

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MILIJANA GRUJIĆ

**SINTEZA IN PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST HIDROFOBNO  
MODIFICIRANEGA POLI(L-LIZINA)**

**SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF  
HYDROPHOBICALLY MODIFIED POLY(L-LYSINE)**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Milijana Grujić: Sinteza in protibakterijska aktivnost hidrofobno modificiranega poli(L-lizina)

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm.

Eksperimentalno delo sem opravljala na Kemijskem inštitutu Ljubljana, Odsek za polimerno kemijo in tehnologijo ter Odsek za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, pod somentorstvom dr. Eme Žagar.

## Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm. in somentorice dr. Eme Žagar.

Milijana Grujić

**Predsednik magistrske komisije:** izr. prof. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

**Mentorica:** prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

**Somentorica:** dr. Ema Žagar

**Član magistrske komisije:** doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

## Zahvala

*Noben dan ni enak drugemu  
in vsako jutro ima svoj posebni čudež,  
svoj čarobni trenutek,  
v katerem ponikajo stara stvarstva  
in se rojevajo nove zvezde.*

-Paulo Coelho

Rada bi se zahvalila mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin za strokovno svetovanje in potrpežljivost.

Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorici dr. Emi Žagar za dolgoletno sodelovanje, tako pri diplomski nalogi kot pri magistrskem delu. Za pomoč, nasvete in usmerjanje se najlepše zahvaljujem dr. Davidu Pahovniku.

Posebno zahvalo pa namenjam svoji družini – mami in očetu, ki sta verjela v moj uspeh.

Hvala vsem, ki ste mi pomagali pri odločitvah, me spodbujali in stali ob strani na poti do mojega čarobnega trenutka.

## Kazalo vsebine

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. ANTIBIOTIKI IN ODPORNOST BAKTERIJ NA ANTIBIOTIKE	1
1.2. PROTIMIKROBNI PEPTIDI	2
1.2.1. Strukturne značilnosti protimikrobnih peptidov	3
1.2.2. Zgradba membran sesalskih in bakterijskih celic	3
1.2.3. Mehanizmi delovanja protimikrobnih peptidov	4
1.2.4. Sintezni protimikrobeni polimeri	5
1.3. SINTEZA PROTIMIKROBNIH POLIPEPTIDOV	8
1.3.1. Sinteza <i>N</i> -karboksianhidridov $\alpha$ -aminokislin in polimerizacija z odpiranjem obroča <i>N</i> -karboksianhidridov $\alpha$ -aminokislin	9
<b>2. NAMEN DELA</b>	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIALI IN OPREMA	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Topila	12
3.1.3. Raztopine, gojišča, bakterije, celice	13
3.1.4. Oprema	13
3.2. SINTEZA KVATERNIZIRANEGA POLI(L-LIZINA)	14
3.2.1. Sinteza $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrida (ZLL NCA)	14
3.2.2. Sinteza poli( $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizina) (PZLL)	14
3.2.3. Sinteza poli(L-lizina) (PLL) z reakcijo odščite PZLL	15
3.2.4. Dimetilacija PLL z Eschweiler-Clarkovo reakcijo (PDMLL)	15
3.2.5. Kvaternizacija PDMLL z oktiljodidom in metiljodidom (qPLL)	16
3.3. KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH POLIMEROV	17
3.4. VREDNOTENJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA	18
3.5. HEMOLIZNA AKTIVNOST	19

<b>4. REZULTATI IN DISKUSIJA</b>	<b>21</b>
4.1. SINTEZA POLI(L-LIZINA)	21
4.1.1. Sinteza N <sup>c</sup> -Z-L-lizin N-karboksianhidrida (ZLL NCA)	21
4.1.2. Sinteza poli(N <sup>c</sup> -Z-L-lizina) (PZLL)	22
4.1.3. Sinteza poli(L-lizina) (PLL) z reakcijo odščite PZLL	23
4.2. MODIFIKACIJA POLI(L-LIZINA)	23
4.2.1. Dimetilacija PLL z Eschweiler-Clarkovo reakcijo (PDMLL)	23
4.2.2. Kvaternizacija PDMLL z oktiljodidom in metiljodidom (qPLL)	24
4.3. PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	26
4.3.1. Protibakterijsko delovanje polilizinov na <i>B. subtilis</i>	27
4.3.2. Protibakterijsko delovanje polilizinov na <i>E. coli</i>	28
4.3.3. Vpliv prisotnosti polilizinskih derivatov na kinetiko rasti <i>E. coli</i> in <i>B. subtilis</i>	30
4.4. HEMOLIZNA AKTIVNOST	32
<b>5. ZAKLJUČEK</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>37</b>

## Kazalo slik

<b>Slika 1:</b> Prikaz delovanja antibiotikov in protimikrobnih peptidov .....	3
<b>Slika 2:</b> Prikaz strukturnih razlik med membranami bakterijskih in sesalskih celic.....	4
<b>Slika 3:</b> Prikaz razporeditve hidrofobnih in kationskih skupin na polipeptidni verigi .....	6
<b>Slika 4:</b> Sinteza N-karboksianhidrida iz aminokisline.....	9
<b>Slika 5:</b> Polimerizacija N-karboksianhidrida .....	10
<b>Slika 6:</b> Struktura antibiotika ampicilin.....	19
<b>Slika 7:</b> Struktura Triton X-100.....	20
<b>Slika 8:</b> $^1\text{H}$ NMR spekter ZLL NCA .....	21
<b>Slika 9:</b> SEC-MALS kromatogram PZLL in MALDI-TOF masni spekter PZLL .....	22
<b>Slika 10:</b> Sinteza ZLL NCA, PZLL in PLL.....	23
<b>Slika 11:</b> Dimetilacija PLL in kvaternizacija PDMLL .....	23
<b>Slika 12:</b> $^1\text{H}$ NMR spektri PLL z različnimi deleži oktilnih verig.....	25
<b>Slika 13:</b> CD spektri PLL, PDMLL, PTMLL in qPLL.....	25
<b>Slika 14:</b> OD <sub>600</sub> vrednosti za <i>E. coli</i> in <i>B. subtilis</i> .....	27
<b>Slika 15:</b> DLS rezultati za qPLL <sub>12%</sub> .....	29
<b>Slika 16:</b> Kinetika bakterijske rasti <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> .....	31
<b>Slika 17:</b> Hemolizna aktivnost PLL, PDMLL, PTMLL ter kvaterniziranih PLL.....	33
<b>Slika 18:</b> Kinetični profil hemolize PLL derivatov .....	34

## Seznam kratic

A	absorbanca
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CD	circularni dikroizem
$\delta$	kemijski premik [ppm]
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DP <sub>n</sub>	povprečna številčna stopnja polimerizacije
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOAc	etilacetat
Et <sub>2</sub> O	dietileter
LB gojišče	Luria-Bertani gojišče
M	molska masa [g/mol]
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
$M_n$	številčno povprečje molske mase [g/mol]
$M_w$	utežno povprečje molske mase [g/mol]
NCA	<i>N</i> -karboksianhidrid
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri 600 nm
NMR	jedrska magnetna resonanca
PDI	polidisperzni indeks
PDMLL	dimetiliran poli(L-lizin)
PLL	poli(L-lizin)
PMP	protimikrobnii peptidi
PTMLL	trimetil poli(L-lizin)
PZLL	poli( <i>N</i> <sub>ε</sub> -Z-L-lizin), poli( <i>N</i> <sub>ε</sub> -benziloksikarbonil-L-lizin)
qPLL	kvaterniziran polilizin

$\rho$	gostota [g/cm <sup>3</sup> ]
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TFA	trifluoroocetna kislina
ZLL	<i>N</i> <sup>c</sup> -Z-L-lizin, <i>N</i> <sup>c</sup> -benziloksikarbonil-L-lizin

## Povzetek

Odkritje antibiotikov je izjemno spremenilo zdravljenje bakterijskih okužb. Prav zaradi njihove razširjene uporabe, je eden izmed največjih problemov s katerim se sooča moderna medicina, odpornost bakterij proti obstoječim antibiotikom, do česar pride zaradi hitrih mutacij bakterij. Zaradi tega je zadnja leta v farmaciji, medicini in biomedicini zanimivo področje naravnih, polsinteznih in sinteznih polimernih materialov s protimikrobnim delovanjem.

V okviru magistrske naloge je bil naš cilj sintetizirati derivate poli(L-lizina) (PLL) in raziskati vpliv po-polimerizacijskih modifikacij na njihovo protibakterijsko delovanje in toksičnost. PLL smo pripravili s polimerizacijo z odpiranjem obroča cikličnega *N*-karboksianhidrida, ki smo ga pripravili s ciklizacijo ustrezena zaščitenega *N*<sup>c</sup>-Z-L-lizina. Zaščiten PLL smo odščitili pri kislih razmerah in nato dimetilirali stranske aminske skupine z Eschweiler-Clarkovo reakcijo. Aminske skupine smo zatem še kvaternizirali z metilnimi skupinami oziroma z zmesjo metilnih in oktilnih skupin. Kot produkt smo dobili vodotopne, amfifilne, kvaternizirane PLL derivate z različnim deležem oktilnih verig na polipeptidni verigi, in sicer 0 %, 12 %, 20 %, 31 % in 38 %.

Sledilo je testiranje protibakterijskega delovanja sintetiziranih spojin, za kar smo uporabili modelne bakterije *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*, pri čemer smo raziskali vpliv vrste aminske skupine, deleža hidrofobnih skupin in koncentracije polimera na protibakterijsko delovanje. Vse sintetizirane spojine so imele dobro protibakterijsko delovanje, ki je bilo koncentracijsko odvisno ter pogojeno z deležem oktilnih verig v strukturi, pri čemer so imele spojine z večjim deležem oktilnih skupin boljše protibakterijsko delovanje. Izkazalo se je, da je bilo protibakterijsko delovanje vseh spojin na bakterije *B. subtilis* precej boljše kot na bakterije *E. coli*.

Ker se lahko polimeri s protibakterijskim delovanjem uporabljajo za aplikacijo na koži in sluznicah, smo testirali toksičnost sintetiziranih produktov s hemoliznim testom. Rezultati so pokazali, da se podobno kot pri testu na bakterijah, z večanjem deleža oktilnih verig v strukturi veča tudi hemolizna aktivnost. Zaključili smo, da izkazuje kvaterniziran poli(L-lizin) z 20-odstotnim deležem oktilnih verig v strukturi optimalno protibakterijsko aktivnost proti *B. subtilis* in najmanjšo hemolizno aktivnost med vsemi sintetiziranimi kvaterniziranimi polipeptidi.

Rezultati protibakterijskih in hemoliznih testov nakazujejo na pomembnost ustreznega razmerja med kationskimi in hidrofobnimi skupinami v strukturi sintetiziranega polipeptida, saj smo s tem dosegli najbolj ugodno selektivnost za bakterije.

## Abstract

Discovery of antibiotics has extremely changed the treatment of bacterial infections. Unfortunately, improper use of antibiotics has caused a rapid spread of bacterial resistance which now poses a great threat to healthcare systems. Because of that the research in medicine, biochemistry and pharmaceutical industry is already focused on searching for new mechanisms of action of antibacterial drugs. Natural, semi-synthetic and synthetic polymers with antibacterial properties are therefore very interesting as a promising replacement for antibacterial drugs.

The goal of our work was to synthesize antibacterial derivatives of poly(L-lysine) (PLL) and to study the effect of post-polymerization modifications on their antibacterial activity and toxicity. Poly(L-lysine) was synthesized by ring-opening polymerization of *N*-carboxyanhydride, prepared by cyclization of appropriately protected *N*<sup>c</sup>-Z-L-lysine. Protected PLL was first deprotected under acidic conditions, followed by post-polymerization dimethylation of pendant amine groups by Eschweiler-Clarke reaction, and followed by quaternization of dimethylated amino groups with the methyl iodide or a mixture of the methyl and octyl iodide. In this way, a series of water-soluble, same centered, amphiphilic, quaternized derivatives of poly(L-lysine), containing 0 %, 12 %, 20 %, 31 % and 38 % of hydrophobic groups, was synthesized.

Antibacterial and hemolytic properties of poly(L-lysine) derivatives were studied in dependence of the amine group type, content of the hydrophobic octyl groups and polymer concentration. The quaternized poly(L-lysine) derivatives with hydrophobic octyl groups in the structure exhibit excellent antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, but are significantly less active against *Escherichia coli* bacteria. The toxicity of synthesized products was tested by hemolytic tests. Similar results were obtained for the study of hemolytic activity, where higher degree of octyl groups also increased hemolytic activity. Product containing 20 % of hydrophobic groups revealed optimal ratio between antibacterial and hemolytic activities.

The results of this thesis disclose that optimal antimicrobial activity and low hemolytic activity of the quaternized poly(L-lysine) derivatives against different bacteria type can be achieved by appropriate balancing the proportions of the cationic and hydrophobic groups in the polypeptide structure.

## 1. UVOD

### 1.1. ANTIBIOTIKI IN ODPORNOST BAKTERIJ NA ANTIBIOTIKE

Neselektivni biocidi kot so žveplov dioksid, etanol in baker, so se uporabljali že dolgo prej, preden so bile bakterije prepoznane kot glavni povzročitelj infekcij. Danes je glavni cilj zdravljenja bakterijskih okužb selektivno uničevanje ali zaviranje razmnoževanja patogenov, s čim manj neželenimi učinki za paciente.

Za protibakterijske učinkovine je zaželeno, da so selektivno toksične, kar pomeni, da delujejo le na povzročitelje bolezni tj. bakterije, ne pa na gostiteljske celice. Pomembnejši termini so še: terapevtski in toksični odmerek, ter terapevtski indeks. Terapevtski odmerek je količina zdravilne učinkovine v določeni farmacevtski obliki za zdravljenje določene infekcije. Toksični odmerek predstavlja količino zdravilne učinkovine v določeni farmacevtski obliki, ki po statistiki pri določenem številu ljudi povzroči toksične učinke. Terapevtski indeks pa predstavlja razmerje med minimalno toksično in minimalno terapevtsko koncentracijo zdravilne učinkovine, pri čemer večji terapevtski indeks predstavlja bolj varno učinkovino. Želeno je, da imajo učinkovine, ki delujejo proti bakterijam, selektivno toksičnost in velik terapevtski indeks, torej imajo čim manjši vpliv na pacienta.

