydów stanowiących strukturę wyjściową, użytą do ich syntezy. Porównanie to wykazało, że wszystkie wymienione związki wykazują zbliżone spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich, oddziałując z błoną zewnętrzną, a następnie permeabilizując błonę wewnętrzną patogenu. Żaden jednak nie wykazywał działania przeciwko Gram-ujemnym patogenom [37].

Co ciekawe, technika usztywniania za pomocą kłamry węglowodorowej nie jest nowa; stosowana jest już od dłuższego czasu zwłaszcza przy opracowywaniu terapeutyków stosowanych np. w onkologii, dietetyce, kardiologii czy terapii zakażeń HIV, głównie z uwagi właśnie na korzyści polegające na poprawie stabilności, oporności na degradację proteolityczną oraz podwyższeniu aktywności biologicznej tak powstałych związków. Pod względem chemicznym, spięcie może zachodzić nie tylko poprzez „szycie” węglowodorowe, ale także triazolowe, azobenzenowe, tiolowe, laktamowe czy tioeterowe – a każde z nich generować będzie zupełnie odmienne właściwości, stabilność cząsteczki i bioaktywność. Zainteresowanie tą techniką nastąpiło, kiedy zaobserwowano, że usztywnione za pomocą kłamry cząsteczki wpływają na interakcje białek w komórkach docelowych, na przykład nowotworowych, w efekcie hamując różne proteiny. Opisywane jest zakłócanie za pomocą omawianych związków np. działania rodziny białek Bcl-2, β -kateniny, hormonów (m.in. estrogenu) czy też różnych czynników transkrypcyjnych [29, 57].

Na dzień dzisiejszy kierunek ten nie wydaje się być mniej atrakcyjnym od innych strategii obieranych w poszukiwaniu nowych, skutecznych i bezpiecznych środków do walki z drobnoustrojami.

5.5. Lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach laboratoryjnych

Wiele ośrodków i zespołów badawczych, zarówno polskich jak i światowych, wykazało ogromne zainteresowanie lipopeptydami potwierdzając, poprzez wyniki

swoich badań prowadzonych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, wysoki potencjał przeciwdrobnoustrojowy tej grupy związków.

Dawgul i wsp., analizowali aktywność przeciwdrobnoustrojową lipopeptydów w odniesieniu do szczepów klinicznych gronkowca złocistego. Jak pisze Dawgul, możliwość zastosowania krótkich lipopeptydów w zakażeniach skóry powodowanych przez *Staphylococcus aureus* byłoby świetną opcją terapeutyczną. Lipopeptydy cechują również dobre właściwości powierzchniowo czynne, co dodatkowo daje możliwość zastosowania ich jako emulgator czy konserwant w preparacie leczniczym.

Materiał badawczy stanowiły szczepy kliniczne *S. aureus* pochodzące od pacjentów z zapaleniem mieszków włosowych, czyrącznością i atopowym zapaleniem skóry, 5 syntetycznych lipopeptydów (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂, Pal-KG-NH₂ oraz Pal-KGK-NH₂) oraz antybiotyki konwencjonalne (chloramfenikol, erytromycyna, penicylina G i wankomycyna). Wyniki badań wykazały skuteczność analizowanych związków w odniesieniu do zastosowanych w pracy mikroorganizmów, nie wykazując zróżnicowania ich aktywności pomiędzy szczepami. Istotnym wydaje się wykazana przez autorów pracy aktywność lipopeptydów w odniesieniu do szczepów opornych na erytromycynę, penicylinę i chloramfenikol. Wysoką aktywność wykazano dla lipopeptydu Pal-KK-NH₂ [16]. Warto dodać, że badane lipopeptydy charakteryzowały właściwości bakteriobójcze w stężeniach równych lub dwukrotnie wyższych aniżeli ich MIC w odniesieniu do analizowanych szczepów [16].

