

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246720 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433503**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.08**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.10.11 BUP 28/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.03 WUP 09/2025**

(51) MKP:

C07K 7/06 (2006.01)

A01N 37/46 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET WARSZAWSKI, Warszawa, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

SŁAWOMIR SĘK, Warszawa, PL

DAGMARA TYMECKA, Warszawa, PL

**JOANNA JUCHANIEWICZ-DĘBIŃSKA,
Warszawa, PL**

DARIUSZ BARTOSIK, Warszawa, PL

ROBERT LASEK, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Joanna Dargiewicz, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Lipopeptydy o działaniu przeciwbakteryjnym, kompozycja farmaceutyczna i kompozycja kosmetyczna je zawierająca oraz zastosowania

PL 246720 B1

Opis wynalazku

Niniejszy wynalazek dotyczy nowych, syntetycznych, liniowych oraz rozgałęzionych lipopeptydów, kompozycji farmaceutycznych zawierających takie syntetyczne, liniowe i/albo rozgałęzione lipopeptydy oraz kompozycji kosmetycznych zawierających takie syntetyczne, liniowe i/albo rozgałęzione lipopeptydy, a także takich liniowych i rozgałęzionych lipopeptydów do zastosowania jako leki, zwłaszcza w leczeniu infekcji bakteryjnych.

Wzrastająca liczba lekoopornych szczepów bakterii stanowi aktualnie poważny problem kliniczny. W związku z tym istnieje zapotrzebowanie na nowe związki, które mogłyby stanowić skuteczną alternatywę dla istniejących antybiotyków. Jednocześnie pożądane jest, aby wykazywały one odmienne mechanizmy działania w porównaniu do tradycyjnych antybiotyków. Grupą związków chemicznych, która może spełnić te wymagania są lipopeptydy.

Tradycyjne antybiotyki dostępne na rynku zwykle mają działanie specyficznie i mogą przykładowo zaburzać konkretne procesy biochemiczne, wpływając na aktywność enzymów uczestniczących w syntezie ściany komórkowej lub uszkodzając DNA. Lipopeptydy wykazują inny mechanizm działania wykorzystujący ich zdolność do penetracji i nieodwracalnego niszczenia struktury błony komórkowej bakterii (patrz np. Alborn i wsp., *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 (1991) 2282). Fakt ten ma istotne implikacje z punktu widzenia ich zastosowania jako środki przeciwbakteryjne, ponieważ prawdopodobieństwo wystąpienia oporności na tego typu związki jest bardzo małe.

Do lipopeptydów należy daptomycyna, która jest naturalnym, rozgałęzionym, cyklicznym lipopeptydem antybiotykowym o pochodzeniu nierybosomalnym. Lipopeptyd ten wykazuje silne działanie bakteriobójcze w warunkach *in vitro* i *in vivo* przeciwko bakteriom gram-dodatnim, które mogą powodować poważne i zagrażające życiu choroby, co opisano przykładowo w publikacji Tally i współpracowników (Tally, F.P. i wsp., „Daptomycin: a Novel Agent for Gram positive Infections”, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 8 (1999) 1223–1238).

Do grupy lipopeptydów, które wykazują istotny potencjał jako użyteczne antybiotyki, należą lipopeptydy opisane przykładowo w patencie U.S. o nr. 6,911,525 oraz zgłoszeniu patentowym U.S. o nr. 2015/0080292 A1.

J. Juhaniewicz-Dębińska i wsp. (Juhaniewicz-Dębińska i wsp., „Lipopeptide-induced changes in permeability of solid supported bilayers composed of bacterial membrane lipids”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 812, (2018) 227–234) opisali ultrakrótkie liniowe lipopeptydy i ich wpływ na uproszczone modele dwuwarstw lipidowych naśladujących układ błony bakterii gram-ujemnej *E. coli*. Badania wykazały istotną aktywność membranolityczną wspomnianych lipopeptydów, co sugeruje, że ich mechanizm działania przeciwbakteryjnego może rzeczywiście opierać się na oddziaływaniu z błoną komórkową.

Większość opisanych w literaturze lipopeptydów ma pochodzenie naturalne i są one pozyskiwane z bakterii lub innych organizmów, co pociąga za sobą koszty izolacji z materiału biologicznego. Co więcej, większość obecnie stosowanych w medycynie lipopeptydów, takich jak daptomycyna lub polimyxyny, ma cykliczną, stosunkowo złożoną strukturę, co z kolei komplikuje ewentualną syntezę i dalsze modyfikacje.

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie syntetycznych lipopeptydów, które wykazują przeciwbakteryjną aktywność względem bakterii gram-dodatnich oraz gram-ujemnych, w tym bakterii opornych na antybiotyki, jak również kompozycji farmaceutycznych i kosmetycznych je zawierających.

Krótki opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest syntetyczny lipopeptyd o wzorze ogólnym:



w którym

X_1 oznacza resztę wybraną spośród FA-DDab-Dab (NR ID. SEKW.: 1) i H-Dab(FA-DDab) (NR ID. SEKW.: 3), przy czym

gdy X_1 oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy,

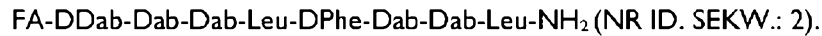
gdy X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy;

X_2 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny;

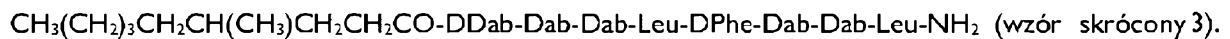
X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu; i

X₄ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

Korzystnie w lipopeptydzie o wskazanym wyżej wzorze ogólnym według wynalazku X₁ oznacza FA-DDab-Dab, X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny. Taki lipopeptyd ma strukturę liniową i może być przedstawiony następującym wzorem:



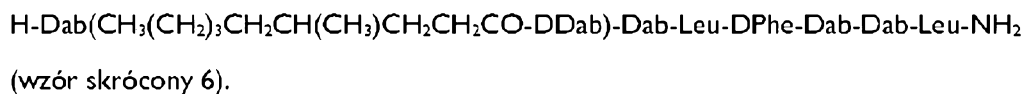
Korzystniej taki lipopeptyd według wynalazku wybrany jest z grupy składającej się z następujących lipopeptydów:



Korzystnie w takim lipopeptydzie o wskazanym powyżej wzorze ogólnym według wynalazku X₁ oznacza H-Dab(FA-DDab), X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny. Taki lipopeptyd ma strukturę rozgałęzioną i może być przedstawiony następującym wzorem:



Korzystnie taki lipopeptyd według wynalazku wybrany jest z grupy składającej się z:



Przedmiotem wynalazku jest ponadto kompozycja farmaceutyczna, charakteryzująca się tym, że zawiera lipopeptyd o wzorze ogólnym:



w którym

X₁ oznacza resztę wybraną spośród FA-DDab-Dab i H-Dab(FA-DDab), przy czym

gdy X₁ oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy,

gdy X₁ oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy;

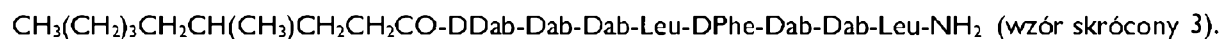
X₂ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny;

X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu

X₄ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd o wskazanym powyżej wzorze ogólnym według wynalazku, w którym X₁ oznacza FA-DDab-Dab, X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny.

Korzystniej kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd wybrany jest z grupy składającej się z:



Korzystnie kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd o wskazanym powyżej wzorze ogólnym według wynalazku, w którym X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab), X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.

Korzystnie, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5), i

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6).

Kompozycja farmaceutyczna według wynalazku korzystnie zawiera od 0,1 do 99% wag. co najmniej jednego z opisanych powyżej lipopeptydów według wynalazku.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera ponadto farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i/albo substancję rozcieńczającą, i/albo środek pomocniczy, i/albo zaróbkę.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera skrobię kukurydzianą i/albo żelatynę, i/albo laktozę, i/albo sacharozę, i/albo mikrokryształiczną celulozę, i/albo kaolin, i/albo mannitol, i/albo fosforan diwapniowy, i/albo chlorek sodu, i/albo kwas alginowy.

Korzystnie, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku ma postać odpowiednią do podawania doustnego i/albo dożylnego, i/albo domięśniowego, i/albo podskórnego, i/albo pozajelitowego.