Pogosto uporabljeni antibiotiki imajo različne terapevtske indekse in mehanizme delovanja. Glede na delovanje sodijo med glavne skupine antibiotikov inhibitorji sinteze celične stene, inhibitorji sinteze proteinov, inhibitorji sinteze nukleinskih kislin, antimetaboliti in snovi, ki porušijo sestavo celične membrane. Nekatere bakterije in glice so sposobne same proizvajati antibiotike, še vedno pa je večina antibiotikov proizvedenih sintezno. Poznamo tudi polysintezne antibiotike, ki so naravnii antibiotiki z dodanimi skupinami, ki patogenom preprečujejo inaktivacijo antibiotika. Prav zaradi odpornosti bakterij proti obstoječim antibiotikom, bo vedno bolj razširjena proizvodnja novih polysinteznih antibiotikov (1, 2).

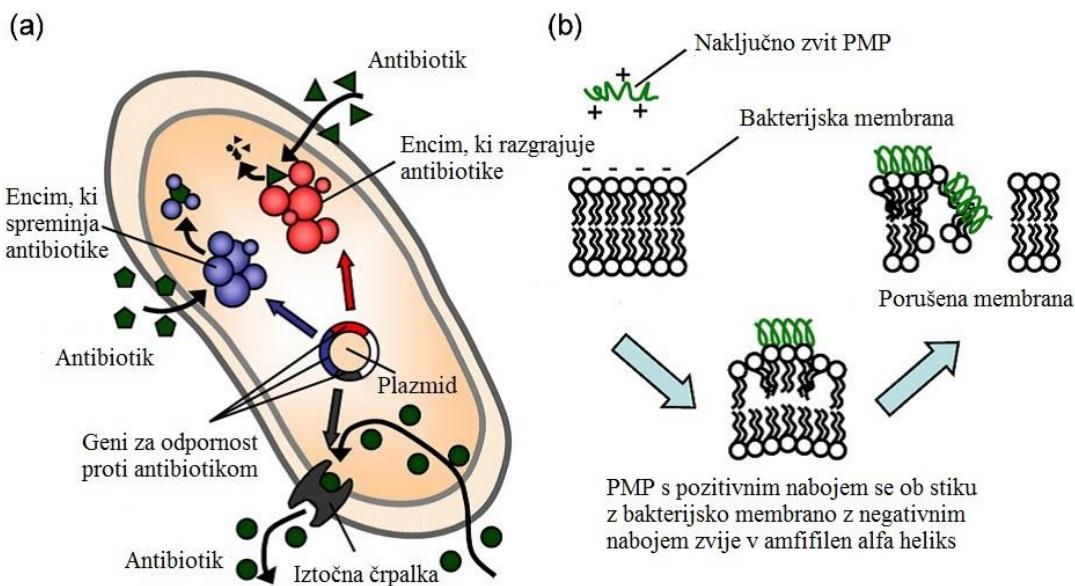
Protimikrobne spojine so lahko ozkospikalne ali širokospikalne, prav tako lahko delujejo na različne skupine mikroorganizmov: bakterije, glice ali viruse. Njihovo delovanje je lahko stazno, kar pomeni, da reverzibilno inhibirajo rast mikroorganizmov, ali cidno, pri čemer pride do uničenja mikroorganizma, hkrati pa je delovanje cidnih spojin koncentracijsko odvisno.

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je število smrti, do katerih pride zaradi okužb, ki jih povzročajo bakterije, virusi in glice vedno večje. Eden izmed največjih problemov, s katerim se sooča moderna medicina, je prav odpornost bakterij proti obstoječim antibiotikom, do česar pride zaradi hitrih mutacij bakterij in njihove adaptacije zaradi povečane in pretirane uporabe antibiotikov. Prav tako pa je razvoj novih antibiotikov, ki bi nadomestili že obstoječe in slabše deluječe, počasen. Zaradi tega je zadnja leta v farmaciji, medicini in biomedicini zanimivo področje naravnih, polsinteznih in sinteznih polimernih materialov s protimikrobnim delovanjem (3, 4).

## **1.2. PROTIMIKROBNI PEPTIDI**

Protimikrobni peptidi (PMP) predstavljajo del prirojenega imunskega sistema v insektih, živalih in ljudeh. Imajo širok spekter delovanja proti patogenim bakterijam in glivam, pogosto pa delujejo tudi na viruse, parazite in celo proti rakavim celicam. Lahko imajo različno aminokislinsko sestavo, dolžino in sekundarno strukturo, vsi pa so amfifilne narave in se vežejo na membrane bakterij (slika 1b). Mesto njihovega delovanja naj bi bili različni procesi, ki so ključni za preživetje bakterije. Prednost PMP pred klasičnimi antibiotiki je, da bakterije na njih težje razvijejo odpornost z gensko mutacijo. Zaradi tega kationski PMP predstavljajo potencialno alternativo antibiotikom (slika 1a) (5, 6, 7).

Vsi PMP imajo dve pomembni lastnosti: pozitiven naboj in hidrofobne aminokislinske ostanke, zaradi katerih se selektivno vežejo na bakterijske membrane, ki imajo negativen naboj. V nasprotju imajo membrane celic sesalcev skupni naboj enak 0 (ion dvojček).



**Slika 1:** a) Prikaz delovanja antibiotikov b) Prikaz delovanja protimikrobnih peptidov (povzeto po 6)

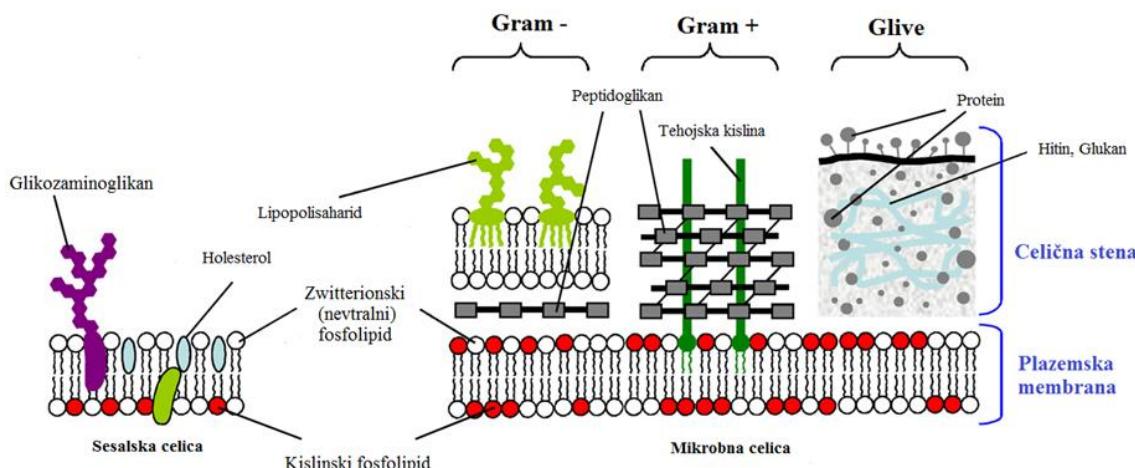
### 1.2.1. Strukturne značilnosti protimikrobnih peptidov

Prvi PMP so bili izolirani že okoli leta 1950, zanimivo področje raziskovanja pa so postali v zadnjih 30 letih. Med tem časom je bilo v različne podatkovne baze protimikrobnih peptidov uvrščenih že več kot 1000 peptidov. Posebnost PMP je njihova amfifilna struktura, kar pomeni, da vsebujejo tako pozitivno nabite kationske, kot tudi hidrofobne aminokislinske ostanke. Kationski PMP so sestavljeni iz 2-59  $\alpha$ -aminokislin, pri čemer prevladujeta bazični aminokislini lizin in arginin, ter hidrofobne aminokisline fenilalanin, triptofan in levcin. Razmerje med hidrofobnimi aminokislinami in aminokislinami z nabojem je od 1:1 do 1:2. Znane so štiri različne strukture PMP, do nastanka katerih pride ob interakciji z membrano ali pa se tvorijo že predhodno, in sicer  $\beta$ -struktura,  $\alpha$ -heliks, zanka in nezvita struktura (8, 9).

### 1.2.2. Zgradba membran sesalskih in bakterijskih celic

Za razumevanje delovanja protimikrobnih peptidov na membrane mikroorganizmov je treba poznati strukturne razlike med membranami bakterijskih in sesalskih celic. Na splošno so biološke membrane zgrajene iz fosfolipidov kot so: fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilglicerol in sfingomielin. Pri fiziološkem pH imata samo fosfatidilserin in fosfatidilglicerol negativen naboj, vsi drugi pa so v obliki iona dvojčka (skupni naboj je 0). Membrani sesalskih in mikrobnih celic (slika 2) se razlikujeta tako po sestavi kot po zgradbi. Pomembna razlika je celična stena, saj jo celice mikroorganizmov

imajo, sesalske celice pa ne. Pri sesalskih celicah je zunanji sloj lipidnega dvosloja sestavljen iz fosfatidilholina in sfingomielina, kar prispeva k nevtralnemu skupnemu naboju, notranji sloj pa je dodatno še iz fosfatidilserina, ki ima negativen naboj (6).



**Slika 2:** Prikaz strukturnih razlik med membranami bakterijskih in sesalskih celic (povzeto po 6)

Za razliko pa je pri celicah mikroorganizmov fosfatidilserin tudi v dvosloju notranje membrane in ji tako daje negativen naboj. Prav to prispeva k selektivnosti kationskih protimikrobnih snovi, ki delujejo na membrane celic mikroorganizmov. Celična stena ima različno sestavo pri različnih mikroorganizmih, kar dodatno prispeva k vrstno specifičnemu delovanju protimikrobnih peptidov.

Razlika med celično steno Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij je debelina peptidoglikanskega sloja. Pri Gram-pozitivnih bakterijah je debel približno 20-80 nm in predstavlja skoraj 90 % celične stene, pri Gram-negativnih bakterijah pa le 15-20 % (10 nm). Pri Gram-pozitivnih bakterijah je na fosfolipidni dvosloj pripeta še tehojska kislina, ki sega skozi peptidoglikanski sloj vse do površja in s tem prispeva k dodatnemu negativnemu naboju na površini celice. Pri Gram-negativnih bakterijah je prisoten še dodaten fosfolipidni dvosloj, ki predstavlja zunanjo membrano bakterij in lipopolisaharidi.

### **1.2.3. Mehanizmi delovanja protimikrobnih peptidov**

Za uspešno delovanje PMP se morajo ti najprej pripeti na površino bakterij. PMP najverjetneje najprej tvorijo polielektrolitske komplekse s peptidoglikanom in/ali lipopolisaharidi v zunanji membrani mikrobov, kar jim pomaga pri migraciji do celične membrane. Tam se s kationskim delom vgradijo na hidrofilni del lipidnega dvosloja, nakar sledi vezava hidrofobnega dela PMP na hidrofobni del membrane.

Znana naj bi bila dva različna mehanizma delovanja protimikrobnih peptidov na membrane, in sicer porušenje membran s tvorbo por in mehanizem, kjer se pore ne tvorijo (10). Pore v celični membrani mikroorganizmov se lahko tvorijo na več načinov, kar je odvisno od koncentracije peptidov, ki so prisotni na membrani. Pri povečani koncentraciji peptidov lahko pride do tvorbe pore v obliki sodčka. Tvorijo se specifične peptid-peptid interakcije, pri tem pa v membrani mikroorganizma nastanejo majhne nanopore s premerom 1-2 nm. Če pride do vgradnje peptidov med lipide membrane, nastanejo 3-10 nm velike pore, skozi katere lahko prehaja voda (toroidni model). Kako velike pore bodo nastale pri toroidnem modelu, je odvisno tudi od stanja same membrane oziroma od okolja, v katerem je celica, medtem ko se pri tvorbi por v obliki sodčka vedno tvorijo pore istih velikosti. Pri obeh modelih nastanejo stabilne pore v zunanjji ovojnici celic, kar vodi do porušenja homeostaze, celičnega metabolizma in tudi v celično smrt.

Pri mehanizmu, kjer se ne tvorijo pore v membrani celic, pride do delovanja PMP na sami površini mikrobnih celic. Pri povečani koncentraciji peptidov, pride do razporeditve teh po površini membrane v obliki preproge in do nastanka velikih napak v membrani ( $> 10$  nm). Možno je tudi porušenje integritete membrane (detergent model), kjer se navadno tvorijo velike površinske napake. Do tega pride pri uporabi protimikrobnih peptidov, ki se sami organizirajo v nanostrukture. Možni so še drugi načini porušenja membran, navadno pa do porušenja pride s kombinacijo različnih mehanizmov (5, 6, 10).

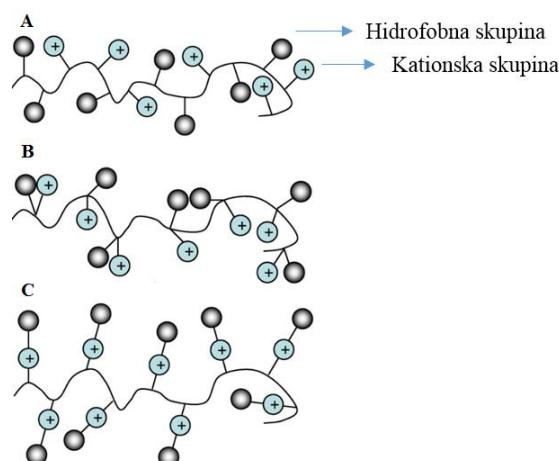
#### **1.2.4. Sintezni protimikrobni polimeri**

Naravni protimikrobni peptidi imajo dobro protimikrobno delovanje, dobro kompatibilnost s celicami in majhno verjetnost za pojav odpornosti. A kljub temu je njihova uporaba omejena, saj jih je zaradi definirane sekvence treba sintetizirati na trdih nosilcih oziroma rekombinantno, kar pa je zelo težaven in drag proces. Zato so raziskave usmerjene v iskanje in sintezo kationskih polimernih materialov s podobnimi lastnostmi, kot jih imajo PMP. Poleg protibakterijskih lastnosti so le ti zanimiv tudi za različna druga terapevtska področja, kot so dostava genov, dostava zdravilnih učinkovin in tkivno inženirstvo. Naravni polimeri, kot so hitosan, želatina, dekstran in celulozni derivati so sicer dobra izbira, saj so netoksični, biokompatibilni, biorazgradljivi in izražajo majhno imunogenost, vendar razen hitosana po naravi niso kationski in jih je zato treba ustrezno kemijsko modificirati. To je velik izziv, saj vsebujejo veliko število različnih funkcionalnih skupin in jih je težko kontrolirano in ponovljivo modificirati. Na drugi strani pa so znani sintezni kationski polimeri, ki imajo

zaradi dobro ponovljive sinteze konstantno strukturo in ustrezone lastnosti. V strukturo lahko vgradimo poljubne aktivne skupine, poleg tega pa lahko vplivamo tudi na njihovo biorazgradljivost, ki je odvisna od glavne verige polimera. Tako npr. polietilenamini, akrilati in norborneni niso biorazgradljivi, na drugi strani pa so sintezni polipeptidi biorazgradljivi (11, 12, 13).