Dawgul i wsp. oceniali również wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych, w tym również lipopeptydów Pal-KK-NH₂ i Pal-RR-NH₂, na proces adhezji i tworzenia biofilmu oraz jego eradykacji. Do analizy wybrano szczep wzorcowy *C. albicans* (ATCC 10231), a jako biomateriał posłużył silikonowy cewnik Foley'a. Zastosowane lipopeptydy wykazywały zdolność do eradykacji biofilmu, były aktywne już w stężeniach niższych aniżeli ich wartość MIC. Dla porównania warto dodać, że nystatyna aktywna była dopiero w stężeniu odpowiadającym czterokrotności wartości MIC. Analizując wpływ peptydów na proces zapobiegania tworzenia biofilmu jak i eradykacji jego dojrzałych struktur, oba peptydy były skuteczne w stężeniach poniżej wartości MIC. W przypadku peptydu Pal-RR-NH₂ były to stężenia wielokrotnie niższe aniżeli wartość MIC [17].

Aktywność przeciwgrzybiczą lipopeptydu Pal-KK-NH₂ w odniesieniu do grzybów drożdżopodobnych, oceniali również Kamysz i wsp. Do analizy wybrano zarówno szczepy kliniczne (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*) jak i wzorcowe, a do porównania skuteczności lipopeptydu

– tradycyjne leki przeciwgrzybicze (flukonazol, amfoterycyna B, kapsoufungina). Autorzy pracy wykazali synergistyczne oddziaływanie między lipopeptydem, a tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi, szczególnie z kapsoufunginą. Jak zaznaczają autorzy pracy, wykazany synergizm może okazać się w przyszłości dobrą opcją terapeutyczną do leczenia inwazyjnych zakażeń o etiologii grzybiczej [39].

Barchiesi i wsp. analizowali również aktywność wspomnianego wcześniej peptydu Pal-KK-NH₂ wobec izolatów *Cryptococcus neoformans*. Analizie poddano 14 szczepów pochodzących z płynu mózgowo rdzeniowego i krwi. Wszystkie badane szczepy wykazywały wrażliwość na amfoterycynę B i flukonazol. Zespół badawczy wykazał synergistyczne oddziaływanie lipopeptydu z amfoterycyną B dla 3 analizowanych szczepów i znacznie szybsze, niż w przypadku amfoterycyny B, działanie grzybobójcze w stosunku do jednego szczepu. Odnotowano aktywność grzybobójczą lipopeptydu Pal-KK-NH₂ po 24 godzinach inkubacji. Uzyskane wyniki pozwalają wysunąć wniosek, że Pal-KK-NH₂ może w przyszłości stanowić dobrą alternatywę w terapii zakażeń wywołanych przez *C. neoformans* [9].

Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze krótkich syntetycznych lipopeptydów analizowali również Greber i wsp. Aktywność przeciwdrobnoustrojową wybranych związków, różniących się między sobą m.in. długością łańcucha kwasu tłuszczowego, oceniali w odniesieniu do szczepów wzorcowych, bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Wyniki uzyskane przez autorów pracy wskazują na wysoką aktywność przeciwbakteryjną, zarówno bakteriostatyczną jak i bakteriobójczą, lipopeptydu zawierającego w swojej strukturze resztę kwasu palmitynowego. Aktywność ta była zdecydowanie wyższa w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Silny efekt bakteriostatyczny wykazano dla analogów z więcej niż jednym zasadowym aminokwasem (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂, Pal-KKKK-NH₂, Pal-KGK-NH₂ i Pal-KGKG-NH₂), w przeciwieństwie do lipopeptydów z jednym aminokwasem (Pal-K-NH₂ i Pal-KG-NH₂). Lipopeptydy modyfikowane kwasem mirystynowym cechowały się wysoką aktywnością bakteriostatyczną wobec *Bacillus subtilis* i *S. epidermidis*, natomiast modyfikowane kwasem laurynowym – niską aktywnością wobec analizowanych w pracy szczepów. Zróżnicowaną aktywność odnotowano dla lipopeptydów z dwiema i trzema resztami lizyny (Laur-KK-NH₂, Laur-KKK-NH₂; C12/Laur – reszta kwasu laurynowego o długości 12 atomów węgla). Lipopeptydy modyfikowane kwasem kaprynowym wykazywały niską aktywność przeciwbakteryjną lub zupełny jej brak. Aktywność przeciwgrzybiczą wykazano dla Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂ i Pal-KKKK-NH₂. Spośród analogów kwasu palmitynowego najniższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazano dla lipopeptydów z jedną resztą lizyny

– Pal-K-NH₂. Różną aktywnością przeciwgrzybiczą wykazywały lipopeptydy modyfikowane kwasem mirystynowym. Wykazano, że w tych samych stężeniach są one aktywne wobec *C. albicans*, *C. tropicalis* i *Aspergillus brasiliensis*. Lipopeptydy modyfikowane kwasem kaprynowym wykazywały brak aktywności wobec grzybów *Candida* i *A. brasiliensis* [24].