Korzystnie, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku ma postać tabletki i/albo kapsułki, i/albo eliksiru, i/albo zawiesiny, i/albo syropu, i/albo żelu, i/albo kremu, i/albo maści.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto kompozycja kosmetyczna, charakteryzująca się tym, że zawiera lipopeptyd o wzorze ogólnym:



w którym

X_1 jest wybrany spośród FA-DDab-Dab i H-Dab(FA-DDab), przy czym gdy X_1 oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy,

gdy X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy, kwas 4-metylononanowy i kwas 4-metyloheksanowy;

X_2 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny;

X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu

X_4 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd o wskazanym powyżej wzorze ogólnym według wynalazku, w którym X_1 oznacza FA-DDab-Dab, X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 1),

CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 2), i

CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 3).

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd o wskazanym powyżej wzorze ogólnym, w którym X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab), X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5),

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6), i

H-Dab(CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 7).

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera od 0,1 do 99% wag. co najmniej jednego z lipopeptydów według wynalazku.

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera nośnik kosmetyczny.

Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku ma postać żelu albo kremu albo zawiesiny.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto dowolny z lipopeptydów według wynalazku jak określono powyżej do zastosowania jako lek.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto dowolny z lipopeptydów według wynalazku jak określono powyżej do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji bakteryjnej.

Korzystnie w przypadku dowolnego lipopeptydu według wynalazku do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji bakteryjnej, taka infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię gram-dodatnią.

Korzystnie infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię z rodzaju *Enterococcus* lub *Staphylococcus*.

Jeszcze korzystnie infekcja bakteryjna wywołana jest przez *Staphylococcus aureus* lub *Staphylococcus epidermidis*.

Korzystnie w przypadku dowolnego lipopeptydu według wynalazku do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji bakteryjnej, taka infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię gram-ujemną.

Korzystnie infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię z rodzaju *Klebsiella* albo *Pseudomonas*.

Jeszcze korzystnie infekcja bakteryjna wywołana jest przez *Klebsiella pneumoniae* albo *Pseudomonas aeruginosa*.

Korzystnie w przypadku dowolnego lipopeptydu według wynalazku do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji bakteryjnej, taka infekcja wywołana jest przez bakterię oporną na antybiotyki.

Korzystnie w przypadku lipopeptydu według wynalazku do zastosowania w leczeniu lub profilaktyce infekcji bakteryjnej stosowany jest co najmniej jeden lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 1),

CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 2),

CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 3),

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

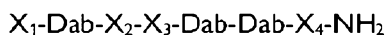
H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5), i

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6).

Szczegółowy opis wynalazku

Jak zdefiniowano powyżej niniejszy wynalazek dostarcza nowych, syntetycznych, liniowych i rozgałęzionych lipopeptydów, kompozycji farmaceutycznych zawierających takie syntetyczne, liniowe i/albo rozgałęzione lipopeptydy, kompozycji kosmetycznych zawierających takie syntetyczne, liniowe i/albo rozgałęzione lipopeptydy, a także takich liniowych i rozgałęzionych lipopeptydów do zastosowania jako leki, zwłaszcza w leczeniu infekcji bakteryjnych.

Syntetyczny lipopeptyd według wynalazku przedstawiony jest wzorem ogólnym:



w którym

X_1 oznacza resztę wybraną spośród FA-DDab-Dab (NR ID. SEKW.: 1) i H-Dab(FA-DDab) (NR ID. SEKW.: 3), przy czym

gdy X_1 oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy, zaś lipopeptyd ma strukturę liniową,

gdy X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy, kwas 4-metylononanowy i kwas 4-metyloheksanowy, zaś lipopeptyd ma strukturę rozgałęzioną;

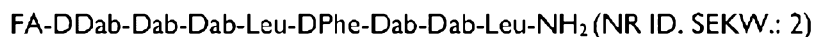
X_2 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny – czyli aminokwasu alifatycznego;

X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu – czyli resztę aminokwasu aromatycznego; i

X_4 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

Na potrzeby niniejszego opisu, lipopeptyd to cząsteczka składająca się z reszty lipidowej, to jest reszty kwasu tłuszczowego (FA) połączonej z resztą peptydową. W odniesieniu do reszt aminokwasowych stosuje się standardową, znaną w dziedzinie, nomenklaturę w postaci trzyliterowych skrótów, przykładowo reszta aminokwasowa L-feniloalaniny oznaczana jest jako „Phe”, reszta D-feniloalaniny – jako „DPhe”, L-leucyny – jako „Leu”, kwasu L-2,4-diaminomasłowego – jako „Dab”, natomiast kwasu D-2,4-diaminomasłowego – jako „DDab”. W wykazie sekwencji przedstawiono sekwencje aminokwasowe części peptydowej lipopeptydów według wynalazku.

Korzystne liniowe lipopeptydy według niniejszego wynalazku można przedstawić następującym wzorem:



w którym FA oznacza liniową lub rozgałęzioną resztę kwasu tłuszczowego wybraną z grupy obejmującej resztę kwasu n-dodekanowego, kwasu n-dekanowego oraz kwasu 4-metylononanowego. Szczegółowe struktury korzystniejszych liniowych lipopeptydów według wynalazku przedstawione są w Tabeli 1.

Tabela 1. Lipopeptydy liniowe

Nr Wzoru	Wzór skrócony lipopeptydu	Wzór strukturalny
1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH}_2$	
2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH}_2$	
3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH}_2$	

Korzystne rozgałęzione lipopeptydy według niniejszego wynalazku można przedstawić następującym wzorem



w którym FA oznacza liniową lub rozgałęzioną resztę kwasu tłuszczowego wybraną z grupy obejmującej resztę kwasu n-dodekanowego, kwasu n-dekanowego, kwasu 4-metylononanowego oraz kwasu 4-metyloheksanowego. Szczegółowe struktury korzystniejszych rozgałęzionych lipopeptydów według wynalazku przedstawione są w Tabeli 2.

Tabela 2. Lipopeptydy rozgałęzione

Nr Wzoru	Wzór skrócony lipopeptydu	Wzór strukturalny
4	H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO -DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH ₂	
5	H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO -DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH ₂	
6	H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO -DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH ₂	
7	H-Dab(CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO -DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH ₂	

Lipopeptydy według wynalazku mogą być otrzymane dowolną metodą syntezy znaną ze stanu techniki. Przykładowo, wspomniana metoda syntezy może obejmować syntezę w fazie ciekłej albo syntezę na stałym nośniku (patrz np. Sewald, N. and Jakubke, H.-D. (2003), Peptide Synthesis. In Peptides: Chemistry and Biology (eds N. Sewald and H.-D. Jakubke) doi:10.1002/352760068X.ch4 oraz Peptide synthesis and applications, ed. / Knud J. Jensen; Pernille T. Shelton; Søren L. Pedersen. Humana Press, 2013, (Methods in Molecular Biology, Vol. 1047). Przykładowy sposób wytwarzania lipopeptydów według wynalazku przedstawiono poniżej w sekcji Przykłady.

Lipopeptydy według wynalazku, zarówno liniowe, jak i rozgałęzione, mają strukturę amfifilową, a dzięki obecności reszt kwasu 2,4-diaminomastłowego, w warunkach fizjologicznego pH (około 7,4) posiadają nadmiarowy ładunek dodatni, co ułatwia ich oddziaływanie z membraną komórek bakteryjnych.

Kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera dowolny, liniowy lub rozgałęziony, lipopeptyd według wynalazku korzystnie wybrany z grupy lipopeptydów o wzorach skróconych 1–7. Korzystnie, kompozycja zawiera od 0,1 do 99% wag. dowolnego, co najmniej jednego lipopeptydu według wynalazku, korzystnie wybranego z grupy obejmującej lipopeptydy o wzorach skróconych 1–7. Kompozycja farmaceutyczna może zawierać co najmniej jeden farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i/albo substancję rozcieńczającą, i/albo środek pomocniczy, i/albo zaróbkę, jak jest to znane w dziedzinie. Przykładowo, ale bez ograniczania się do wymienionych, kompozycja farmaceutyczna może zawierać skrobię kukurydzianą i/albo żelatynę, i/albo laktozę, i/albo sacharozę, i/albo mikrokrystaliczną celulozę, i/albo kaolin, i/albo mannitol, i/albo fosforan diwapniowy, i/albo chlorek sodu, i/albo kwas alginowy. Sposoby wytwarzania kompozycji farmaceutycznych zawierających środek czynny, taki jak środek przeciwbakteryjny, oraz co najmniej jeden farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i/albo substancję rozcieńczającą, i/albo środek pomocniczy, i/albo zaróbkę, są znane w dziedzinie.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera ponadto co najmniej jeden inny środek przeciwbakteryjny, taki jak antybiotyk. Przykładowe środki przeciwbakteryjne, które mogą być składnikiem kompozycji farmaceutycznej według wynalazku mogą być wybrane, między innymi, spośród: antybiotyków β -laktamowych: takich jak np. penicyliny, cefalosporyny; antybiotyków peptydowych, takich jak np. polimyksyny (np. kolistyna), gramicydyna, bacytracyna, fusafungina, antybiotyków glikopeptydowych: takich jak np. wankomycyna, oritawancyna; antybiotyków aminoglikozydowych: takich jak np. streptomycyna, gentamycyna, amikacyna; antybiotyków tetracyklinowych: takich jak np. doksycyklina; antybiotyków makrolidowych: takich jak np. erytromycyna, klarytromycyna; antybiotyków linkozamidowych: takich jak np. klindamycyna, linkomycyna; antybiotyków amfenikolowych: takich jak np. chloramfenikol; antybiotyków ryfamycynowych: takich jak np. ryfampicyna i ryfaksymina. Takie skojarzone zastosowanie co najmniej dwóch środków przeciwbakteryjnych o różnym mechanizmie działania zapewnia dodatkową korzyść w postaci uzyskania synergistycznego efektu przeciwbakteryjnego. Jak wiadomo bowiem z literatury, lipopeptydy, takie jak polimyksyny, dają synergiczny efekt przeciwbakteryjny w połączeniu z innymi antybiotykami (np. Berditsch i wsp. *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (2015) 5288–5296 lub Varra, M. *Molecules* 24 (2019) 249). Zatem zastosowanie lipopeptydów według wynalazku w kombinacji z innym środkiem przeciwbakteryjnym, takim jak antybiotyk, przyniesie synergistyczny efekt przeciwbakteryjny.

Korzystnie, kompozycja farmaceutyczna według wynalazku ma postać odpowiednią do podawania doustnego i/albo dożylnego, i/albo domięśniowego, i/albo podskórnego, i/albo pozajelitowego, korzystnie ma postać tabletki i/albo kapsułki, i/albo eliksiru, i/albo zawiesiny, i/albo syropu, i/albo żelu, i/albo kremu, i/albo maści. Sposoby wytwarzania takich postaci kompozycji farmaceutycznych są znane w dziedzinie niniejszego wynalazku.

Kompozycja kosmetyczna według wynalazku zawiera dowolny, liniowy lub rozgałęziony, lipopeptyd według wynalazku, korzystnie wybrany z grupy obejmującej lipopeptydy o wzorach skróconych 1–7. Kompozycja kosmetyczna według wynalazku może mieć dowolną kosmetycznie dopuszczalną formę aplikacyjną. Kompozycja kosmetyczna może zawierać od 0,1 do 99% wag. dowolnego co najmniej jednego lipopeptydu według wynalazku, korzystnie wybranego z grupy o wzorach skróconych 1–7. Korzystnie kompozycja kosmetyczna według wynalazku opcjonalnie zawiera nośnik kosmetyczny. Nośniki kosmetyczne są znane w dziedzinie. Przykładowo, jako nośnik kosmetyczny można wykorzystać półstałe lub ciekłe poliole, jak również tłuszcze np. w formie miceli lub liposomów. Korzystnie, kompozycja kosmetyczna ma postać żelu, kremu albo zawiesiny. Sposoby wytwarzania kompozycji kosmetycznych są znane w dziedzinie.

Wynalazek obejmuje również syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku, korzystnie o wzorach skróconych 1–7, do zastosowania jako lek. Korzystnie, wynalazek obejmuje również syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku, korzystnie o wzorach skróconych 1–7, do zastosowania w leczeniu infekcji bakteryjnych, korzystnie wywołanych przez bakterie gram-dodatnie, korzystnie z rodzaju *Staphylococcus*.

Syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku ze względu na aktywność hamującą wzrost bakterii gram-dodatnich, korzystnie z rodzaju *Enterococcus* lub *Staphylococcus*, korzystnie gatunku *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*, oraz bakterii gram-ujemnych, korzystnie z rodzaju *Klebsiella* albo *Pseudomonas*, korzystnie gatunku *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, przeznaczone są do stosowania w leczeniu i/lub profilaktyce infekcji bakteryjnych.

Szczególną aktywność wykazują one względem bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, a także *Pseudomonas* i *Klebsiella*, zwłaszcza *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* oraz *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Zaletą syntetycznych, liniowych i rozgałęzionych, lipopeptydów według wynalazku jest mechanizm ich działania, który oparty jest na bezpośrednim oddziaływaniu z błoną komórek bakteryjnych, co z kolei zmniejsza ryzyko wystąpienia lekooporności. Z uwagi na inny mechanizm działania niż znane w dziedzinie antybiotyki, lipopeptydy według wynalazku będą wykazywać skuteczność wobec bakterii opornych na antybiotyki o innym mechanizmie działania niż lipopeptydy według wynalazku. Dodatkowo, syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku są prostymi i łatwymi do syntezy strukturami, co istotnie zmniejsza ich koszt wytwarzania. Syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku charakteryzują się ponadto odpowiednią rozpuszczalnością w środowisku wodnym, co znacznie poszerza wachlarz możliwości odnośnie formy aplikacyjnej kompozycji farmaceutycznej lub kosmetycznej według wynalazku. Syntetyczne, liniowe i rozgałęzione, lipopeptydy według wynalazku charakteryzują się również podwyższoną stabilnością metaboliczną, co zapewnia dodatkową korzyść w postaci istotnego wydłużenia ich czasu działania, a tym samym zwiększa dodatkowo ich skuteczność działania.

Celem zilustrowania wynalazku, poniżej załączono przykłady i rysunki, których nie należy jednak interpretować w jakikolwiek sposób jako ograniczenie zakresu wynalazku, który zdefiniowano w zastrzeżeniach patentowych. Załączone rysunki ilustrują korzystne przykłady realizacji wynalazku.

Figura 1 przedstawia przykładowy schemat wytwarzania syntetycznego lipopeptydu liniowego według wynalazku (o wzorze skróconym 2).

Figura 2 przedstawia przykładowy schemat wytwarzania syntetycznego lipopeptydu rozgałęzionego według wynalazku (o wzorze skróconym 5).

Figura 3 przedstawia wpływ lipopeptydu o wzorze skróconym 1 według wynalazku na dynamikę wzrostu szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (panel A) i *Staphylococcus aureus* (panel B), przedstawioną jako względną gęstość optyczną hodowli w funkcji czasu.

Figura 4 przedstawia wpływ lipopeptydu o wzorze skróconym 2 według wynalazku na dynamikę wzrostu szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (panel A) i *Staphylococcus aureus* (panel B), przedstawioną jako względną gęstość optyczną hodowli w funkcji czasu.

Figura 5 przedstawia wpływ lipopeptydu o wzorze skróconym 3 według wynalazku na dynamikę wzrostu szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (panel A) i *Staphylococcus aureus* (panel B), przedstawioną jako względną gęstość optyczną hodowli w funkcji czasu.

Figura 6 przedstawia wpływ lipopeptydu referencyjnego na dynamikę wzrostu szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (panel A) i *Staphylococcus aureus* (panel B), przedstawioną jako względną gęstość optyczną hodowli w funkcji czasu.

O ile nie wskazano inaczej, w poniższych przykładach stosowano znane i/lub komercyjnie dostępne urządzenia, metody, warunki reakcji, odczynniki i zestawy, takie jakie powszechnie stosuje się w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek i jakie są zalecane przez wytwórców odpowiednich odczynników i zestawów.