Poleg kationskih skupin, ki omogočajo selektivno vezavo na mikrobne celice, morajo imeti sintezni protimikrobnii polimeri, ki porušijo integriteto mikrobnih membran še druge ustrezne elemente kot sta ustrezni kontakt s celično steno mikroorganizmov in hidrofobne dele za vgradnjo v membrano. Med faktorje, ki vplivajo na aktivnost in selektivnost protimikrobnih polimerov, sodijo hidrofobno/hidrofilno razmerje, vrsta hidrofobne skupine, kationski del in molekulska masa (6).

Hidrofilni del protimikrobnih polimerov je navadno pozitivno nabiti del polimera, hidrofobni del pa predstavlja alkilna veriga oziroma aromatske skupine (Slika 3). Polimer v stiku z membrano mikroorganizma zavzame amfifilno strukturo, kjer pride na eni strani do interakcij med kationskim delom polimera in membrano mikroorganizma z negativnim nabojem, na drugi strani pa hidrofobni del polimera interagira z lipidnimi deli membrane mikroorganizma. Hidrofobne in kationske skupine so lahko znotraj polimerne verige razporejene na različne načine. Tako so lahko hidrofobne skupine na različnih monomernih enotah kot hidrofilne (kopolimeri) (slika 3A), ali pa sta obe skupini vezani na isto ponavljanjočo enoto. V tem primeru sta lahko skupini na različnih delih ponavljanjoče enote (slika 3B), ali pa je hidrofobna skupina pripeta neposredno na kationsko skupino, kot je to na primer v kvaternih amonijevih skupinah (slika 3C) (6, 14, 15).



**Slika 3:** Shematski prikaz možne razporeditve hidrofobnih in kationskih skupin na polipeptidni verigi (povzeto po 6)

Večina protimikrobnih polimerov na osnovi polimetakrilatov, polimetakrilamidov, polibetalaktamov, sinteznih polipeptidov (iz *N*-karboksianhidridov), polinorbornenov in polikarbonatov je pripravljenih s kopolimerizacijo kationskih in hidrofobnih monomerov. Za selektivnost polimerov sta pomembna delež in vrsta hidrofobnih zvrsti, ter tudi sama dolžina hidrofobnih verig. Spreminjanje stranskih skupin ima večji vpliv na hemolizno kot na protimikrobovno aktivnost. Ugotovili so tudi, da so blok kopolimeri manj hemolizno aktivni kot naključni kopolimeri (15).

Literatura navaja, da imajo bolj hidrofobni polimeri boljše protimikrobove lastnosti, a so s tem posledično tudi bolj hemolizno aktivni (16). Prav tako so imeli polimeri z manjšimi molekulskimi masami protimikrobovni učinek na *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*, polimeri z večjo molekulsko maso (10 kDa) pa na *E. coli* niso delovali več. Delovanje na bakterije je bilo odvisno tudi od dolžine stranske hidrofobne verige – protibakterijska aktivnost je pri derivatih hitosana naraščala z daljšanjem alkilne verige, od metilne do propilne, nato pa od propilne do heksilne zopet upadala. Hemolizna aktivnost je z daljšanjem stranske verige prav tako naraščala, pri čemer je bil derivat hitosana z etilno stransko skupino najbolj selektiven (16).

Med polimere, kjer so hidrofobne alkilne verige pripete neposredno na kationsko skupino v polimeru, ki je lahko fosfonijev ion ali kvaterni amonijev ion, sodijo: kvaterniziran hitosan, politrialkilvinilbenzilamonijevi kloridi, poliamidi, kvaternizirani polipeptidi in kvaternizirani amonijevi polimetakrilati. Proučevali so delovanje polinorbornenov s pripetimi piridinijevimi skupinami in stranskimi alkilnimi verigami z dolžino od C2-C10, na bakterijah *E. coli* in *B. subtilis* ter eritrocitih. Izkazalo se je, da so polimeri s krajšimi alkilnimi verigami slabše protibakterijsko in hemolizno aktivni, tisti z daljšimi pa bolj. Največji vpliv na bakterije so imeli polimeri z alkilnimi verigami dolžine C8, a so imeli obenem tudi večjo toksičnost (17).

Molekulska masa vpliva na protimikrobovno in hemolizno aktivnost, v odvisnosti od vrste polimera in vrste mikroorganizmov. Polimeri z večjo molekulsko maso izkazujejo boljšo protibakterijsko aktivnost, in sicer so bolje delovali na bakterije *S. aureus* kot na bakterije *E. coli* (18).

### 1.3. SINTEZA PROTIMIKROBNIH POLIPEPTIDOV

Cilj priprave sinteznih protimikrobnih polipeptidov je čim boljše posnemanje delovanja naravnih protimikrobnih polipeptidov na bakterije (19, 20). Peptide s točno določenim zaporedjem aminokislin sintetiziramo s tehniko na trdnem nosilcu (Merrifield sinteza), ki omogoča odstranjevanje nezreagiranih aminokislin od peptida, vezanega na nosilcu, s preprostim spiranjem (21, 22). S tem zagotovimo, da imajo sintetizirani peptidi želeno aminokislinsko zaporedje, vendar je slabost te vrste sinteze, da lahko pripravimo le peptide omejenih molskih mas. Zaradi nujnih reakcij zaščite in odščite je omenjena sinteza povezana z velikimi stroški, slabimi izkoristki in obremenjena z možnimi stranskimi reakcijami, zlasti v primeru sintez daljših peptidov.

Za sintezo polipeptidov, pri katerih ni nujno natančno določeno zaporedje aminokislin, uporabljamo polimerizacijo z odpiranjem obroča *N*-karboksianhidridov  $\alpha$ -aminokislin (NCA). S tem postopkom dosežemo velike izkoristke sinteze, polipeptidi pa imajo kontrolirano in ozko porazdelitev molskih mas (22, 23). Sintezne polipeptide so že uporabili v različne biomedicinske namene, kot na primer za nosilce majhnomolekulskih in velikomolekulskih zdravilnih učinkovin, saj se polipeptidi v telesu metabolizirajo do netoksičnih produktov.

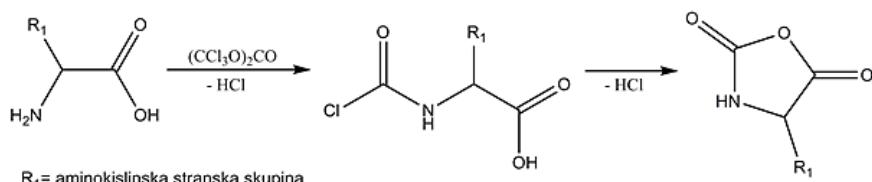
Stranske funkcionalne skupine polipeptidov lahko tudi modificiramo in tako prilagajamo lastnosti nosilca želenim. Način modifikacije je odvisen od vrste aminokislin, ki so vgrajene v homopolipeptide oziroma kopolipeptide (24). V protimikrobnih polipeptidih je kationski del navadno primarna aminska skupina ali gvanidinska skupina, lahko pa so to tudi kvaterne amonijeve in fosfonijeve soli (25). Različne študije navajajo, da imajo največji protimikroben učinek primarne aminske skupine, zlasti so učinkovite na bakterije *E. coli*. Za večjo protimikrobo aktivnost pri kvaternih amonijevih skupinah pa je bilo treba povečati delež hidrofobnih skupin v polimeru. S polimerizacijo z odpiranjem obroča *N*-karboksianhidridov so tako pripravili naključne kopolimere lizina, alanina, fenilalanina in levcina, ki so izkazali dobro protibakterijsko delovanje proti Gram-negativnim in Gram-pozitivnim bakterijam, obenem pa so imeli veliko hemolizno aktivnost (26).

Raziskovali so tudi protimikrobne polipeptide, pripravljene s polimerizacijo z odpiranjem obroča *N*-karboksianhidrida  $\gamma$ -proparagil-L-glutamata. Polipeptidi so imeli alkinske funkcionalne skupine, na katere so z uporabo alkin-azid »klik« kemije pripeli metilirane in kvaternizirane aminske skupine z alkilnimi stranskimi verigami. Le ti so bili biorazgradljivi,

dolžina stranske alkilne verige pa je bila od C1 do C12. Delovanje na bakterije je bilo širokospikalno, saj so delovali proti Gram-negativnim bakterijam *Escherichia coli* in Gram-pozitivnim bakterijam *S. aureus*. Na *E. coli* so delovali šele polimeri z alkilnimi verigami daljšimi od C4, največjo aktivnost pa so imeli tisti z verigami dolžine C8. Vsi testirani polimeri so imeli veliko selektivnost in so izkazovali manjšo hemolitno aktivnost kot naravni protimikrobi peptidi. Poleg tega so bili polipeptidi z dolgimi alkilnimi verigami netopni v vodi in so jih zato lahko uporabili kot premaze za preprečevanje vezave bakterij na določene površine (27). Na področju protibakterijske aktivnosti sta dobro znana tudi  $\alpha$ -PLL in  $\epsilon$ -PLL (28, 29). Porozne kriogele s protimikrobnimi lastnostmi so pripravili tudi s polimerizacijo z odpiranjem obroča NCA, in sicer so sintetizirali blok kopolimere lizina in valina ter jih premrežili z glutaraldehidom. Ti kopolimeri so izkazali dobre protibakterijske lastnosti proti Gram-negativnim bakterijam *E. coli* (30).

### 1.3.1. Sinteza $N$ -karboksianhidridov $\alpha$ -aminokislin in polimerizacija z odpiranjem obroča $N$ -karboksianhidridov $\alpha$ -aminokislin

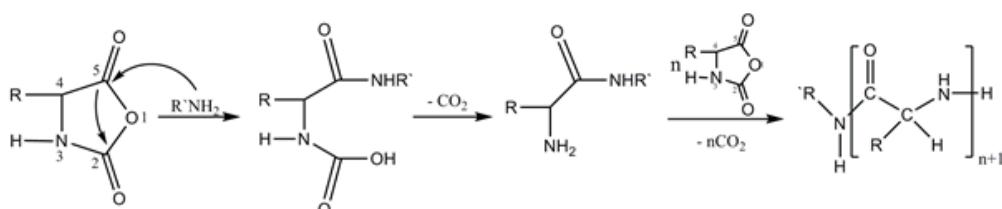
$N$ -karboksianhidride (NCA) je mogoče pripraviti iz različno zaščitenih  $\alpha$ -aminokislin (slika 4), z uporabo fosgena ali njegovih derivatov. Obstajajo še drugi postopki priprave NCA npr. s  $PBr_3$ ,  $PCl_5$  in  $SOCl_2$ . Ti reagenti se uporabljam za pripravo NCA iz karbamatno zaščitenih  $\alpha$ -aminokislin (31). Najbolj učinkovit reagent za pripravo NCA je bis(triklorometil) karbonat oz. trifosgen, ki je, za razliko od plinastega fosgена in tekočega difosgена, kristalen pri sobni temperaturi in je posledično z njim lažje in varnejše izvajati reakcije, saj je fosgen izredno toksičen. Poleg tega je s trifosgenom lažje nadzorovati stehiometrijo reakcij. Da pride do nastanka reaktivnih molekul fosgena iz trifosgena, je treba izvajati reakcijo pri povišani temperaturi, navadno pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Slika 4: Sinteza  $N$ -karboksianhidrida iz aminokisline in trifosgena

Prednost polimerizacije z odpiranjem obroča  $N$ -karboksianhidridov  $\alpha$ -aminokislin (slika 5) je uporaba preprostih reagentov, možna priprava večjih količin polipeptidov z velikimi izkoristki in z ozko porazdelitvijo molskih mas. Slaba stran tega postopka so možne stranske reakcije, zlasti iniciacija polimerizacije preko aktiviranega monomera, kar vodi do slabšega

nadzora nad doseganjem želenih molskih mas in do širše porazdelitve molske mase produkta. Uporaba reagentov velike čistote in vodenje reakcij v vakuumu omogoča pripravo polipeptidov z veliko in želeno molsko maso (22). Prav tako naj bi vodenje polimerizacijskih reakcij pri nižji temperaturi (okoli 0 °C) ugodno vplivalo na potek, saj se pri 99 % polipeptidnih verig ohranijo aminske končne skupine, kot posledica manjšega obsega stranskih reakcij. Optimalne razmere polimerizacije se razlikujejo glede na vrsto NCA ozziroma glede na stransko skupino aminokisline, iz katere je NCA sintetiziran. Ta namreč določa fizikalno-kemijske lastnosti NCA in njegovo reaktivnost (22).



**Slika 5:** Polimerizacija z odpiranjem obroča *N*-karboksianhidridov

Polimerizacijo z odpiranjem obroča NCA iniciramo z nukleofili (npr. primarni amini) ali bazami (npr. terciarni amini in natrijev alkoksidi) (32). Iniciacija s primarnim aminom lahko pri neprimernih eksperimentalnih razmerah sinteze ali nečistih reagentih vodi do različnih stranskih reakcij, ki vodijo do terminacije verige in/ali ciklizacije, kar se odraža v heterogenih polimerih z bimodalno porazdelitvijo molskih mas (33). Stranskim reakcijam se lahko izognemo z uporabo reagentov velike čistosti. Terciarni amini in alkoksidi so za razliko od primarnih aminov bolj bazični kot nukleofilni iniciatorji. Z njimi lahko pripravimo polipeptide večjih molskih mas, vendar težje kontroliramo molsko maso (32, 33).