Autorzy pracy, oprócz oceny przeciwdrobnoustrojowej lipopeptydów, zbadali również ich właściwości hemolityczne. Lipopeptydy, modyfikowane kwasem palmitynowym, powodowały silną hemolizę erycytów. Wysoką toksyczność wykazano dla pochodnych palmitynowych z resztą lizyny (Pal-KK-NH₂, Pal-KKK-NH₂ i Pal-KKKK-NH₂) [24].

Aktywność syntetycznych lipopeptydów wobec biofilmu bakteryjnego również była przedmiotem badań. Mikroorganizmy tworzące strukturę biofilmu charakteryzują się dużo większą opornością na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym aniżeli ich odpowiedniki planktonowe. Stale poszukuje się więc nowych preparatów, które wykazywałyby aktywność w odniesieniu do takiej struktury. Dałoby to możliwość, z jednej strony, eradykacji biofilmu, a co za tym idzie szybszą i bardziej skuteczną terapię zakażeń przebiegających z wytworzeniem jego struktur. Z drugiej zaś, dałoby możliwość zapobiegania tworzeniu tej odpornej na preparaty przeciwdrobnoustrojowej struktury.

Min i wsp. analizowali aktywność i stabilność cyklicznego syntetycznego lipopeptydu CLP-4 (CLP-4 – cyclic lipopeptide 4; analog fusarycydiny) w odniesieniu do *Streptococcus mutans* – zarówno komórek planktonowych, jak i w strukturze biofilmu. Dodatkowo autorzy pracy ocenili wpływ poddanego analizie lipopeptydu na komórki ludzkie. Badacze wykazali, że lipopeptyd działał bakteriobójczo w odniesieniu do *S. mutans* i wykazywał zależną od stężenia szybkość zabijania, doprowadzając do lizy komórek tylko w wyższych stężeniach. Lipopeptyd charakteryzował się wysoką aktywnością wobec biofilmu. Autorzy pracy sugerują, że peptyd CLP-4 może mieć różny mechanizm działania, zależny w pewien sposób od jego stężenia. Przy niskich stężeniach peptyd najprawdopodobniej zakłóca niektóre procesy komórkowe niezbędne do wzrostu mikroorganizmu, przy wysokich zaś zabija komórki bakteryjne przez uszkodzenie ich błony komórkowej. Co ważne, CLP-4 wykazywał również aktywność wobec biofilmu dojrzałego. Badając wpływ lipopeptydu wobec dojrzałego biofilmu wykazano zależne od stężenia zmniejszenie żywotności *S. mutans*. Autorzy pracy podkreślają, że analizowany peptyd charakteryzował się silną aktywnością bakteriobójczą, zarówno na komórki planktonowe i te w strukturze biofilmu. Dodatkowo, co warto podkreślić, wykazywał stabilność i niską cytotoxyczność w odniesieniu do ludzkich komórek. Jak podkreślają autorzy pracy, lipo-

peptyd CLP to nowy peptyd przeciwdrobnoustrojowy z możliwością zastosowania go w przyszłości zarówno w profilaktyce, ale także leczeniu próchnicy [58].

Cirioni i wsp. analizowali aktywność lipopeptydów w połączeniu z wankomycyną w odniesieniu do gronkowca złocistego, zarówno wobec form planktonowych jak i biofilmu. Materiał do analizy stanowiły krótkie lipopeptydy (Pal-Lys-Lys-NH₂, Pal-Lys-Lys) oraz wankomycyna, a głównym celem pracy była ocena aktywności analizowanych związków na szczurzym modelu infekcji wywołanej przez gronkowca złocistego. Wyniki badań w stosunku do planktonowych komórek *S. aureus* wykazały synergizm przy zastosowaniu wankomycyny w połączeniu z lipopeptydem. Wszystkie badane związki charakteryzowały się zbliżoną aktywnością, natomiast stosowanie wszystkich lipopeptydów w skojarzeniu z wankomycyną poprawiło ich skuteczność. Najsilniejsze działanie wykazano w przypadku połączenia Pal-Lys-Lys-NH₂ z wankomycyną [13].