PRZYKŁAD 1. Synteza lipopeptydów według wynalazku

Lipopeptydy, zarówno liniowe, jak i rozgałęzione, otrzymano metodą syntezy peptydów na nośniku stałym (ang. *Solid Phase Peptide Synthesis*) zgodnie ze strategią syntezy Fmoc/tBu na nośniku polimerowym, którym była żywica amidowa Fmoc-Rink Amide AM (o obsadzeniu 0,55 mmol/g, Active-tec, Wielka Brytania). Syntezę rozpoczęto od odważenia 365 mg żywicy i umieszczenia jej w reaktorze strzykawkowym, po czym dodano 5 ml N,N-dimetyloformamidu (DMF, Sigma-Aldrich) i wytrząsano przez 2 godziny w celu spęcznienia żywicy. Następnie przeprowadzono następujące etapy:

1. Deprotekcję osłony Fmoc (9-fluorenylometoksykarbonylowej), blokującej grupę aminową. W tym celu żywicę wytrząsano dwukrotnie (1 x 5 min., 1 x 10 min.) w 20% roztworze (v/v) piperidyny w DMF. W celu usunięcia pozostałości piperidyny, naprzemiennie przemywano żywicę stosując DMF i izopropanol (IPA, POCH S.A., Polska). Czynność powtórzono trzykrotnie, po czym przemyto nośnik polimerowy jeszcze dwukrotnie DMF (każdorazowo: 5–6 ml, 2 min/przemycie).
2. Do oceny skuteczności etapu Fmoc-deprotekcji użyto testu Kaisera. Stosując standardową procedurę wykonania tego testu tj. zawieszenia próbki ziaren żywicy w mieszaninie roztworów A-C (3–5 kropli każdego) i ogrzewaniu w ok. 100°C; przy użyciu wyjściowych roztworów o składzie: 5 g ninhydryny w 100 ml etanolu (roztwór A); 80 g fenolu w 20 ml etanolu (roztwór B); 2 ml 0,001 M wodnego

roztworu KCN w 98 ml pirydyny (roztwór C). Granatowe zabarwienie zarówno ziaren, jak i roztworu świadczyło o obecności wolnej grupy aminowej.

3. Kolejnym etapem było przeprowadzenie reakcji kondensacji pomiędzy pochodną aminokwasową (Fmoc-Xaa)-OH a grupą aminową żywicy. W tym celu do naczynia odważano i odmierzano odpowiednie ilości reagentów (stosunek molowy względem obsadzenia żywicy):

- 2 ekwiwalenty odpowiedniej pochodnej aminokwasowej Fmoc Xaa-OH,
- 2 ekwiwalenty czynnika sprzęgającego DIC (N,N'-Diizopropylkarbodiimid),
- 2 ekwiwalenty odczynnika zapobiegającego racemizacji Oxyma.

Następnie wyżej wymienione reagenty rozpuszczano w 3–4 ml DMF i pozostawiano na około 10 minut, po czym tak przygotowaną mieszaninę przeniesiono do reaktora strzykawkowego z żywicą i mieszano/wytrząsano przez ok 4–6 godzin. Po upływie tego czasu mieszaninę reakcyjną odsączono a żywicę naprzemiennie przemywano DMF i IPA, poczynając od DMF (2 x, każdorazowo: 5–6 ml, 2 min/przemycie).

4. Następnie przeprowadzano test Kaisera (wg punktu nr 2), tym razem w celu oceny postępu/zakończenia reakcji kondensacji. Negatywny wynik testu tj. brak zabarwienia ziaren jak i roztworu, świadczył o całkowitym przyłączeniu Fmoc-chronionego aminokwasu do żywicy, czyli zakończeniu reakcji kondensacji. W przypadku uzyskania pozytywnego wyniku testu, powtarzano etap sprzęgania pochodnej aminokwasowej z użyciem dwukrotnego nadmiaru reagentów (stosunek molowy Fmoc-Xaa-OH/DIC/Oxyma wynosił 1 : 1 : 1).

5. Cykliczne powtarzanie etapów opisanych w punktach 1–4 prowadziło do elongacji łańcucha peptydowego. W przypadku etapów kondensacji poszczególnych reszt aminokwasowych do peptydydożywicy wykorzystywano standardowo stosowane, w strategii syntezy Fmoc/tBu, bloki budulcowe tj.: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-DDab(Boc)-OH, oraz w przypadku analogów rozgałęzionych pochodnej Boc-Dab(Fmoc)-OH na etapie przedostatniej reakcji kondensacji (Fmoc-Xaa-OH, Activotec, Wielka Brytania).

6. Przedostatnim etapem syntezy, było przyłączanie kwasu tłuszczowego (R-COOH, Merck). W tym celu – po uprzedniej deprotekcji grupy zabezpieczającej grupę α-aminową i potwierdzeniu obecności wolnego ugrupowania aminowego w teście Kaisera – do naczynia odważono następujące ilości reagentów:

- 2 ekwiwalenty danego kwasu tłuszczowego,
- 2 ekwiwalenty czynnika sprzęgającego DIC,
- 2 ekwiwalenty odczynnika zapobiegającego racemizacji Oxyma.

Następnie wyżej wymienione reagenty rozpuszczano w 3–4 ml mieszaniny DMF/DCM (1 : 1, v/v, DCM = dichlorometan) i pozostawiano na około 10 minut. Tak przygotowaną mieszaninę przenoszono do reaktora strzykawkowego z żywicą i wytrząsano przez około 24 godziny w celu przyłączenia kwasu tłuszczowego. Po zakończeniu reakcji (detekcja testem Kaisera) żywicę przemyto najpierw 4-krotnie mieszaniną DMF/DCM (1 : 1, v/v), a następnie 4-krotnie każdym z następujących rozpuszczalników (2 min./przemycie),:

- dichlorometanem,
- metanolem,
- eterem dietylowym.

Następnie przemyte peptydydożywicę suszono w eksyktorze próżniowym przez 30 minut.

7. Kończącym etapem syntezy był etap acydolitycznego odszczepiania peptydu od nośnika polimerowego, w którym stosowano Reagent B: TFA/H₂O/fenol/TIPS (88 : 5 : 5 : 2, v/v), (gdzie: TFA – kwas trifluorooctowy, TIPS – triizopropylsolan). Do wysuszonej peptydydożywicy dodawano Reagent B w stosunku ok. 10 ml na 1 g peptydydożywicy. Mieszaninę wytrząsano przez 2–4 godziny. Po tym czasie żywicę odsączano, przemywano dodatkową niewielką porcją TFA, a uzyskany przesącz zatężano na wyparce. Pozostałość zalano zimnym eterem dietylowym (schłodzonym w suchym lodzie) i pozostawiano na 24 godziny w lodówce w celu wytrącenia peptydu. Następnie po upływie 24 godzin surowy peptyd wydzielano poprzez wirowanie.

8. HPLC analityczne wykonywano na modułowym chromatografie cieczowym Prominence firmy Shimadzu z detektorem DAD. Używano kolumny do odwróconych faz Luna 5 µm, C18 (2) 100Å, o wymiarach 250 x 4,6 mm. RP-HPLC półpreparatywne wykonywano na modułowym chromatografie cieczowym Prominence LC-20AP z detektorem UV-VIS. Używano kolumny Luna 5 µm, C18, o wymiarach 150 x 10 mm. Identyfikację otrzymanych lipopeptydów przeprowadzono na podstawie widm masowych

wykonanych na przyrządzie LCMS-IT-TOF firmy Shimadzu, który wyposażony jest w źródło jonów elektrosprej (ESI) z pułapką jonową (IT), oraz analizatorem czasu przelotu (TOF). Przed przystąpieniem do etapu oczyszczania danego peptydu wykonywana była analiza RP-HPLC surowego produktu w celu optymalizacji warunków rozdzielania dla danej mieszaniny surowego peptydu.

9. Z uwagi na fakt, iż zaprojektowane i zsyntezowane peptydy, miały być poddane badaniom biologicznym konieczna była wymiana przeciwjonu z trifluorooctanowego (TFA^-) na chlorkowy (Cl^-). W tym celu oczyszczony peptyd był rozpuszczany w 0,1 M roztworze kwasu solnego, następnie mieszany przez 30 min., po czym zatężany na wyparce a pozostałość była zamrażana i liofilizowana. Procedurę tę powtarzano kilkakrotnie (przeważnie 3–4) aż masa ważonego materiału nie ulegała już zmianie. Przykładowy schemat syntezy lipopeptydu liniowego (nr 2) i rozgałęzionego (nr 5) przedstawiono odpowiednio na Figurach 1 oraz 2.

PRZYKŁAD 2. Badanie aktywności biologicznej lipopeptydów według wynalazku

Szczepy bakteryjne i podłoża hodowlane

Wszystkie szczepy bakteryjne zostały pozyskane z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) lub American Type Culture Collection (ATCC). Szczepy bakterii gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 oraz *Enterococcus faecalis* ATCC 14506. Szczepy bakterii gram-ujemnych: *Escherichia coli* ST2-8624 O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 PCM 499, *Klebsiella pneumoniae* PCM 1, *Salmonella* sv. *Typhimurium* TT622 oraz *Yersinia enterocolitica* PCM 2081. Wszystkie szczepy hodowano w podłożu LB (lysogenic broth) w standardowy sposób.