## 2. NAMEN DELA

Naravni in sintezni peptidi, ki vsebujejo pozitivno nabite skupine, povzročajo izgubo selektivne permeabilnosti bakterijske membrane, kar lahko vodi v propad bakterije. Poleg tega sta pomembni lastnosti peptidov tudi biorazgradljivost in selektivnost. Kot alternativa naravnim protimikrobnim peptidom in sinteznim biološko nerazgradljivim peptidom je naš cilj priprava kationskih polipeptidov na osnovi poli(L-lizina) s potencialnim protibakterijskim delovanjem, pri katerih bomo spremenjali delež hidrofobnih skupin, pripetih neposredno na stransko kvaterno amonijeve skupino poli(L-lizina). Prav tako želimo ovrednotiti vpliv prisotnosti različnih vrst aminskih skupin in vpliv hidrofobno/hidrofilnega razmerja na protibakterijsko delovanje sintetiziranih polipeptidov.

Naše izhodišče bo priprava *N*-karboksianhidrida iz aminokisline lizin, sledila pa bo polimerizacija z odpiranjem obroča *N*-karboksianhidrida. S po-polimerizacijskimi modifikacijami, kot sta metilacija in kvaternizacija z metiljodidom in oktiljodidom, bomo sintetizirali vodotopne, amfifilne derivate poli(L-lizina). Protibakterijsko delovanje poli(L-lizina) z različnim deležem hidrofobnih skupin bomo ovrednotili na modelnih bakterijah, tj. na Gram-negativnih bakterijah *E. coli* in Gram-pozitivnih bakterijah *B. subtilis*, toksičnost pa preverili s hemoliznim testom.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1. MATERIALI IN OPREMA

##### 3.1.1. Kemikalije

- $N^{\epsilon}$ -benzilosikarbonil-L-lizin ( $C_{14}H_{20}N_2O_4$ ),  $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizin, Sigma-Aldrich,  $\geq 99,0\%$ ,  $M = 280,32\text{ g/mol}$
- Bis(triklorometil)karbonat ( $C_3Cl_6O_3$ ), [trifosgen], Sigma-Aldrich,  $\geq 99,0\%$ ,  $M = 296,75\text{ g/mol}$
- Benzilamin ( $C_7H_9N$ ), [Benzil-NH<sub>2</sub>], Sigma-Aldrich,  $\geq 99,5\%$ ,  $\rho = 0,98\text{ g/cm}^3$  pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $M = 107,15\text{ g/mol}$
- Formaldehid, min. 37-odstotna raztopina (HCOH), Merck, 37,0 - 38,0%, stabilizirana z 10 % metanola, ACS, Reag. Ph Eur,  $\rho = 1,09\text{ g/cm}^3$
- Kalijev karbonat ( $K_2CO_3$ ), Merck,  $M = 138,21\text{ g/mol}$
- Metiljodid (Jodometan) ( $CH_3I$ ), [MeI], Sigma-Aldrich, 99,5 %,  $\rho = 2,28\text{ g/cm}^3$  pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $M = 141,94\text{ g/mol}$ ,  $\rho = 2,28\text{ g/cm}^3$
- Oktljodid (1-jodooktan) ( $C_8H_{17}I$ ), [OctI], Sigma-Aldrich, 98 %,  $\rho = 1,33\text{ g/cm}^3$  pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $M = 240,13\text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,33\text{ g/cm}^3$
- $\alpha$ -Pinen ( $C_{10}H_{16}$ ), Sigma-Aldrich, 98 %,  $\rho_{20} = 0,858\text{ g/cm}^3$ ,  $M = 136,23\text{ g/mol}$
- Vodikov bromid (HBr), Acros Organics, 33-odstotna (m/m) raztopina v ocetni kislini, AcroSeal®,  $\rho = 1,42\text{ g/cm}^3$ ,  $M = 80,90\text{ g/mol}$

##### 3.1.2. Topila

- Aceton, Merck, ACS, ISO, Reag. Ph Eur,  $M = 58,08\text{ g/mol}$
- Dietileter [ $Et_2O$ ], Sigma-Aldrich,  $\geq 99,8\%$ ,  $M = 74,12\text{ g/mol}$
- $N,N$ -Dimetilformamid [DMF], Sigma-Aldrich, 99,8 %,  $M = 73,09\text{ g/mol}$
- Etilacetat [ $EtOAc$ ], Acros Organics, 99,9 %,  $M = 88,11\text{ g/mol}$
- $n$ -Heksan, Merck,  $\geq 99,0\%$ ,  $M = 86,18\text{ g/mol}$
- $N$ -Metil-2-pirolidon [NMP], Merck,  $\rho = 1,03\text{ g cm}^{-3}$ ,  $M = 99,13\text{ g/mol}$
- Metanojska kislina, Kemika, 98-100%, p.a.,  $\rho = 1,22\text{ g cm}^{-3}$ ,  $M = 46,03\text{ g/mol}$
- Trifluoroocetna kislina [TFA], Sigma-Aldrich, 99 %,  $M = 114,02\text{ g/mol}$

### **3.1.3. Raztopine, gojišča, bakterije, celice**

- Polprepustna dializna membrana (celulozni ester, MW<sub>CO</sub>: 500-1000 D, shranjena v 0,05 % raztopini natrijevega azida, razmerje volumen/dolžina: 3,1 mL/cm, Spectra/Por® Dialysis Membrane, Biotech CE Tubing, Spectrum Laboratories)
- 1 M HCl (pripravljena iz 37-odstotne HCl, Merck)
- 1 M NaOH (pripravljena iz 99-odstotnega NaOH, Merck)
- Alseverjeva raztopina za preprečevanje koagulacije krvi: 2,05 (m/V) % dekstroza, 0,8 % (m/V) Na-citrat, 0,055 % (m/V) citronska kislina, 0,42 % (m/V) NaCl
- Tekoče gojišče Luria-Bertani (tekoče LB gojišče: destilirana voda, tripton, NaCl, kvasni ekstrakt)
- Trdno gojišče Luria-Bertani (trdno LB gojišče: destilirana voda, tripton, NaCl, kvasni ekstrakt, agar)
- Bakterije *Escherichia coli*, sev DH5α
- Bakterije *Bacillus subtilis*, sev JH642
- Eritrocitni pufer (20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Goveji eritrociti v eritrocitnem pufru

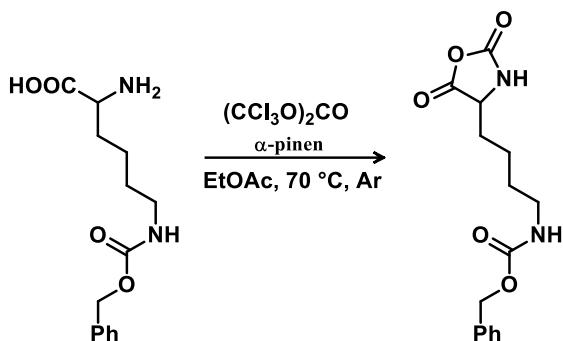
### **3.1.4. Oprema**

- Mikrotitrska ploščica z ravnim dnom, 12 × 8 (96 vdolbinic)
- Čitalec mikrotitrnih ploščic (Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, Vermont, USA, program Gen 5.1.)
- CD spektropolarimeter (Chirascan, Applied Photophysics, UK)
- NMR spektrometer (300-MHz Agilent Technologies DD2)
- Masni spektrometer MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany)
- SEC-MALS (črpalka Hewlett-Packard 1100, laserski fotometer DAWN HELEOS, diferenčni refraktometer Optilab rEX-Wyatt Technology Corporation, ZDA)

### 3.2. SINTEZA KVATERNIZIRANEGA POLI(L-LIZINA)

#### 3.2.1. Sinteza $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizin N-karboksianhidrida (ZLL NCA)

Reakcija:



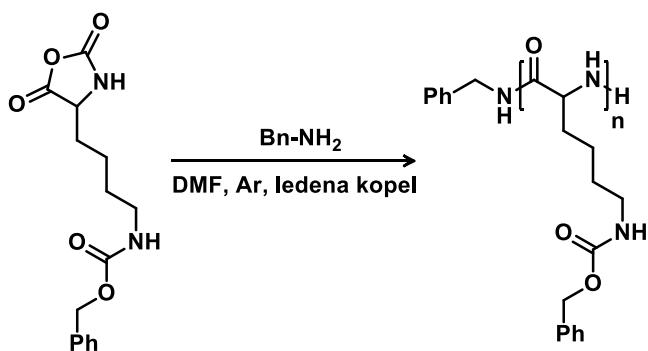
Sintezni postopek:

$N^{\epsilon}$ -Z-L-lizin (5,00 g, 17,8 mmol) smo suspendirali v brezvodnem EtOAc (40 mL) in  $\alpha$ -pinenu (6 mL, 37,8 mmol), ter suspenzijo segrevali na oljni kopeli pri 75 °C. Nato smo po kapljicah dodali raztopino trifosgena (2,56 g, 8,6 mmol) v brezvodnem EtOAc (10 mL) in reakcijsko zmes mešali 3,5 ure. Po tem času smo reakcijsko zmes prefiltrirali, uparili topilo na rotacijsko vakuumskem uparjevalniku ter v koncentriran ostanek počasi dodali heksan. Za tem smo reakcijsko zmes preko noči pustili v zamrzovalniku, da je nastala vsa oborina. Produkt smo prefiltrirali, sprali s heksanom, ter nato še trikrat prekristalizirali iz zmesi topil EtOAc/heksan.

Masa končnega produkta in izkoristek: 4,67 g,  $\eta = 85\%$ .

#### 3.2.2. Sinteza poli( $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizina) (PZLL)

Reakcija:



Sintezni postopek:

Predhodno pripravljen ZLL NCA (4,00 g, 13,1 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (63 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Raztopino benzilamina (0,035 g, 0,33 mmol) v

1,34 mL DMF smo počasi dodali k pripravljeni raztopini NCA, reakcijsko zmes pa smo nato pustili mešati 2 dni na ledeni kopeli. Nato smo reakcijsko zmes zlili v ledeno mrzlo vodo, da smo izoborili produkt, ki smo ga izolirali s centrifugiranjem (8000 obratov, 5 minut). Sledilo je spiranje produkta z vodo ter sušenje z zamrzovanjem.

Masa končnega produkta in izkoristek: 3,27 g,  $\eta = 95\%$ .

### **3.2.3. Sinteza poli(L-lizina) (PLL) z reakcijo odščite PZLL**

Reakcija:



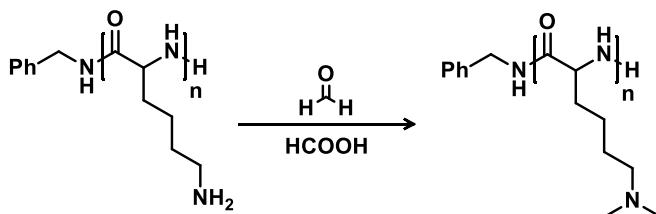
Sintezni postopek:

PZLL (3,00 g) smo raztopili v TFA (40mL), nato pa dodali HBr v ocetni kislini (33 ut. %) (8 mL), ter reakcijsko zmes mešali 80 minut. Po tem času smo reakcijsko zmes zlili v dietileter, da se je oboril produkt, ki smo ga nato izolirali s centrifugiranjem. Nato smo produkt raztopili v vodi in raztopino nevtralizirali z 1 M NaOH do pH = 9,0, ter s tem deprotonirali aminske skupine. Sledila je dializa PLL (dializna membrana, MW<sub>CO</sub> = 500-1000 Da) in po zaključku te sušenje z zamrzovanjem.

Masa končnega produkta in izkoristek: 1,18 g,  $\eta = 80\%$ .

### **3.2.4. Dimetilacija PLL z Eschweiler-Clarkovo reakcijo (PDMLL)**

Reakcija:



Sintezni postopek:

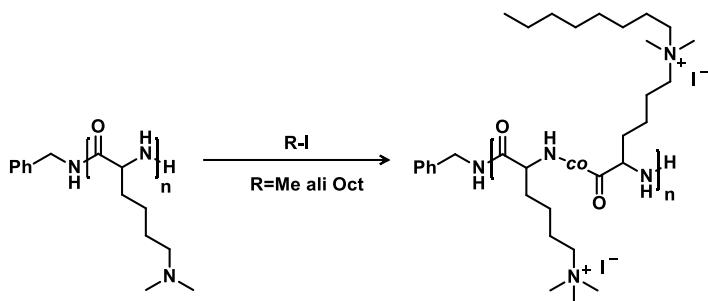
PLL (1,43 g) smo raztopili v destilirani vodi (33,5 mL), dodali metanojsko kislino (5,6 mL) in raztopino formaldehida (37 %, 7,5 mL), ter začeli segrevati na 70 °C. Po dveh dneh smo reakcijsko zmes skoncentrirali na rotacijsko vakuumskem uparjevalniku ter raztopino

nevtralizirali z 1 M NaOH do pH = 8,5, da smo deprotonirali dimetilaminske skupine. Raztopino produkta PDMLL smo nato dializirali (dializna membrana, MW<sub>CO</sub> = 500-1000 Da) in posušili v liofilizatorju.

Masa končnega produkta in izkoristek: 1,27 g,  $\eta = 73\%$ .

### 3.2.5. Kvaternizacija PDMLL z oktiljodidom in metiljodidom (qPLL)

Reakcija:



Sintezni postopek:

Produkt PDMLL (0,11 g, 0,72 mmol) smo raztopili v NMP (12 mL), ter dodali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,10 g, 0,72 mmol). Zmes smo segrevali pri 40 °C, ter k raztopini izhodne spojine dodali oktiljodid (0,17 g, 0,72 mmol). Po pol ure smo v reakcijsko zmes dodali metiljodid (0,31 g, 2,16 mmol) in pustili mešati pri 40 °C še 4 ure. Po tem času smo reakcijsko zmes filtrirali ter zlili v leden dietileter. Nastalo oborino smo ločili od topil s centrifugiranjem, jo nato sprali z acetonom in posušili na vakuumski črpalki.