6. Podsumowanie

Ciągle rosnąca liczba wieloopornych mikroorganizmów znacznie utrudnia terapię zakażeń, szczególnie tych ciężkich i zagrażających życiu pacjenta. Jak pokazuje literatura, syntetyczne lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą stać się bardzo dobrą alternatywą w terapii takich zakażeń i to z nimi obecnie wiąże się nadzieje w kontekście walki z organizmami wieloopornymi [43]. Istotnym wydaje się szerokie spektrum działania tych związków i ich synergistyczne oddziaływanie w połączeniu z antybiotykami konwencjonalnymi, szczególnie z tymi z utrudnionym dotarciem do wnętrza komórki bakteryjnej. Podejmowane próby modyfikowania lipidów i pozyskania nowych dają nadzieję, na zastosowanie ich w przyszłości w monoterapii, jak i w terapii skojarzonej. Do rozwiązania nadal pozostaje problem bezpieczeństwa potencjalnego stosowania lipopeptydów w praktyce klinicznej ze względu na ich możliwą cytotoksyczność jak i właściwości hemolityczne.

Piśmiennictwo

- Avrahami D., Shai Y.: A new group of antifungal and antimicrobial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 279, 12277–12285 (2004)
- Avrahami D., Shai Y.: Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: A plausible mode of action. *Biochemistry-US*, 42, 14946–14956 (2003)
- Avrahami D., Shai Y.: Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly and cell selectivity. *Biochemistry-US*, 41, 2254–2263 (2002)
- Azmi F, Elliot A.G., Marasini N., Ramu S., Ziara Z., Kavanagh A.M., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A., Skwarczynski M., Toth I.: Short cationic lipopeptides as effective antibacterial agents: Design, physicochemical properties and biological evaluation. *Bioorgan. Med. Chem.* 24, 2235–2241 (2016)
- Bahar A.A., Ren D.: Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6, 1543–1575 (2013)
- Bai Y., Liu S.P., Jiang P., Zhou L., Li J., Tang C., Verma C., Mu Y.G., Beuerman R.W., Pervushin K.: Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin. *Biochemistry-US*, 48, 7229–7239 (2009)
- Bai Y., Liu S.P., Li J.G., Lakshminarayan R., Sarawathi P., Tang C., Ho D.C., Verma C., Beuerman R.W., Pervushin K.: Progressive Structuring of a Branched Antimicrobial Peptide on the Path to the Inner Membrane Target. *J. Biol. Chem.* 287, 26606–26617 (2012)
- Barańska-Rybak W., Pikuła M., Dawgul M., Kamysz W., Trzonkowski P., Roszkiewicz J.: Safety profile of antimicrobial peptides: Camel, Citropin, Protegrin, Temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. *Acta. Pol. Pharm.* 70, 795–801 (2013)
- Barchiesi F., Giacometti A., Cirioni O., Arzeni D., Silvestri C., Kamysz W., Abbruzzetti A., Riva A., Kamysz E., Scalise G.: *In vitro* activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH(2) alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Peptides*, 28, 1509–1513 (2007)
- Bhunia A., Mohanram H., Domadia P.N., Torres J., Bhattacharjya S.: Designed beta-Boomerang Antiendotoxic and Antimicrobial peptides. Structures and activities in lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 284, 21991–22004 (2009)
- Błażewicz I., Jaśkiewicz M., Piechowicz L., Kamysz W., Nowicki R., Barańska-Rybak W.: Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w wybranych dermatozach. *Przegl. Dermatol.* 103, 227–232 (2016)
- Catiau L., Traisnel J., Delval-Dubois V., Chihib N.E., Guillochon D., Nedjar-Arroume N.: Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, 32, 633–638 (2011)
- Cirioni O., Scalise G. i wsp.: The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides*, 28, 1299–1303 (2007)
- Citterio L., Franzyk H., Palarasah Y., Andersen T.E., Mateiu R.V., Gram L.: Improved *in vitro* evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptidomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* 167, 72–82 (2016)
- Cochrane A.S., Findlay B., Bakhtiary A., Acedo J.Z., Rodriguez-Lopez E.M., Mercier P., Vederas J.C.: Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A1 selectively binds to Gram-negative lipid II. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 11561–11566 (2016)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Nowicki R., Łukasiak J., Kamysz W.: Aktywność przeciwbakteryjna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia Astma Immunologia*, 16, 31–36 (2001)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na biofilm *Candida*. *Alergia Astma Immunologia*, 15, 220–225 (2010)
- Dawgul M., Maciejewska M., Jaskiewicz M., Karafova A., Kamysz W.: Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta. Pol. Pharm.* 71, 39–47 (2014)