Struktura testowanych lipopeptydów według wynalazku

Aktywność biologiczną przebadano dla lipopeptydów o wzorach skróconych 1–7, a uzyskane wyniki porównano z aktywnością znanego ze stanu techniki liniowego lipopeptydu referencyjnego, opisanego w publikacjach De Zoysa i wsp., European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 146, 344 oraz De Zoysa i wsp., Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 58, 625. Struktura części peptydowej lipopeptydu referencyjnego opisana jest wzorem:



w którym 4MH oznacza resztę kwasu 4-metyloheksanowego.

Określenie minimalnego stężenia hamującego (Minimal Inhibitory Concentration; MIC)

Materiałem z pojedynczej kolonii bakteryjnej inokulowano 10 ml podłoża LB i prowadzono hodowlę w 30°C z wytrząsaniem przez noc. Następnie gęstość optyczną hodowli nocnych (przy długości fali 600 nm) doprowadzano do wartości 0,05 poprzez rozcieńczenie w świeżej porcji podłoża LB. Badane związki rozpuszczano w wodzie. Seryjne rozcieńczenia związków przygotowywano w podłożu LB w zakresie od 5 do 50 µg/ml (stężenia końcowe). Eksperyment przeprowadzono przez dodanie 100 µl każdego z przygotowanych rozcieńczeń do 100 µl rozcieńczonej hodowli nocnej bakterii w studzienkach 96-dołkowej płytki do mikromiareczkowania. MIC było określane jako najniższe stężenie badanego związku potrzebne do zahamowania wzrostu bakterii ocenianego po 24 h inkubacji w 30°C z wytrząsaniem (końcowa gęstość optyczna przy długości fali 600 nm nie większa niż 0,05). Pomiary gęstości optycznej prowadzono przy użyciu czytnika płytek TECAN Sunrise. Dane uzyskano z trzech niezależnych eksperymentów. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 3.

Tabela 3.

Szczep bakterii	MIC [$\mu\text{g/ml}$ = mg/l]						
	1	2	3	4	5	6	7
							Lipopeptyd referencyjny
(+) <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 14506	40	n.d.	n.d.	30	50	n.d.	50
(-) <i>Escherichia coli</i> ST2-8624 O157:H7	40	10	20	20	10	20	40
(-) <i>Klebsiella pneumoniae</i> PCM 1	40	n.d.	30	20	30	30	n.d.
(-) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 PCM 499	20	20	20	10	20	30	50
(-) <i>Salmonella</i> sv. Typhimurium TT622	n.d.	40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(+) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	5	10	10	5	5	20	n.d.
(+) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	5	5	10	5	10	20	n.d.
(-) <i>Yersinia enterocolitica</i> PCM 2081	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

MIC = minimalne stężenie hamujące

n.d. = nie wyznaczono, tj. wartość MIC była wyższa niż 50 $\mu\text{g/ml}$

Rezultaty pomiarów zestawione w Tabeli 3 wskazują, że wszystkie z testowanych lipopeptydów wykazują zróżnicowaną aktywność wobec przebadanych szczepów bakterii. Lipopeptydy według wynalazku wykazują aktywność zarówno wobec szczepów bakterii gram-dodatnich jak i gram-ujemnych. Lipopeptyd referencyjny, niebędący przedmiotem wynalazku i umieszczony w tabeli w celach wyłącznie porównawczych, wykazuje niewielką aktywność jedynie wobec dwóch z ośmiu analizowanych szczepów bakterii. Uzyskane wyniki wskazują na pewien stopień selektywności lipopeptydów według wynalazku względem gram-dodatnich szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, w przypadku których zaobserwowano zdecydowanie najwyższą aktywność badanych lipopeptydów, czyli najniższe wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC). Jednocześnie, aktywność testowanych lipopeptydów względem szczepów *Yersinia enterocolitica* PCM 2081 oraz *Salmonella* sv. *Typhimurium* TT622 jest znikoma.

Określenie wpływu lipopeptydów na dynamikę wzrostu bakterii

Wpływ różnych stężeń lipopeptydów o wzorach skróconych 1–3 według wynalazku oraz lipopeptydu referencyjnego na wzrost bakterii sprawdzono dla jednego, reprezentatywnego, szczepu bakterii gram-ujemnych: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 PCM 499 oraz jednego, reprezentatywnego, szczepu bakterii gram-dodatnich: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Eksperyment prowadzono analogicznie do oznaczania MIC, przy czym w tym przypadku rozcieńczone hodowle nocne preinkubowano przez 2 h przed dodaniem rozcieńczonych lipopeptydów. Następnie monitorowano wzrost bakterii poprzez pomiar stężenia optycznego hodowli przy długości fali 600 nm co 60 min. przez 6 h. Dane uzyskano z trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki pomiarów przedstawiono w formie wykresów przedstawionych na Figurach 3–6.

Uzyskane rezultaty pokazują, że testowane lipopeptydy według wynalazku znacząco spowalniają dynamikę wzrostu bakterii, zarówno gram-dodatnich, jak i gram-ujemnych. Dla szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 PCM 499 oraz *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, stężenia lipopeptydów rzędu 5,0 mg/l powodowały niemal całkowite zahamowanie wzrostu bakterii. W przypadku lipopeptydu referencyjnego jego wpływ na dynamikę wzrostu obydwu badanych szczepów bakterii był zdecydowanie słabszy niż obserwowano dla lipopeptydów o wzorach skróconych 1–3 według wynalazku.

Pomiar degradacji enzymatycznej lipopeptydów w surowicy krwi ludzkiej

Pomiary degradacji peptydów w surowicy krwi ludzkiej prowadzone były na wyjściowych roztworach peptydów z dodatkiem Z-Val-OH jako wzorca wewnętrznego. W celu przygotowania roztworów wyjściowych:

- odważono próbki peptydów;
- przygotowano roztwór wzorca wewnętrznego (Z-Val-OH) o stężeniu 60 $\mu\text{mol/ml}$, gdzie rolę rozpuszczalnika pełnił układ $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 30 : 70 (v/v);
- następnie przygotowano roztwory wyjściowe każdego z badanych lipopeptydów o stężeniu 70 $\mu\text{mol/ml}$ poprzez rozpuszczenie uprzednio zważonych porcji związków w odpowiedniej objętości roztworu wzorca wewnętrznego.

Układy pomiarowe mieszane były w 37°C z prędkością 450 rpm przy wykorzystaniu Thermomixera R firmy Eppendorf. Protokół pomiarów degradacji lipopeptydów w surowicy krwi ludzkiej obejmował:

1. Dodanie 10 μl roztworu wyjściowego peptydu do 690 μl surowicy krwi ludzkiej uprzednio inkubowanej w 37°C przez 10 minut (Thermomixer).
2. 15 sekundowe mieszanie (Vortex) mieszaniny surowicy z peptydem.
3. Pobranie 50 μl próbki – po wybranym przedziale czasowym.
4. Dodanie 200 μl układu do dezaktywacji serum ($\text{ACN} : \text{H}_2\text{O} : \text{FA}$ 89 : 10 : 1 v/v/v).
5. 20 sekundowe mieszanie (Vortex).
6. 20 minutowe chłodzenie w temperaturze 4°C.
7. 15 minutowe wirowanie w temperaturze 4°C (14000 rpm).
8. Pobranie 150 μl supernatantu.
9. Dodanie do, pobranego w pkt. 8, supernatanta 300 μl wody (czystości miliQ).
10. Liofilizowanie próbki.
11. Rozpuszczenie liofilizatu w 150 μl roztworu $\text{ACN} : \text{H}_2\text{O} : \text{FA}$ 20 : 80 : 0.1 v/v/v.
12. Poddanie próbki działaniu ultradźwięków oraz 10 sekundowemu mieszanii (Vortex).
13. 4 minutowe wirowanie (14000 rpm).
14. Pobranie 120 μl supernatantu.
15. Przeprowadzenie pomiaru HPLC (nastrzyk próbki 10 μl).
16. Trzykrotne powtórzenie procesu dla wszystkich 8 peptydów.

17. W przypadku analiz HPLC-MS nastrzyk wynosił 2 μ l – pomiary wykonano dla czasów degradacji wynoszących 48 oraz 96 godzin.

Wyniki pomiarów degradacji lipopeptydów w surowicy krwi przedstawiono w Tabeli 4, gdzie podane są czasy połowicznego zaniku wyjściowego substratu ($t_{1/2}$).

Tabela 4.