Masa končnega produkta in izkoristek: 0,16 g,  $\eta = 72\%$ , delež oktilnih verig: 8%.

Sintetizirali smo še produkte z drugačnim deležem oktilnih verig, in sicer: 0 %, 12 %, 20 %, 31 % in 38 %. Produkte z različnimi stopnjami oktilacije smo dobili tako, da smo spremajali čas po katerem smo dodali metiljodid v reakcijsko zmes.

### **3.3. KARAKTERIZACIJA SINTETIZIRANIH PRODUKTOV**

#### **NMR spektroskopija**

$^1\text{H}$  NMR spektre vzorcev smo posneli na 300-MHz Agilent Technologies DD2 NMR spektrometru. NCA in zaščitene polimere smo raztopili v topilu DMSO- $d_6$ , odščitene in modificirane polimere pa v  $\text{D}_2\text{O}$ . Za interni standard smo v DMSO- $d_6$  uporabili tetrametilsilan ( $\text{Me}_4\text{Si}$ ,  $\delta = 0$ ), v  $\text{D}_2\text{O}$  pa natrijev 3-(trimetilsilil)propionat- $d_4$  (TSP- $d_4$ ). Raztopinam vzorcev, ki smo jih snemali v  $\text{D}_2\text{O}$  smo tik pred snemanjem dodali pet kapljic TFA.

#### **Masna spektrometrija (MALDI-TOF MS)**

Masne spektre smo posneli na Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF masnem spektrometru (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Vzorce smo raztopili v HFIP (10 mg/mL), 1 $\mu\text{L}$  te raztopine pa nato zmešali z 10 $\mu\text{L}$  raztopine matriksa (2,5-dihidroksibenzojska kislina (DHB) v THF (20 mg/mL)). Nato smo dodali 3  $\mu\text{L}$  raztopine NaTFA v THF (10 mg/mL) kot kationizator. Na ploščico smo nanesli 0,4  $\mu\text{L}$  končne raztopine. Spektre zaščitenih polipeptidov smo posneli v pozitivnem reflektronskem načinu. Eksterno umeritev instrumenta smo izvedli s polimetilmetakrilatnimi standardi.

#### **Velikostna izključitvena kromatografija sklopljena z detektorjem na sisanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS)**

Povprečja molskih mas in porazdelitev molskih mas vzorcev smo ugotovili z velikostno izključitveno kromatograffijo v kombinaciji z detektorjem na sisanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS). Uporabili smo črpalko Hewlett-Packard 1100, laserski fotometer DAWN HELEOS in diferenčni refraktometer Optilab rEX (Wyatt Technology Corporation, ZDA). Ločbo PZLL vzorca smo izvedli na koloni PolarGel-L z območjem molskih mas do 30 kDa (Agilent Technologies, ZDA). Za mobilno fazo smo uporabili 0,05 M raztopino litijevega bromida v  $N,N$ -dimetilacetamidu s pretokom 1 mL/min. Koncentracija injiciranega vzorca je bila 1 mg/ml.

#### **Cirkularni dikroizem (CD)**

Cirkularni dikroizem raztopin vzorcev smo posneli na CD spektropolarimetru (Chirascan, Applied Photophysics, UK). Pripravili smo raztopine vzorcev s koncentracijo 0,25 mg/mL (pufer: 20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4). Meritve smo opravili pri temperaturi 25 °C, v območju valovnih dolžin med 200 nm in 260 nm, z intervalom 1 nm. Pred vsako

meritvijo smo stekleno kiveto temeljito sprali z ultra čisto vodo, jo posušili na vakuumski črpalki in napolnili z ustreznim volumnom raztopine vzorca ( $300 \mu\text{L}$ ). Na začetku smo posneli tudi CD samega pufra, ki je predstavljal bazno linijo.

### **Dinamično sisanje svetlobe (DLS)**

Meritve smo izvedli na Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (laser 4 mW He-Ne, 633 nm, Malvern Instruments UK). Sisanje svetlobe smo merili pri  $173^\circ$ , pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$ . Različne koncentracije polimernih raztopin smo pripravili z raztopljanjem polimerov v pufru s sestavo: 20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4. Viskoznost pufra pri temperaturi  $25^\circ\text{C}$  je bila 0,8936 mPa, lomni količnik za pufer pri valovni dolžini 633 nm pa 1,332.

### **3.4. VREDNOTENJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA**

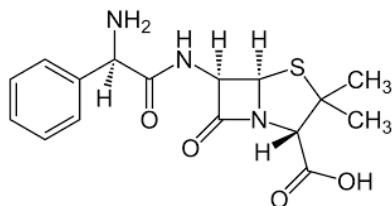
Bakterije smo preko noči gojili na trdnem gojišču Luria-Bertani (LB) pri  $37^\circ\text{C}$ . Naslednji dan smo prenesli po eno kolonijo v tekoče gojišče LB in jih gojili pri  $37^\circ\text{C}$  in stresanju 150 vrtljajev/min, dokler kulture niso dosegle eksponentne faze rasti ( $\text{OD}_{600} > 0,4$ ). Vrednost  $\text{OD}_{600} = 1$  ustreza  $\sim 1 \times 10^9$  enot, ki lahko tvorijo kolonije (CFU) v 1 mL suspenzije (CFU/mL). Tik pred začetkom protibakterijskega testa smo kulture redčili v tekočem gojišču LB do  $\text{OD}_{600} = 0,02$ .

Vse raztopine vzorcev kvaterniziranih polilizinov smo pripravili na enak način, delo pa je potekalo v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora). Natehtali smo praškaste vzorce in jih redčili s tekočim gojiščem LB, do 16 mg/mL. Pripravljene suspenzije vzorcev smo nato 40 minut vrtinčili, da so se popolnoma raztopile.

V primeru *E. coli* smo v mikrotitrski ploščici (96 vdolbinic) pripravili dvakratne serijske razredčitve peptidnih vzorcev v območju od 8000 do  $3,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ , v primeru *B. subtilis* pa razredčitve v območju od 125 do  $0,061 \mu\text{g}/\text{ml}$ . V vsako vdolbinico smo nato dodali po  $100 \mu\text{L}$  predhodno pripravljene razredčene suspenzije bakterij.

Kot negativno kontrolo vseh meritev smo uporabili le tekoče gojišče LB, brez bakterij in vzorcev. Za primerjavo smo na vsako ploščico vključili še meritve, kjer so bile prisotne samo bakterije v tekočem gojišču LB kot primer normalne bakterijske rasti. Protibakterijsko delovanje smo preverili tudi pri antibiotiku ampicilin (slika 6). Pripravili smo raztopino ampicilina s koncentracijo 16 mg/mL in jo na mikrotitrski ploščici redčili do enakih

koncentracij kot testne vzorce. Vpliv na bakterijsko rast smo nato testirali tako kot pri testnih vzorcih.



Slika 6: Struktura antibiotika ampicilin

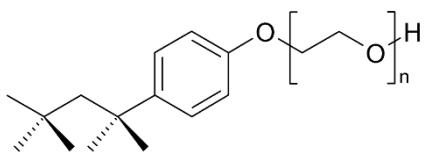
Bakterijsko rast v odvisnosti od časa smo spremljali s čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Vermont, ZDA), in sicer med stalnim stresanjem pri 37 °C. Meritve so trajale 14 ur, v 20 minutnih intervalih. Vsak vzorec smo pripravili in testirali v treh paralelkah. Normalizirani OD<sub>600</sub> smo izračunali iz enačbe:

$$OD_{600} = \frac{OD_{vzorec} - OD_{neg.kontr.}}{OD_{normalna\ bakt.rast} - OD_{neg.kontr.}}$$

### 3.5. HEMOLIZNA AKTIVNOST

Pred meritvijo smo najprej pripravili eritrocite, ki so bili predhodno shranjeni v Alseverjevi raztopini za preprečevanje koagulacije krvi (2,05 (m/V) % dekstroza, 0,8 % (m/V) natrijev citrat, 0,055 % (m/V) citronska kislina, 0,42 % (m/V) NaCl). V centrifugirko smo dodali približno 200 µL eritrocitov, eritrocitni pufer (10 mL) in rahlo premešali. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 800 × g in temperaturi 21 °C. S kapalko smo odstranili supernatant ter celoten postopek spiranja ponovili vsaj še dvakrat oz. dokler ni bil supernatant povsem bister, s tem pa odstranjeni lizirani eritrociti. V erlenmajerico smo nalili 15 mL eritrocitnega pufra in mu dodali kapljico očiščenih eritrocitov. Nato smo umerili suspenzijo eritrocitov. V vdolbinico na mikrotitrski ploščici smo dodali 100 µL eritrocitnega pufra in 100 µL razredčene eritrocitne suspenzije in izmerili absorbanco pri 600 nm. Na ta način smo raztopino ustrezno razredčili na želeno optično gostoto OD<sub>600</sub> = 0,40 ± 0,01.

Polimere smo raztopili v eritrocitnem pufru in jih nato serijsko razredčili v mikrotitrski plošči. Koncentracije tako pripravljenih raztopin so bile v območju od 8000 do 3,90 µg/mL, volumen raztopine v vsaki od vdolbinic pa 100 µL. Kot pozitivno kontrolo smo pripravili 8% v/v raztopino tritona iz Triton X-100 (slika 7), iz česar smo nato na mikrotitrski ploščici



Slika 7: Struktura Triton X-100

pripravili redčitveno vrsto raztopin tritona v območju od 4 % v/v do 0,002 % v/v. Tik pred meritvijo smo v vse vdolbinice dodali po 100 µL ustrezno razredčene eritrocitne suspenzije. Negativno kontrolo so predstavljali eritrociti v eritrocitnem pufru brez drugih dodatkov. Kinetiko lize eritrocitov smo merili pri 37 °C med stalnim stresanjem na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader, in sicer 30 minut pri 600 nm, v 20 sekundnih intervalih. Vsak od vzorcev je bil pripravljen in merjen v treh paralelkah. Vrednost normalizirane hemolize je bila izračunana iz izmerjenih vrednosti OD<sub>600</sub>, z uporabo enačbe:

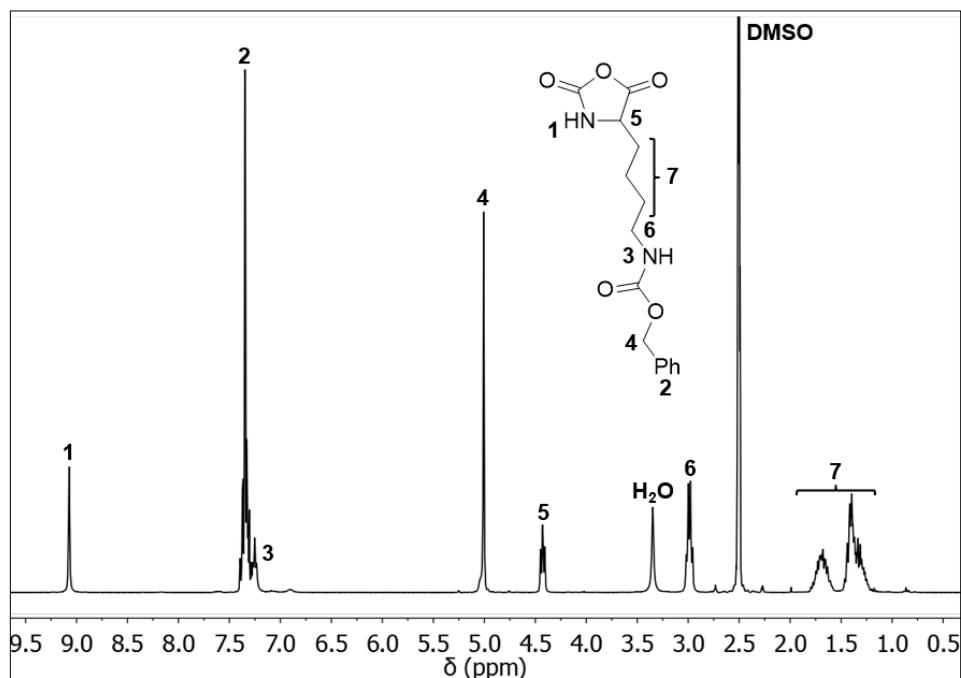
$$OD_{600} = \frac{OD_{vzorec} - OD_{neg. \ kontr.}}{OD_{poz. \ kontr.} - OD_{neg. \ kontr.}}$$

## 4. REZULTATI IN DISKUSIJA

### 4.1. SINTEZA POLI(L-LIZINA)

#### 4.1.1. Sinteza N<sup>e</sup>-Z-L-lizin N-karboksianhidrida (ZLL NCA)

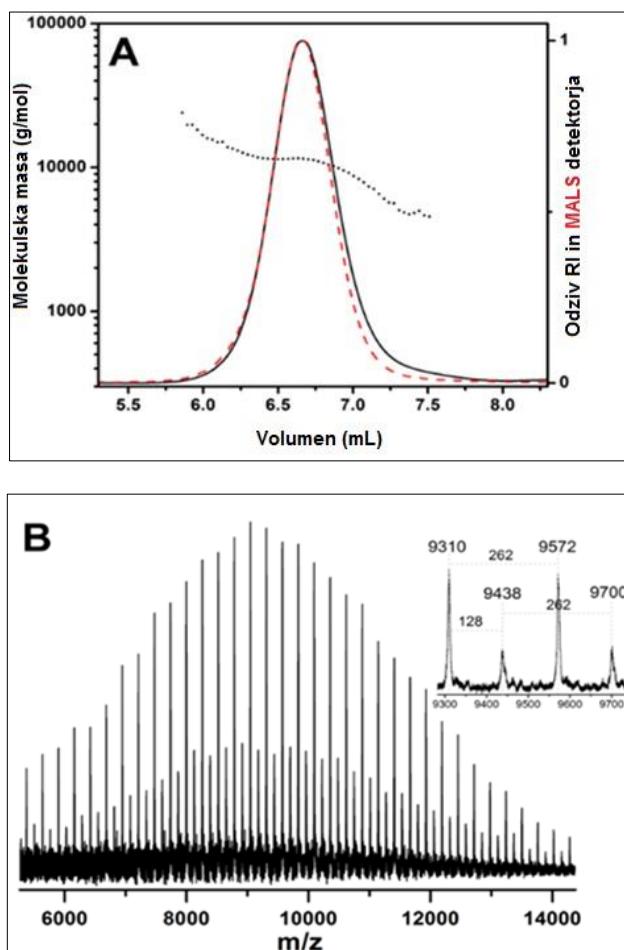
*N*-karboksianhidrid  $\alpha$ -aminokisline (NCA) smo sintetizirali s ciklizacijo zaščitene  $\alpha$ -aminokisline  $N^e$ -benzilokskarbonil-L-lizin (ZLL) s trifosgenom. Kot stranski produkt fosgenacije nastaja HCl, ki lahko vodi do raznih stranskih reakcij, kot npr. odščita stranskih skupin NCA. Zato smo k reakcijski zmesi dodali  $\alpha$ -pinen, ki deluje kot lovilec HCl. Merilo za zaključek reakcije je bila delna zbistritev reakcijske zmesi, saj je izhodna  $\alpha$ -aminokislina slabo topna v EtOAc, nastali NCA pa je v EtOAc topen. Reakcijsko zmes smo po zaključku reakcije ohladili in filtrirali ter nato produkt prekristalizirali, da smo odstranili nezreagirano izhodno spojino in prisotne nečistote, ki motijo nadaljnjo polimerizacijo NCA. Prav tako je NCA monomer občutljiv na zračno vlago, kar vpliva na polimerizacijo in na povprečja molskih mas dobljenih produktov. Zato smo čisti NCA monomer ustrezno hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C, pod inertno atmosfero. Pripravljeni NCA smo okarakterizirali z  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijo in na ta način potrdili strukturo ter čistost sintetiziranega monomera (slika 8).