19. Eckhard L.H., Houry-Haddad Y., Sol A., Zeharia R., Shai Y., Beyth S., Domb A.J., Bachrach G., Beyth N.: Sustained release of Antibacterial Lipopeptides from Biodegradable Polymers against Pral Pathogens, *Plos One*, 11, e0162537 (2016)
20. Fenyong She, Nimmagadda A., Teng P., Su M., Zuo X.B., Cai J.F.: Helical 1:1 alpha/Sulfono-gamma-AA Heterogeneous Peptides with Antimicrobial Activity, *Biomacromolecules*, 17, 1854–1859 (2016)
21. Ghosh C., Konai M.M., Sarkar P., Samaddar S., Haldar J.: Design simple lipidates lysines: bifurcation imparts selective antimicrobial activity. *Chem. Med. Chem.*, 11, 2367–2371 (2016)
22. Giuliani A., Rinaldi A.C.: Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2255–2266 (2011)
23. Goldberg K., Sarig H., Zakoon F., Espand R.F., Espand R.M., Mor A.: Sensitization of Gram-negative bacteria by targeting the membrane potential. *Faseb J.* 27, 3818–3826 (2013)
24. Greber K.E., Dawgul M., Kamysz W., Sawicki W.: Cationic Net Charge and Counter Ion Type as Antimicrobial Activity Determinant Factors of Short Lipopeptides. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.00123 (2017)
25. Greber K.E., Ciura K., Belka M., Kawczak P., Nowakowska J., Baczek T., Sawicki W.: Characterization of antimicrobial and hemolytic properties of short synthetic cationic lipopeptides based on QSAR/QSTR approach, *Amino acids*, DOI: 10.1007/s00726-017-2530-2 (2017)
26. Horn J.N., Sengillo J.D., Lin D.J., Romo T.D., Grossfield A.: Characterization of a potent antimicrobial lipopeptide via coarse-grained molecular dynamics, *BBA.-Biomembranes*. 1818, 212–218 (2012)
27. Hu Y.G., Amin M.N., Padhee S., Wang R.S.E., Qiao Q., Bai G., Li Y.Q., Mathew A., Cao C.H., Cai J.F.: Lipidated peptidomimetics with improved antimicrobial activity. *ACS. Med. Chem. Lett.* 3, 683–686 (2012)
28. Hu Y.G., Li X.L., Sebt S.M., Chen J.D., Cai J.F.: Design and synthesis of AApeptides: a new class of peptide mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 1469–1471 (2011)
29. Iyer V.: A review of stapled peptides and small molecules to inhibit protein-protein interactions in cancer. *Curr. Med. Chem.* 23, 3025–3043 (2016)
30. The APD: The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (24.02.2018)
31. Jammal J., Zakoon F., Kaneti G., Goldberg K., Mor A.: Sensitization of Gram-negative bacteria to rifampin and OAK combinations. *Sci. Rep.-UK*, DOI: 10.1038/srep09216
32. Jammal J., Zaknoon F., Kaneti G., Herhkovits A.S., Mor A.: Sensitization of Gram-negative Bacilli to Host Antimicrobial Proteins, *JPN. J. Infect. Dis.* 215, 1599–1607 (2017)
33. Janiszewska J. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery*, 59, 699–707 (2014)
34. Janiszewska J., Sowinska M., Rajnisz A., Solecka J., Lacka I., Milewski S., Urbanczyk-Lipkowska Z.: Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1388–1393 (2012)
35. Jansen R.O., Sandberg-Schaal A., Frimodt-Moller N., Nielsen H.M., Franzyk H.: End group modification: Efficient tool for improving activity of antimicrobial peptide analogues towards Gram-positive bacteria, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95, 40–46 (2015)
36. Jaskiewicz M., Neubauer D., Kamysz W.: Comparative Study on Antistaphylococcal Activity of Lipopeptides in Various Culture Media. *Antibiotics*, DOI:10.3390/antibiotics6030015 (2017)