Nr wzoru	Wzór skrócony lipopeptydu	Czas połowicznego zaniku ($t_{1/2}$) w godzinach
1	CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	49
2	CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	37
3	CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	35
4	H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	56
5	H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	41
6	H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	48
7	H-Dab(CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	29
Lipopeptyd referencyjny	CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂	27

Wszystkie badane lipopeptydy według wynalazku ulegają degradacji enzymatycznej w ludzkiej surowicy krwi, tym niemniej jednak charakteryzują się one zwiększoną stabilnością metaboliczną, a czasy ich połowicznego zaniku wynoszą powyżej 27 godzin, który to czas obserwowany jest w przypadku lipopeptydu referencyjnego. Najkrótszym czasem charakteryzują się lipopeptydy zawierające najkrótsze łańcuchy kwasów tłuszczowych. Wszystkie lipopeptydy według wynalazku charakteryzują się jednak dłuższym czasem połowicznego zaniku niż lipopeptyd referencyjny, a zatem charakteryzują się zwiększoną stabilnością metaboliczną.

Wykaz sekwencji

<110> Uniwersytet Warszawski

<120> Lipopeptydy mające działanie przeciwbakteryjne, kompozycje farmaceutyczne i kosmetyczne zawierające takie lipopeptydy oraz zastosowania

<130> 17P46496PL00

<160> 4

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Sekwencja sztuczna

<220>

<223> Syntetyczny lipopeptyd liniowy o wzorze ogólnym

X1-Dab-X2-X3-Dab-Dab-X4-NH₂, w którym X1 oznacza

FA-DDab-Dab

<220>

<221> MUTAGEN

<222> 1..1

<223> X oznacza D-Dab z przyłączoną resztą kwasu tłuszczowego

<220>

<221> VARIANT

<222> 2..2

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 3..3

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 4..4

<223> X oznacza Leu, Ile, Ala albo Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 5..5

<223> X oznacza D-Phe, D-Tyr albo D-Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 6..6

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 7..7

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 8..8

<223> X oznacza Leu, Ile, Ala albo Val

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Sekwencja sztuczna

<220>

<223> Syntetyczny lipopeptyd liniowy o wzorze ogólnym

X1-Dab-X2-X3-Dab-Dab-X4-NH₂, w którym X1 oznacza

FA-DDab-Dab

<220>

<221> MUTAGEN

<222> 1..1

<223> X oznacza D-Dab z przyłączoną resztą kwasu tłuszczowego

<220>

<221> VARIANT

<222> 2..2

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 3..3

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 5..5

<223> X oznacza D-Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> 6..6

<223> X6 oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 7..7

<223> X oznacza Dab

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu

1

5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Sekwencja sztuczna

<220>

<223> Syntetyczny lipopeptyd rozgałęziony o wzorze
ogólnym X1-Dab-X2-X3-Dab-Dab-X4-NH₂, w którym X1
oznacza H-Dab(FA-DDab)

<220>

<221> VARIANT

<222> 1..1

<223> X oznacza H-Dab

<220>

<221> MUTAGEN

<222> 2..2

<223> X oznacza D-Dab z przyłączoną resztą kwasu tłuszczowego

<220>

<221> VARIANT

<222> 3..3

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 4..4

<223> X oznacza Leu, Ile, Ala albo Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 5..5

<223> X oznacza D-Phe, D-Tyr albo D-Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 6..6

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 7..7

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 8..8

<223> X oznacza Leu, Ile, Ala albo Val

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Sekwencja sztuczna

<220>

<223> Syntetyczny lipopeptyd rozgałęziony o wzorze

ogólnym X1-Dab-X2-X3-Dab-Dab-X4-NH₂, w którym X1

oznacza H-Dab(FA-DDab)

<220>

<221> VARIANT

<222> 1..1

<223> X oznacza H-Dab

<220>

<221> MUTAGEN

<222> 2..2

<223> X oznacza D-Dab z przyłączoną resztą kwasu tłuszczowego

<220>

<221> VARIANT

<222> 3..3

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 5..5

<223> X oznacza D-Phe, D-Tyr albo D-Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 6..6

<223> X oznacza Dab

<220>

<221> VARIANT

<222> 7..7

<223> X oznacza Dab

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu

Zastrzeżenia patentowe

1. Syntetyczny lipopeptyd o wzorze ogólnym:



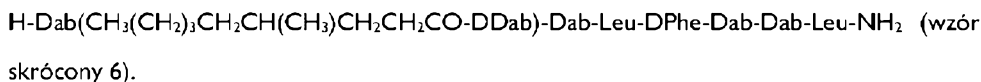
w którym

X₁ oznacza resztę wybraną spośród FA-DDab-Dab i H-Dab(FA-DDab), przy czym gdy X₁ oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy, gdy X₁ oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy; X₂ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny; X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu; i X₄ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

2. Lipopeptyd według zastrz. 1, **znamienny tym**, że X₁ oznacza FA-DDab-Dab, X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny.
3. Lipopeptyd według zastrz. 2, **znamienny tym**, że wybrany jest z grupy składającej się z:



4. Lipopeptyd według zastrz. 1, **znamienny tym**, że X₁ oznacza H-Dab(FA-DDab), X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny.
5. Lipopeptyd według zastrz. 4, **znamienny tym**, że wybrany jest z grupy składającej się z:



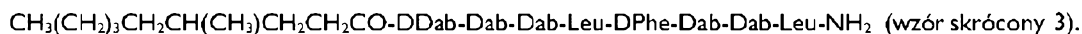
6. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd o wzorze ogólnym:



w którym

X₁ oznacza resztę wybraną spośród FA-DDab-Dab i H-Dab(FA-DDab), przy czym gdy X₁ oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy, gdy X₁ oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy; X₂ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny; X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu; X₄ oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

7. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 6, **znamienna tym**, że w lipopeptydzie X₁ oznacza FA-DDab-Dab, X₂ oznacza resztę leucyny, X₃ oznacza resztę D-feniloalaniny, a X₄ oznacza resztę leucyny.
8. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 7, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

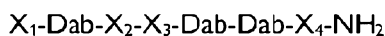


9. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 6, **znamienna tym**, że w lipopeptydzie X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab), X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.
10. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 9, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5), i

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6).
11. Kompozycja farmaceutyczna według dowolnego z zastrz. 6 do 10, **znamienna tym**, że zawiera od 0,1 do 99% wag. co najmniej jednego lipopeptydu.
12. Kompozycja farmaceutyczna według dowolnego z zastrz. 6 do 11, **znamienna tym**, że zawiera farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i/albo substancję rozcieńczającą i/albo środek pomocniczy i/albo zaróbkę.
13. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 12, **znamienna tym**, że zawiera skrobię kukurydzianą i/albo żelatynę, i/albo laktozę, i/albo sacharozę, i/albo mikrokryształiczną celulozę, i/albo kaolin, i/albo mannitol, i/albo fosforan diwapniowy, i/albo chlorek sodu, i/albo kwas alginowy.
14. Kompozycja farmaceutyczna według dowolnego z zastrz. 6 do 13, **znamienna tym**, że ma postać odpowiednią do podawania doustnego i/albo dożylnego i/albo domięśniowego, i/albo podskórnego, i/albo pozajelitowego.
15. Kompozycja farmaceutyczna według dowolnego z zastrz. 6 do 14, **znamienna tym**, że ma postać tabletki i/albo kapsułki, i/albo eliksiru, i/albo zawiesiny, i/albo syropu, i/albo żelu, i/albo kremu, i/albo maści.
16. Kompozycja kosmetyczna, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd o wzorze ogólnym:



w którym

X_1 jest wybrany spośród FA-DDab-Dab i H-Dab(FA-DDab), przy czym
 gdy X_1 oznacza FA-DDab-Dab to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy i kwas 4-metylononanowy,
 gdy X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab) to FA oznacza resztę kwasu tłuszczowego wybranego z grupy obejmującej kwas n-dodekanowy, kwas n-dekanowy, kwas 4-metylononanowy i kwas 4-metyloheksanowy;
 X_2 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny;
 X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, D-tyrozyny lub D-tryptofanu
 X_4 oznacza resztę leucyny, alaniny, izoleucyny lub waliny.

17. Kompozycja kosmetyczna według zastrz. 16, **znamienna tym**, że w lipopeptydzie X_1 oznacza FA-DDab-Dab, X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.
18. Kompozycja kosmetyczna według zastrz. 17, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 1),

CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 2), i

CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 3).
19. Kompozycja kosmetyczna według zastrz. 16, **znamienna tym**, że w lipopeptydzie X_1 oznacza H-Dab(FA-DDab), X_2 oznacza resztę leucyny, X_3 oznacza resztę D-feniloalaniny, a X_4 oznacza resztę leucyny.
20. Kompozycja kosmetyczna według zastrz. 19, **znamienna tym**, że zawiera lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5),

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6), i

H-Dab(CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 7).