Slika 8:  $^1\text{H}$  NMR spekter ZLL NCA

#### 4.1.2. Sinteza poli( $N^{\epsilon}$ -Z-L-lizina) (PZLL)

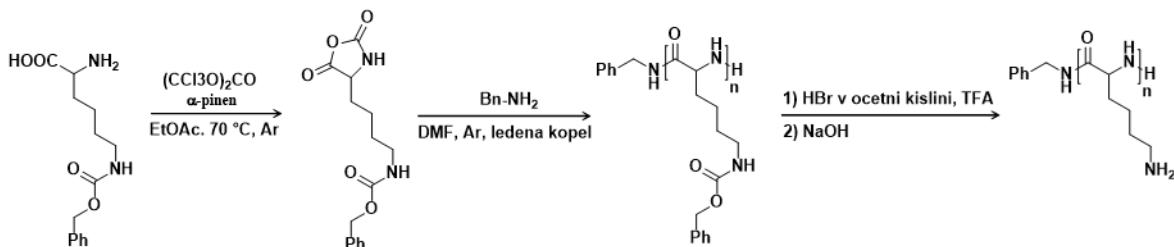
Reakcijsko zmes smo na ledeni kopeli ( $0^{\circ}\text{C}$ ) mešali v inertni atmosferi argona, kot initiator pa smo uporabili benzilamin. Reakcija polimerizacije je potekla v dveh dneh, po zaključku pa smo produkt iz reakcijske zmesi oborili z vodo, nato pa oborino od zmesi topil DMF/voda ločili z večkratnim centrifugiranjem. Po sušenju z zamrzovanjem smo dobili homopolimer v obliki belega prahu. Dobljen PZLL smo okarakterizirali s SEC-MALS in MALDI-TOF MS. Rezultati (slika 9A) kažejo ustrezne lastnosti produkta:  $M_n = 10,4 \text{ kDa}$ ,  $M_w = 10,8 \text{ kDa}$  in  $\text{PDI} = 1,04$ . Načrtovana stopnja polimerizacije (DP) je bila 40, SEC-MALS pokaže DP = 39, podobno kot MALDI-TOF, kjer smo določili DP = 36. Na MALDI-TOF masnem spektru (slika 9B) vidimo dve porazdelitvi signalov. Mase signalov z manjšo intenziteto ustrezajo polipeptidom s po eno odstranljeno zaščitno skupino. Ponavljajoča enota ima maso 262 Da, mase končnih skupin pa ustrezajo benzilamidu na eni strani in aminski skupini na drugi strani.



Slika 9: A-SEC-MALS kromatogram PZLL, B-MALDI-TOF masni spekter PZLL

#### 4.1.3. Sinteza poli(L-lizina) (PLL) z reakcijo odščite PZLL

Zaščitne skupine PZLL smo odstranili pri kislih razmerah. Sledila je dializa PLL (dializna membrana, MW<sub>CO</sub> = 500-1000 Da) in po zaključku te sušenje z zamrzovanjem (slika 10). Vse nadaljnje modifikacije smo izvedli na istem vzorcu PLL in s tem izključili morebitne vplive različnih molekulskih mas polimerov na protibakterijsko delovanje.

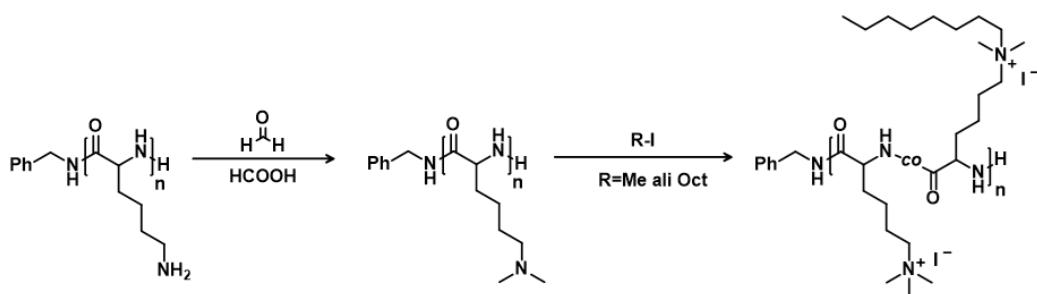


Slika 10: Sinteza ZLL NCA, PZLL in PLL

## 4.2. MODIFIKACIJA POLI(L-LIZINA)

#### 4.2.1. Dimetilacija PLL z Eschweiler-Clarkovo reakcijo (PDMLL)

Sledila je dimetilacija odščitenega PZLL, in sicer z Eschweiler-Clarkovo reakcijo. S tem smo dobili izhodni produkt polidimetillizin (PDMLL), preko katerega smo izvedli vse nadaljnje reakcije kvaternizacije (slika 11). Obenem smo se izognili neposredni kvaternizaciji odščitenega polilizina z oktiljodidom. S tem smo dobili boljši nadzor nad številom vezanih oktilnih verig na eni enoti polimera. Število hidrofobnih skupin vezanih na isto kvaterno amonijevo skupino ima lahko tudi vpliv na protibakterijsko delovanje. Tako je bilo za kvaternizirani hitosan dokazano, da ima monoalkiliran produkt *N*-alkil-*N,N*-dimetilhitosan boljše protibakterijske lastnosti kot dialkiliran *N,N*-dialkil-*N*-metilhitosan (16).



Slika 11: Dimetilacija PLL z Eschweiler-Clarkovo reakcijo, ter kvaternizacija PDMLL z oktiljodidom in metiljodidom

#### **4.2.2. Kvaternizacija PDMLL z oktiljodidom in metiljodidom (qPLL)**

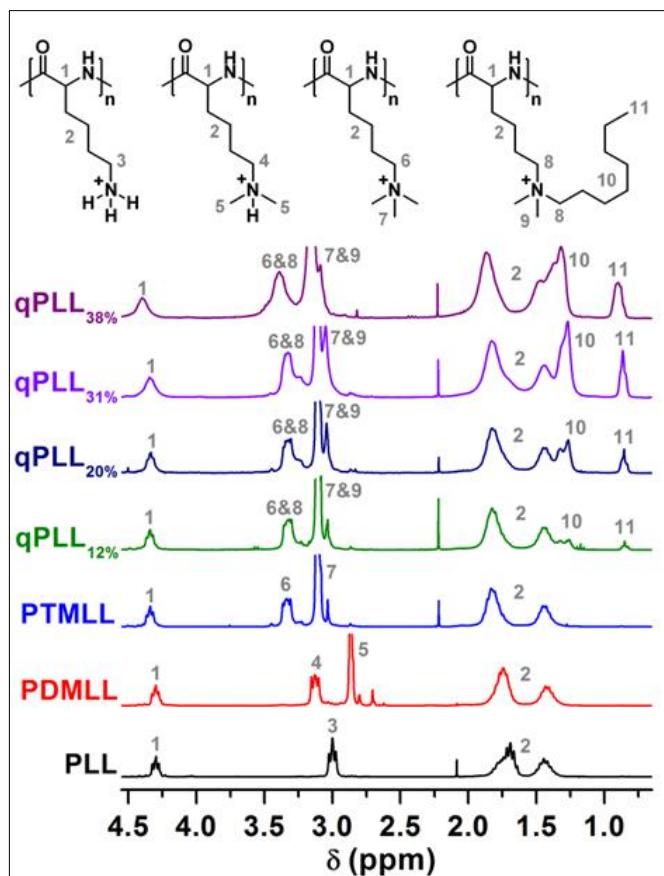
Naš cilj pri kvaternizaciji je bil sintetizirati produkte z različnim deležem daljših in krajših hidrofobnih verig, ki imajo vpliv na protibakterijsko in hemolizno aktivnost polipeptidov. V našem primeru smo želeli na molekulo polipeptida pripeti oktilne in metilne verige. Na uspešnost sinteze je vplivalo več različnih spremenljivk. Pomemben je bil vrstni red dodajanja reagentov, saj sta oktiljodid in metiljodid različno reaktivna, kot tudi vmesni časi med posameznimi dodajanjimi reagentov. Prav tako smo ugotovili, da je za lažjo vezavo oktiljodida in metiljodida na polipeptid nujen dodatek  $K_2CO_3$ . Pri vseh produktih smo kot izhodno spojino uporabili PDMLL, ki smo ga raztopili v NMP, ter reakcijsko zmes segrevali pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (slika 11). Nato smo k raztopini dodali manj reaktivni oktiljodid, s katerim smo kontrolirali delež oktilnih verig na polipeptidu, ter po ustreznem času še bolj reaktivni metiljodid, ter pustili zmes mešati še približno 4 ure, da smo dosegli kvantitativno kvaternizacijo aminskih skupin. Reakcijsko zmes smo nato filtrirali ter zlili v leden dietileter. Nastalo oborino smo ločili od topil s centrifugiranjem, jo dobro sprali z acetonom in posušili na vakuumski črpalki.

Vsi kvaternizirani produkti so bili vodotopni, razlikovali so se le v deležu oktilnih verig, in sicer: 0 %, 12 %, 20 %, 31 % in 38 % (Tabela I). Poskusili smo pripraviti tudi produkte z večjim deležem oktilnih verig, a le ti niso bili več vodotopni in zato neprimerni za nadaljnja testiranja (34).

**Tabela I:** Reakcijske razmere priprave qPLL z različnimi deleži oktilnih verig

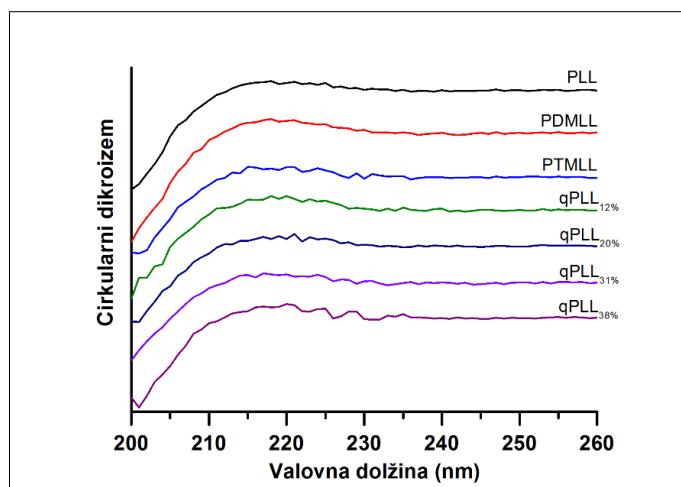
Vzorec	Delež oktilnih verig (%)	Razmerje PDMLL:Octl	Čas po dodatku Octl (min)	Razmerje PDMLL: Mel	Čas po dodatku Mel (ure)	Izkoristek reakcije (%)
<b>qPLL<sub>0%</sub>-PTMILL</b>	0	1:0	0	1:5	4	87
<b>qPLL<sub>12%</sub></b>	12	1:1	80	1:3	4	71
<b>qPLL<sub>20%</sub></b>	20	1:1	120	1:3	4	84
<b>qPLL<sub>31%</sub></b>	31	1:1	240	1:3	3	82
<b>qPLL<sub>38%</sub></b>	38	1:1	420	1:3	17	98

Delež oktilacije polipeptidnih verig smo ugotovili iz  $^1\text{H}$  NMR spektrov kvaterniziranih produktov, in sicer iz razmerja signalov metilnih skupin oktilne verige (signal pri 0,85 ppm) in signalov za CH skupino v osnovni verigi polipeptida (signal pri 4,35 ppm) (slika 12).



Slika 12:  $^1\text{H}$  NMR spektri PLL z različnimi deleži oktilnih verig

Za vse produkte smo posneli še CD spektre, iz katerih smo dobili podatek, da so vsi produkti v pufrni raztopini (pufer: 20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4) v obliki naključno zvite verige (slika 13). Prikazani rezultati se ujemajo s podatki raziskav, kjer je bil majhnomolekulski poli(L-lizin) prav tako v obliki naključno zvite verige (35).



Slika 13: CD spektri PLL, PDMLL, PTMLL in qPLL

### 4.3. PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Vse produkte sintetiziranih kvaterniziranih polilizinov smo testirali na protibakterijsko aktivnost, in sicer na dveh modelnih bakterijah, Gram-negativni *E. coli* in Gram-pozitivni *B. subtilis*. Izhodna koncentracija raztopin vseh produktov je bila 16 mg/mL, nadaljnje redčitve pa smo izvedli na mikrotitrski ploščici. Končne koncentracije za obe vrsti bakterij se razlikujejo oz. so za *B. subtilis* manjše, saj smo že po prvih testih ugotovili, da bodo pripravljeni kvaternizirani polilizini na bakterije *B. subtilis* delovali pri manjših koncentracijah kot na bakterije *E. coli* (Tabela II).