37. Jenner Z.B., Crittenden C.M., Gonzales M., Brodbelt J.S., Bruns K.A.: Hydrocarbon-stapled lipopeptides exhibit selective antimicrobial activity, *Biopolymers*, 108, e23006 (2017)
38. Jerala R.: Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives, *Expert. Opin. Inv. Drug.* 16, 1159–1169 (2007)
39. Kamysz E., Barchiesi F. i wsp.: *In vitro* activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. *Peptides*, 32, 99–103 (2011)
40. Kamysz E., Sikorska E., Dawgul M., Tyszkowski R., Kamysz W.: Influence of dimerization of lipopeptide Laur-Orn-Orn-Cys-NH₂ and N-terminal peptide of human lactoferricin on biological activity. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 21, 39–46 (2015)
41. Kamysz W.: Projektowanie, synteza i badania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Akademia Medyczna. Gdańsk, 2007
42. Kaur P., Li Y.Q., Cai F.J., Song L.K.: Selective membrane disruption mechanism of an antibacterial gamma-AApeptide defined by EPR spectroscopy. *Biophys. J.* 110, 1789–1799 (2016)
43. Koh J.J., Lin S.M., Beuerman R.W., Liu S.P.: Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: design and synthetic approaches, *Amino acids*, 49, 1653–1677 (2017)
44. Kozińska A., Sitkiewicz I.: „Nowe” i „Stare” antybiotyki – mechanizmy działania i strategie poszukiwania leków przeciwbakteryjnych. *Kosmos*, 66, 109–124 (2017)
45. Lakshminarayanan R., Beuerman R.W. I wsp.: Branched peptide, B2088, disrupts the supramolecular organization of lipopolysaccharides and sensitizes the Gram-negative bacteria, *Sci. Rep.-UK*, 6, DOI: 10.1038/srep25905 (2016)
46. Lavery G., McLaughlin M., Shaw C., Gorman S.P., Gilmore B.E.: Antimicrobial Activity of Short, Synthetic Cationic Lipopeptides, *Chem. Biol. Drug. Des.* 75, 563–569 (2010)
47. Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W.: Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* DOI: 10.3389/fnins.2017.00073 (2017)
48. Li J.G., Liu S.P., Lakshminarayanan R., Bai Y., Pervushin K., Verma C., Beuerman R.W.: Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability, *BBA. - Biomembranes*, 1828, 1112–1121 (2013)
49. Lin D.J., Grossfield A.: Thermodynamics of antimicrobial lipopeptide binding to membranes: origins of affinity and selectivity. *Biophys. J.* 107, 1862–1872 (2014)
50. Lohan S., Cameotra S.S., Bisht G.S.: Systematic study of non-natural short cationic lipopeptides as novel broad-spectrum antimicrobial agents. *Chem. Biol. Drug. Des.* 82, 557–566 (2013)
51. Majerle A., Kidric J., Jerala R.: Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J. Antimicrob. Chemoth.* 51, 1159–1165 (2003)
52. Mak P., Pohl J., Dubin A., Reed M.S., Bowers S.E., Fallon M.T., Shafer W.M.: The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 21, 13–19 (2003)
53. Makovitzky A., Avrahami D., Shai Y.: Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15997–16002 (2006)
54. Makovitzky A., Baram J., Shai Y.: Antimicrobial lipopolyptides composed of palmitoyl di- and tricationic peptides: *in vitro* and *in vivo* activities, self-assembly to nanostructures and plausible mode of action. *Biochemistry-US*, 47, 10630–10636 (2008)
55. Malina A., Shai Y.: Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of cationic biologically inactive peptide, *Biochem. J.* 390, 695–702 (2005)
56. Mangoni M.L., Shai Y.: Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences

- in cell specificities and modes of action, *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2267–2280 (2011)
57. Migon D., Neubauer D., Kamysz W.: Hydrocarbon Stapled Antimicrobial Peptides. *Protein J.* DOI: 10.1007/s10930-018-9755-0 (2018)
 58. Min K.R., Galvis A., Williams B., Rayala R., Cudic P., Ajdic D.: Antibacterial and Antibiofilm Activities of a Novel Synthetic Cyclic Lipopeptide against Cariogenic *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob. Agents. Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.00776-17 (2017)
 59. Mirski T., Gryko R., Bartoszcze M., Bielwaska-Drózd A., Tyszkiewicz W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – nowe możliwości zwalczania infekcji u ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* 67, 517–521 (2011)
 60. Mishra B., Lushnikova T., Wang G.S.: Small lipopeptides possess anti-biofilm capability comparable to daptomycin and vancomycin. *RSC. Adv.* 5, 59758–59769 (2015)
 61. Mizerska-Dudka M., Andrejko M., Kondefe-Szerszeń M.: Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Post. Mikrobiol.* 50, 209–216 (2011)
 62. Mohanram H., Bhattacharjya S.: ‘Lollipop’-shaped helical structure of a hybrid antimicrobial peptide of temporin B – lipopolysaccharide binding motif and mapping cationic residues in antibacterial activity. *BBA. – Gen. Subjects.* 1860, 1362–1372 (2016)
 63. Mohanram H., Bhattacharjya S.: beta-Boomerang Antimicrobial and antiendotoxic peptides: lipidation and disulfide bond effects on activity and structure. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 7, 482–501 (2014)
 64. Nasompag S., Dechsiri P., Hongsing N., Phonimdaeng P., Daduang S., Klaynongsruang S., Camesano T.A., Patramanon R.: Effect of acyl chain length on therapeutic activity and mode of action of the C-X-KYR-NH₂ antimicrobial lipopeptide. *BBA. – Biomembranes*, 1848, 2351–2364 (2015)
 65. Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje E.Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D.: Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29, 969–977 (2008)
 66. Niu Y.H., Cai J.F. I wsp.: Lipo-gamma-AApeptides as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 55, 4003–4009 (2012)
 67. Omardien S., Brul S., Zaat S.A.J.: Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front. Cell. Dev. Biol.* Doi: 10.3389/fcell.2016.00111 (2016)
 68. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y.: Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* 341, 501–513 (1999)
 69. Padhee S., Li Y.Q., Cai J.F.: Activity of lipo-cyclic gamma-AApeptides against biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2565–2569 (2015)
 70. Papo N., Oren Z., Pag U., Sahl H.G., Shai Y.: The consequence of sequence alternation of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* 277, 33913–33921 (2002)
 71. Radziszewsky I.S., Rotem S., Bourdetsky D., Navon-Venezia S., Carmeli Y., Mor A.: Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers. *Nat. Biotechnol.* 25, 657–659 (2007)
 72. Sang P., Shi Y., Teng P., Cao A.N., Xu H., Li Q., Cai J.F.: Antimicrobial AApeptides. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 1266–1279 (2017)
 73. Sarig H., Livne L., Held-Kutnetsov V., Zakoon F., Ivankin A., Gidalevitz D., Mor A.: A miniature mimic of host defense peptides with systematic antibacterial efficacy. *Faseb J.* 24, 1904–1913 (2010)
 74. Shai Y., Makovitzky A., Avrahami D.: Host defense peptides and lipopeptides: mode of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 479–486 (2006)
 75. Sikorska E., Dawgul M., Greber K., Iłowska E., Pogorzelska A., Kamysz W.: Self-assembly and interactions of short antimicrobial lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *BBA.-Biomembranes*, 1838, 2625–2634 (2014)
 76. Straus S.K., Hancock R.E.W.: Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *BBA.-Biomembranes*, 1758, 1215–1223 (2006)
 77. Teng P., Cai J.F. I wsp.: Small Antimicrobial Agents Based on Acylated Reduced Amide Scaffold. *J. Med. Chem.* 59, 7877–7887 (2016)
 78. Wang G.: Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Method. Mol. Cell Biol.* 1268, 43–66 (2015)
 79. Wiesner J., Vilcinskas A.: Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1, 440–464 (2010)
 80. Wódz K., Brzezińska-Błaszczak E., Katelicydiny – endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe. *Postępy Biochemii*, 61, 93–101 (2015)
 81. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Cytryńska M.: Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. *Kosmos*, 66, 563–574 (2017)
 82. Zhang L.J., Gallo R.L.: Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* 26, 14–19 (2016)
 83. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* 50, 223–234 (2011)