21. Kompozycja kosmetyczna według dowolnego z zastrz. 16 do 20, **znamienna tym**, że zawiera od 0,1 do 99% wag. co najmniej jednego lipopeptydu.
22. Kompozycja kosmetyczna według dowolnego z zastrz. 16 do 21, **znamienna tym**, że zawiera nośnik kosmetyczny.
23. Kompozycja kosmetyczna według dowolnego z zastrz. 16 do 22, **znamienna tym**, że ma postać żelu albo kremu albo zawiesiny.
24. Lipopeptyd jak określono w dowolnym z zastrz. 1 do 5 do zastosowania jako lek.
25. Lipopeptyd jak określono w dowolnym z zastrz. 1 do 5 do zastosowania do leczenia lub profilaktyki infekcji bakteryjnej.
26. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 25, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię gram-dodatnią.
27. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 26, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię z rodzaju *Enterococcus* lub *Staphylococcus*.
28. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 27, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez *Staphylococcus aureus* lub *Staphylococcus epidermidis*.
29. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 25, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię gram-ujemną.
30. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 29, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez bakterię z rodzaju *Klebsiella* albo *Pseudomonas*.
31. Lipopeptyd do zastosowania według zastrz. 30, **znamienny tym**, że infekcja bakteryjna wywołana jest przez *Klebsiella pneumoniae* albo *Pseudomonas aeruginosa*.
32. Lipopeptyd do zastosowania według dowolnego z zastrz. 24 do 31, **znamienny tym**, że infekcja wywołana jest przez bakterię oporną na antybiotyk lub antybiotyki.
33. Lipopeptyd do zastosowania według dowolnego z zastrz. 24 do 31, **znamienny tym**, że stosowany jest co najmniej jeden lipopeptyd wybrany z grupy składającej się z:

CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 1),

CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 2),

CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab-Dab-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 3),

H-Dab(CH₃(CH₂)₉CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 4),

H-Dab(CH₃(CH₂)₇CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 5), i

H-Dab(CH₃(CH₂)₃CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂CO-DDab)-Dab-Leu-DPhe-Dab-Dab-Leu-NH₂ (wzór skrócony 6).

Figura 2

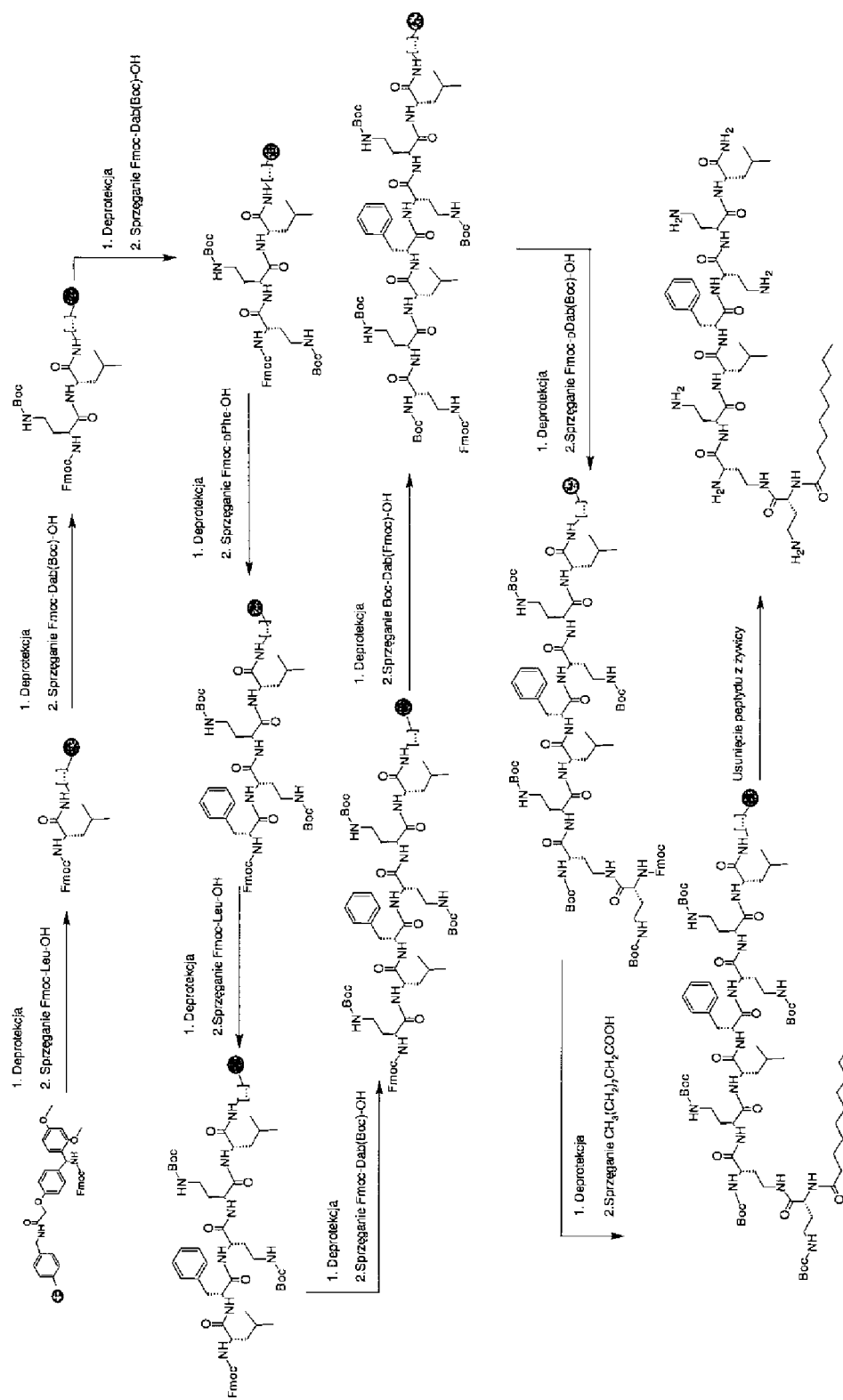
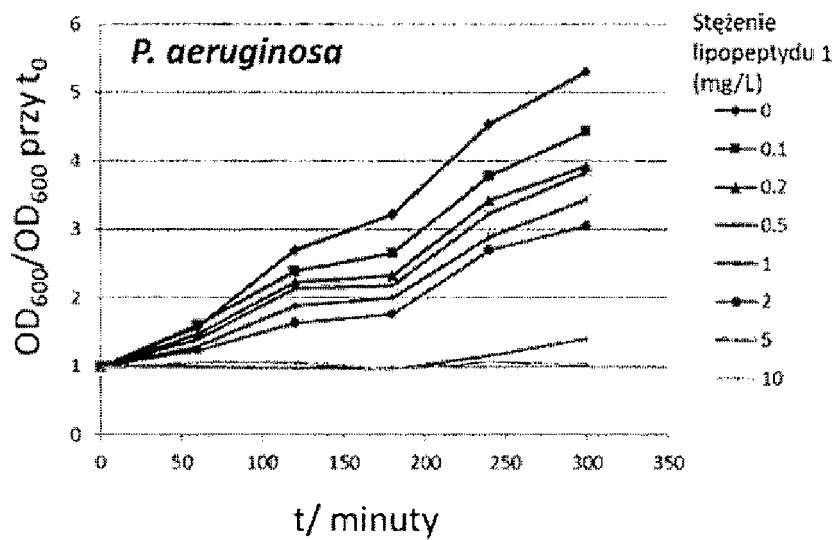