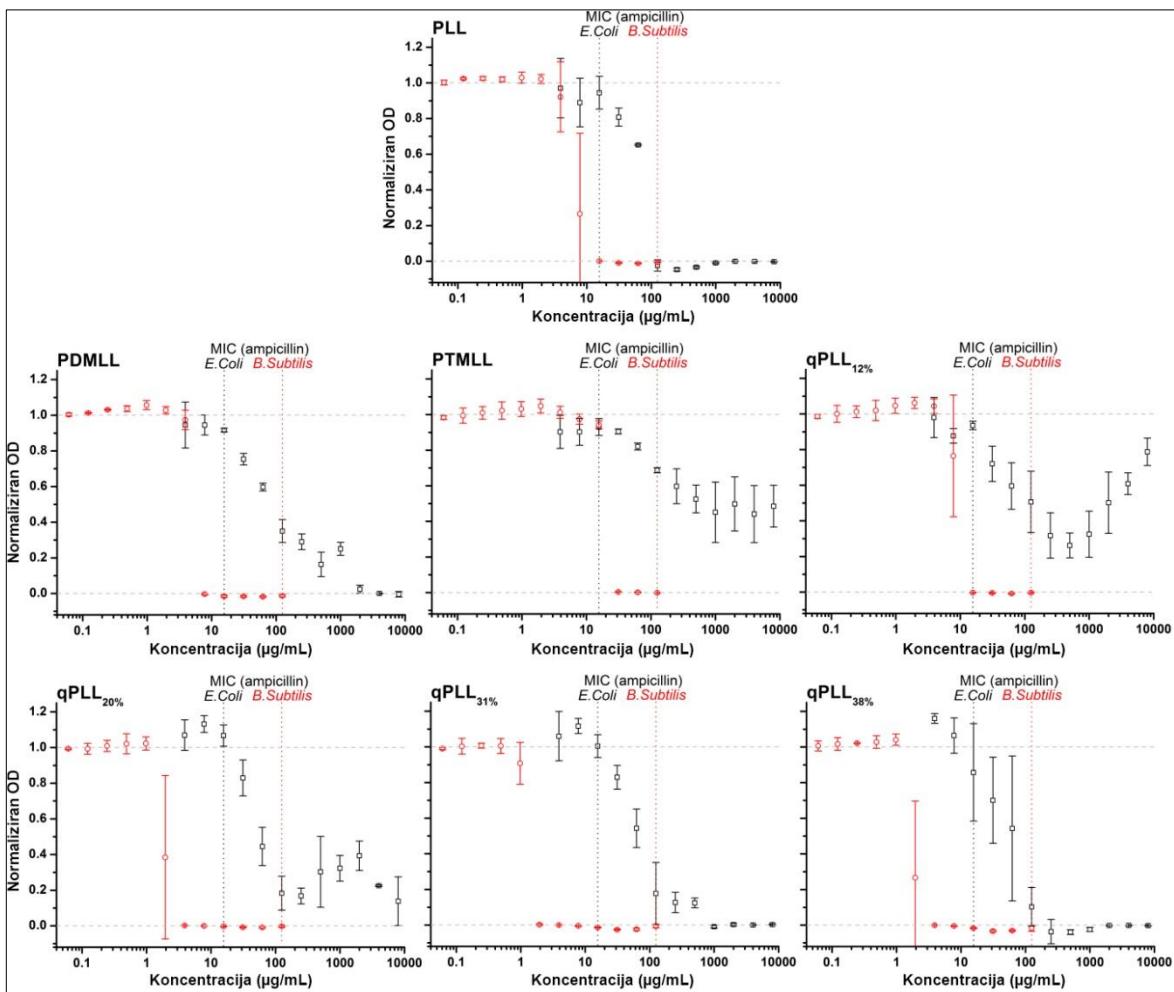
**Tabela II:** Koncentracije polilizinov, uporabljenih na bakterijah

<b>c<sub>qPLL</sub> (µg/mL)</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Bacillus subtilis</i></b>
C <sub>1</sub>	8000	125
C <sub>2</sub>	4000	62,5
C <sub>3</sub>	2000	31,25
C <sub>4</sub>	1000	15,6
C <sub>5</sub>	500	7,8
C <sub>6</sub>	250	3,9
C <sub>7</sub>	125	1,95
C <sub>8</sub>	62,5	0,97
C <sub>9</sub>	31,25	0,48
C <sub>10</sub>	15,6	0,24
C <sub>11</sub>	7,8	0,12
C <sub>12</sub>	3,9	0,061

Za primerjavo smo uporabili antibiotik ampicilin. Bakterijsko rast v odvisnosti od časa smo spremljali s čitalcem mikrotitrskih ploščic, in sicer med stalnim stresanjem pri 37 °C. Meritve so trajale 14 ur, v 20 minutnih intervalih. Vsak vzorec smo pripravili in testirali v treh paralelkah ter za nadaljnje izračune uporabili njihovo povprečje za vsak posamezen vzorec. Normalizirani OD<sub>600</sub> smo izračunali iz enačbe:

$$OD_{600} = \frac{OD_{vzorec} - OD_{neg.kontr.}}{OD_{normalna\ bakt.rast} - OD_{neg.kontr.}}$$

Dobljenih rezultatov so prikazani v obliki krivulj na grafu OD<sub>600</sub> v odvisnosti od koncentracije. Najmanjsa koncentracija vzorca, pri kateri še ni bilo zaznati rasti bakterij, je predstavljala minimalno inhibitorno koncentracijo oz. MIC (Slika 14).



**Slika 14:** Normalizirane OD<sub>600</sub> vrednosti izmerjene po 14 urah inkubacije, za *E. coli* in *B. subtilis* ob prisotnosti PLL derivatov v različnih koncentracijah

#### 4.3.1. Protibakterijsko delovanje polilizinov na *B. subtilis*

Rezultati so pokazali, da je bakterijsko rast *B. subtilis* dobro zavrl že sam PLL, ki vsebuje primarne aminske skupine, to pa se je rahlo izboljšalo z dimetilacijo (28, 36). Kvaternizirani produkt PTMLL s tremi metilnimi skupinami je imel najslabšo protibakterijsko aktivnost izmed vseh produktov, a je imel v primerjavi z ampicilinom celo 4-krat manjši MIC. Kot že omenjeno, na protibakterijsko aktivnost polimerov vpliva več dejavnikov. Pri polimerih s kvaternimi amonijevimi skupinami dodatno vezane hidrofobne skupine izboljšajo protibakterijsko aktivnost, kar se je v našem primeru izkazalo že pri qPLL<sub>12%</sub>, kjer je bilo 12 % metilnih skupin zamenjanih z oktilnimi. Prav tako je znano, da je protibakterijska aktivnost polimerov odvisna od dolžine alkilne hidrofobne verige. Pogosto se je kot najboljša

izbira alkilne skupine izkazala prav oktilna veriga. Tudi rezultati kvaterniziranih polimerov z oktilnimi verigami, ki smo jih pripravili, kažejo, da se z večanjem deleža oktilnih verig izboljša protibakterijska aktivnost. Najboljše protibakterijsko delovanje na *B. subtilis*, naj bi po rezultatih sodeč imel qPLL<sub>31%</sub>, saj je MIC za ta produkt 2 µg/mL (Tabela III).

#### **4.3.2. Protibakterijsko delovanje polilizinov na *E. coli***

Vsi produkti, na katerih smo testirali protibakterijsko aktivnost, kažejo slabše protibakterijsko delovanje na *E. coli*, v primerjavi z delovanjem na *B. subtilis* (Slika 14, Tabela III). Najmanjši MIC in s tem najboljše delovanje izkazuje nemodificiran PLL, medtem ko ima PDMLL že precej večji MIC, PTMLL pa MIC ne doseže niti pri največji testirani koncentraciji, to je 8000 µg/mL. Podobne rezultate so dobili tudi pri študiju amfifilnih polimetakrilatov, kjer so ugotovili, da imajo polimeri s kvaternimi aminskimi skupinami slabše protibakterijsko delovanje na *E. coli* sev DH5α, kot polimeri s primarnimi ali terciarnimi aminskimi skupinami (37).

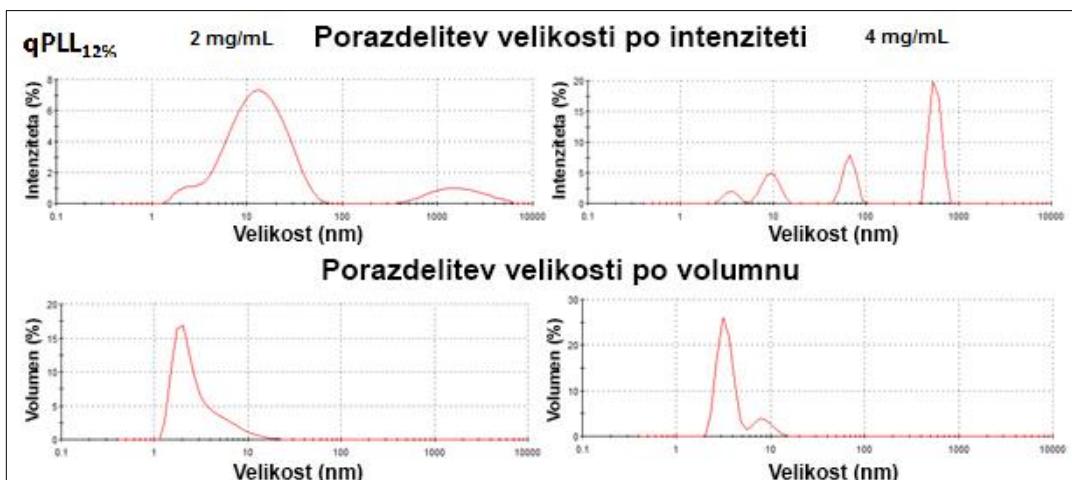
**Tabela III:** Vrednosti MIC polilizinov za *B. subtilis* in *E. coli*

Vzorec	MIC (µg/mL) <i>B. subtilis</i>	MIC (µg/mL) <i>E. coli</i>
PLL	16	125
PDMLL	8	4000
PTMLL	31	> 8000
qPLL <sub>12%</sub>	16	/
qPLL <sub>20%</sub>	4	/
qPLL <sub>31%</sub>	2	1000
qPLL <sub>38%</sub>	4	500
Ampicilin	125	16

Modificirani produkti z oktilnimi verigami kažejo boljše zaviranje rasti *E. coli*, a že pri qPLL<sub>12%</sub> ne dosežemo pričakovanega učinka. Iz grafa je razvidno, da polimer deluje protibakterijsko do koncentracije 500 µg/mL, pri večjih koncentracijah pa se aktivnost začne zmanjševati, najverjetneje zaradi samoorganizacije polimernih verig. Protibakterijsko delovanje polimera qPLL<sub>20%</sub> je nekoliko boljše kot delovanje qPLL<sub>12%</sub>, vendar tudi ta polimer kaže podoben trend. Maksimalna delujoča koncentracija je bila 250 µg/mL, od 250 do 2000 µg/mL aktivnost upada, nato pa pri koncentracijah, večjih od 2000 µg/mL, ponovno narašča. Najboljše protibakterijsko delovanje sta izkazala polimera qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub>, saj

sta oba dosegla MIC, obenem pa pri njiju nismo opazili zmanjšanja aktivnosti z večanjem koncentracije polimera.

Polimeri z manjšim deležem oktilnih verig ( $q\text{PLL}_{12\%}$  in  $q\text{PLL}_{20\%}$ ) izkazujejo pri večjih koncentracijah slabšo protibakterijsko aktivnost, kar je verjetno posledica samoorganizacije polimerov preko hidrofobnih interakcij nad določeno koncentracijo polimera. Zaradi tega pride do navidezno manjše koncentracije polimera v raztopini in do manjšega števila oktilnih verig, ki bi se lahko vezale na membrano bakterijske celice. Zato  $q\text{PLL}_{12\%}$  in  $q\text{PLL}_{20\%}$  ne dosežeta MIC. Pri polimerih z večjim deležem hidrofobnih verig ( $q\text{PLL}_{31\%}$  in  $q\text{PLL}_{38\%}$ ) verjetno prav tako pride do samoorganizacije alkilnih verig, vendar je alkilnih verig dovolj, da se protibakterijski učinek, kljub asocijaciji polimernih verig, ne izgubi. Samoorganizacija  $q\text{PLL}$  polimerov je bila dokazana z DLS tehniko (slika 15). DLS rezultati so pokazali, da se pri manjših koncentracijah polimerov asociati niso tvorili. Z večanjem koncentracije polimerov je prišlo do nastanka slabo definiranih asociatov, ki so izkazovali široko porazdelitev velikosti asociiranih zvrsti. Iz grafov je razvidno, da je asociacija polimernih verig v raztopini polilizina  $q\text{PLL}_{12\%}$  prisotna, vendar pa velikosti asociatov pri večjih koncentracijah nismo mogli ugotoviti, saj smo zaradi široke porazdelitve velikosti delcev dobili korelacijske funkcije, ki jih nismo mogli dobro opisati z matematičnimi funkcijami.



Slika 15: DLS rezultati za  $q\text{PLL}_{12\%}$  pri koncentracijah 2 mg/mL (levo) in 4 mg/mL (desno)

#### **4.3.3. Vpliv prisotnosti polilizinskih derivatov na kinetiko rasti *E. coli* in *B. subtilis***

Kot že omenjeno, smo rast bakterij v prisotnosti protibakterijskih polipeptidov spremljali v časovnem intervalu 14 ur, meritve pa so bile opravljene vsakih 20 minut. Iz prikazanih krivulj, ki kažejo časovno rast bakterij je razvidno, da je pri *B. subtilis* pri nekaterih koncentracijah prišlo do t.i. lag faze (faza nedelitve celic), kar se na krivuljah kaže kot popolna ustavitev rasti bakterij v začetnem času (slika 16). Po določenem času se je lag faza zaključila in bakterije so začele normalno rasti. Očitno je do takšnega pojava prišlo pri koncentracijah tik pod MIC, kar je bilo ugotovljeno že pri antibiotikih kot so npr. ciprofloksacin, vankomicin, daptomicin in drugih (38).