Figura 3

A



B

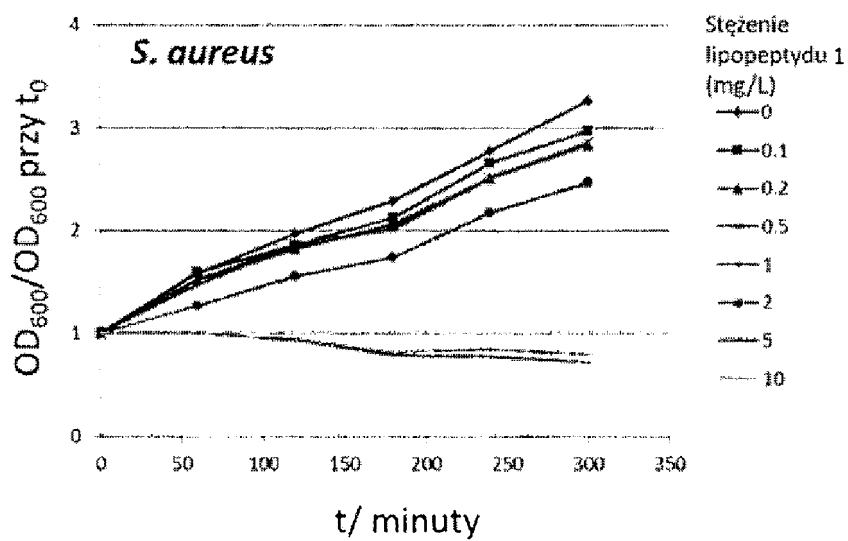
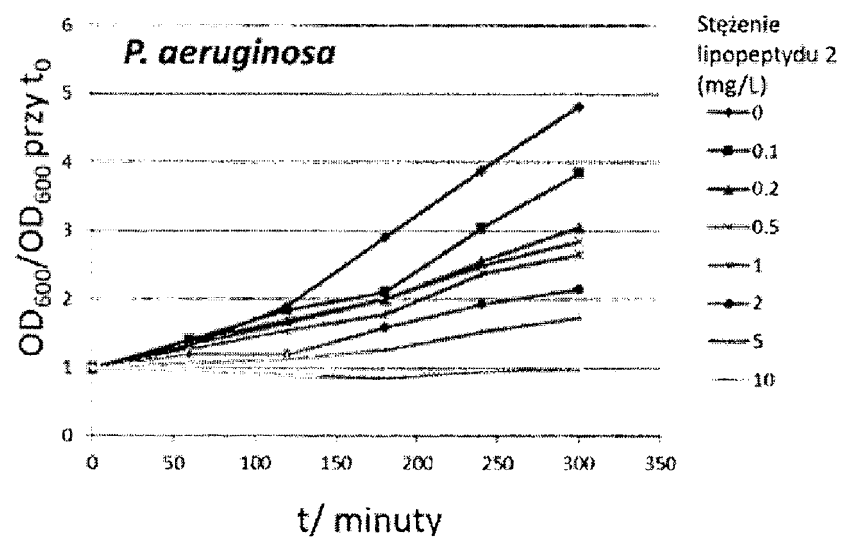


Figura 4

A



B

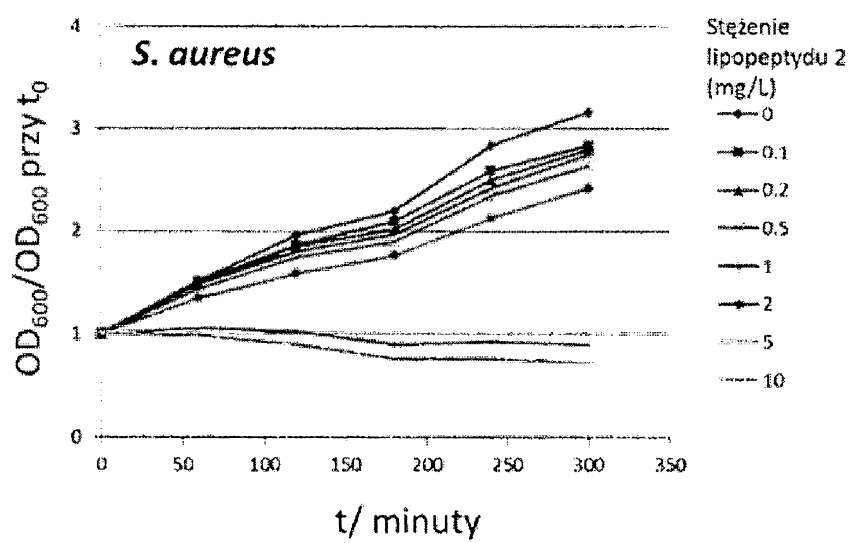
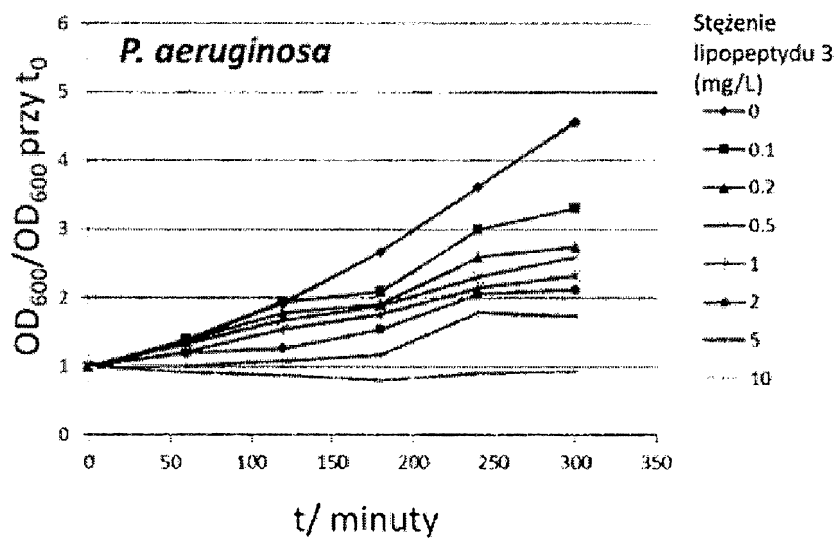


Figura 5

A



B

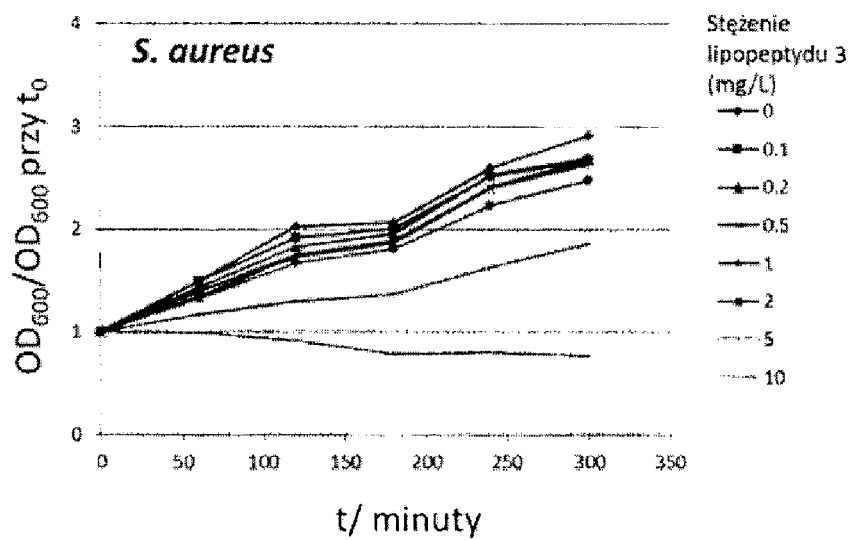
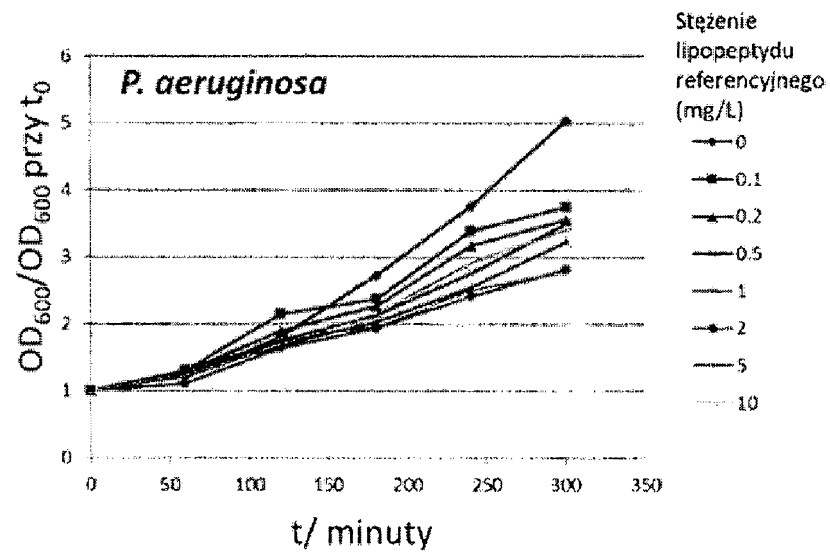


Figura 6

A



B