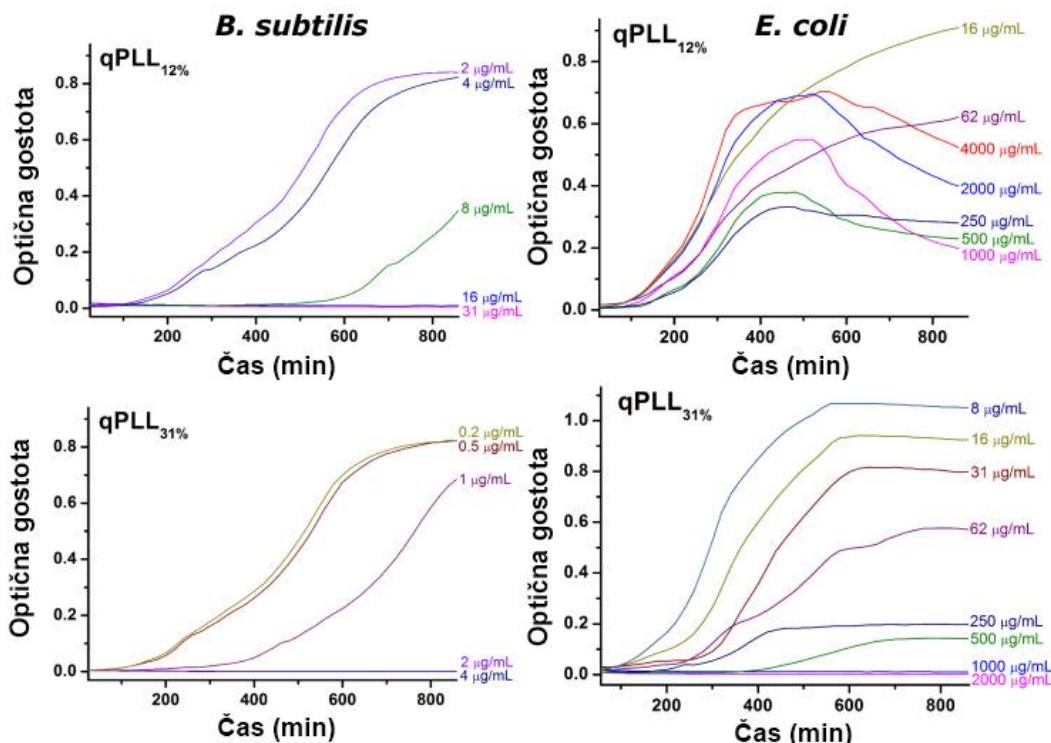
Pri *E. coli* je bila izrazita lag faza opažena le pri qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub>, pri koncentracijah polimera tik pod MIC. V teh primerih se optična gostota OD<sub>600</sub> ni spremnjala, ampak je ostala nespremenjena do konca meritev (qPLL<sub>31%</sub>, c = 500 µg/mL). Kvaternizirani PLL z majhnim deležem hidrofobnih verig, qPLL<sub>12%</sub> in qPLL<sub>20%</sub>, so slabše inhibirali rast bakterij *E. coli* tako pri majhnih kot pri velikih koncentracijah qPLL (slika 16). Na krivuljah, ki podajajo časovno odvisnost rasti bakterij, se to opazi kot padec optične gostote, po tem ko je rast bakterij doseгла maksimum (qPLL<sub>12%</sub>, c = 1000 µg/mL). Najverjetnejše je vzrok za padec optične gostote delovanje polimera na membrano *E. coli*, kar vodi v bakteriolizen učinek.

Razlike v protibakterijskem delovanju qPLL polimerov na *B. subtilis* in *E. coli* lahko pripisemo različnim strukturnim značilnostim membran obeh vrst bakterij. Gram-pozitivne bakterije imajo fosfolipidni dvosloj z negativno nabitim peptidoglikanskim slojem, Gram-negativne bakterije pa imajo še dodaten fosfolipidni dvosloj, ki preprečuje delovanje protibakterijskega polimera na notranjo membrano. Pri polimerih z večjim deležem vezanih hidrofobnih verig pride do delovanja na membrano Gram-negativnih bakterij hitreje in bolj učinkovito. Prav zato imata qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub> večjo protibakterijsko aktivnost kot qPLL<sub>12%</sub> in qPLL<sub>20%</sub>.

Na grafu za qPLL<sub>12%</sub> lahko primerjamo koncentracije 4000 µg/mL, 2000 µg/mL in 1000 µg/mL. Bakterije *E. coli* dosežejo večji OD<sub>600</sub> pri koncentraciji polimera 4000 µg/mL kot pri koncentraciji 1000 µg/mL. Očitno pri večji koncentraciji polimera pride do samoorganizacije hidrofobnih verig, kar navidezno zmanjša koncentracijo polimera, ki naj bi bil na voljo za interakcije z bakterijskimi membranami. Prav to preprečuje polimeroma qPLL<sub>12%</sub> in qPLL<sub>20%</sub>, da bi doseгла MIC. Tudi pri PMP je bila opažena manjša

protibakterijska aktivnost pri večjih koncentracijah (39). Pri qPLL, ki vsebujejo večji delež oktilnih verig (31 % in 38 %) je protibakterijska aktivnost polimerov naraščala z večanjem koncentracije. Sklepamo lahko, da je vseeno prišlo do pojava samoorganizacije polimernih verig, vendar zaradi večjega deleža oktilnih verig, samoorganizacija ni vplivala na protibakterijsko aktivnost.

Razliko v protibakterijskem delovanju polimerov na različne vrste bakterij navajajo tudi pri norbornenih, sinteznih protimikrobnih peptidih pripravljenih s polimerizacijo z odpiranjem obroča. Močneje so delovali proti Gram-pozitivnim bakterijam (*S. aureus*) in šibkeje na Gram-negativne bakterije (*E. coli*). Razloge za to lahko pripisemo razlikam v sestavi membrane Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij, zlasti pa dvojni membrani Gram-negativnih bakterij (40).



**Slika 16:** Kinetika bakterijske rasti *B. subtilis* in *E. coli* ob prisotnosti različnih koncentracij qPLL<sub>12%</sub> in qPLL<sub>31%</sub>

Sintetizirani kvaternizirani polilizini so zaradi svoje selektivnosti potencialni kandidati za delovanje tudi na druge vrste Gram-pozitivnih bakterij. Če bi biorazgradljivi derivati polilizina, ki delujejo na *B. subtilis*, delovali tudi proti drugim Gram-pozitivnim bakterijam, predvidevamo, da bi jih lahko potencialno uporabili npr. za zdravljenje gastrointestinalnega trakta, respiratornega trakta in kože, pri okužbi z Gram-pozitivnimi bakterijami, brez da bi pri tem negativno vplivali na normalno prisotno floro teh področij (41). S tem ne bi porušili

normalne bakterijske flore, do česar pride pri drugih protibakterijskih polimerih, ki imajo širši spekter protibakterijskega delovanja.

#### 4.4. HEMOLIZNA AKTIVNOST

Po tem ko smo ugotovili protibakterijsko aktivnost, smo pripravljenim kvaterniziranim polipeptidom preverili še njihovo aktivnost na eritrocite, kot primer celic, za katere ne želimo, da bi polipeptidi nanje delovali. S tem smo ugotovili, kateri izmed pripravljenih derivatov poli(L-lizina) je najbolj selektiven. Polipeptide smo raztopili v eritrocitnem pufru in nato serijsko redčili v mikrotitrski plošči. Koncentracije tako pripravljenih raztopin so bile v območju od 8000 do 3,90 µg/mL, volumen raztopine v vsaki od vdolbinic pa je bil 100 µL (Tabela IV).

**Tabela IV:** Redčitve polipeptidov v eritrocitnem pufru

	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>
c (µg/mL)	8000	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9

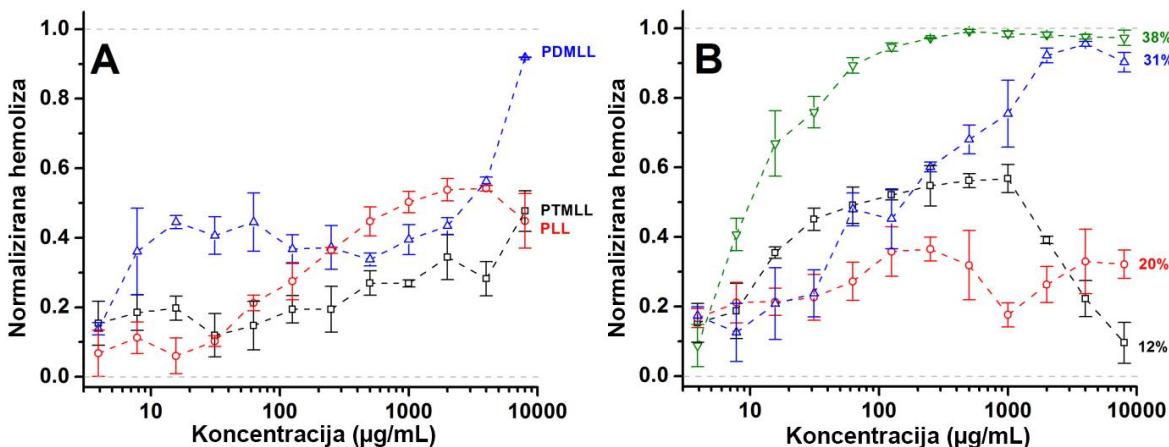
Kot pozitivno kontrolo smo pripravili 8 % V/V raztopino tritona iz Triton X-100, negativno kontrolo pa je predstavljal sam eritrocitni pufer. Tik pred meritvijo smo v vse vdolbinice, k raztopinam polipeptidov ter pozitivni in negativni kontroli, dodali po 100 µL ustrezno redčene eritrocitne suspenzije. Kinetiko lize eritrocitov smo merili pri 37 °C med stalnim stresanjem, na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader, in sicer 30 minut pri 600 nm, v 20 sekundnih intervalih. Samo hemolizo eritrocitov smo merili pri temperaturi 37 °C, da smo zagotovili enake razmere kot pri testih protibakterijske aktivnosti. Vsak od vzorcev je bil pripravljen in merjen v treh paralelkah.

Vrednost normalizirane hemolize je bila izračunana iz izmerjenih vrednosti OD<sub>600</sub>, z uporabo enačbe:

$$OD_{600} = \frac{OD_{vzorec} - OD_{neg. \ kontr.}}{OD_{poz. \ kontr.} - OD_{neg. \ kontr.}}$$

Kot ODpozitivne kontrole smo uporabili OD vrednost tritona, ki je predstavljala 100-odstotno hemolizo eritrocitov. Za ODnegativne kontrole pa smo uporabili povprečno OD vrednost za eritrocitni pufer z dodanimi eritrociti.

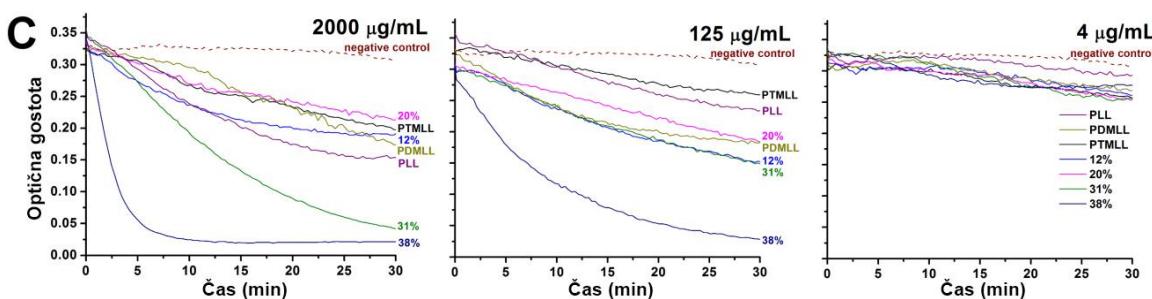
Iz krivulj na grafih (slika 17), ki prikazujejo vrednosti normalizirane hemolize v odvisnosti od koncentracije, je razvidno, da koncentracija polimera vpliva na hemolizno aktivnost pri vseh sintetiziranih polimerih: PLL, PDMLL, PTMLL, qPLL<sub>12%</sub>, qPLL<sub>20%</sub>, qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub>. V primerjavi s PLL je imel PDMLL večjo hemolizno aktivnost, PTMLL pa nekoliko manjšo hemolizno aktivnost, razen pri zelo majhnih koncentracijah polimera. Do tega verjetno pride zaradi prisotnosti kvaterne amonijeve skupine v PTMLL, ki ima konstanten naboj, neodvisen od pH. Tako nima takšnega učinka na eritrocitne celice, katerih membrana ima neto nevtralen naboj. Lipidne membrane imajo namreč nevtralno površino, zato so za hemolizno delovanje polimerov pomembne zlasti hidrofobne interakcije med lipidnim dvoslojem membrane eritrocitov in polimeri. Prav zaradi tega izkazujejo polimeri z večjim deležem hidrofobnih skupin večjo hemolizno aktivnost (42).



**Slika 17:** A-Hemolizna aktivnost PLL, PDMLL, PTMLL; B-Hemolizna aktivnost metiliranih in oktiliranih PLL

Povečanje hemolizne aktivnosti opazimo že pri prvem z oktilno skupino modificiranim polimeru, qPLL<sub>12%</sub>, saj ima večjo hemolizno aktivnost kot PTMLL. Hemolizna aktivnost qPLL<sub>12%</sub> se z večanjem koncentracije polimera veča, vendar pri koncentracijah polimera nad 1000 µg/mL opazimo zmanjšanje hemolizne aktivnosti. Razlog za takšen pojav je lahko samoorganizacija polimernih verig pri večjih koncentracijah qPLL<sub>12%</sub>. Lahko rečemo, da so opisani rezultati za hemolizno aktivnost derivatov polilizina pričakovani, saj naj bi imeli polimeri z večjo protibakterijsko aktivnostjo tudi večjo hemolizno aktivnost. Tako kot pri testu protibakterijske aktivnosti, je tudi pri hemolizi posebnost qPLL<sub>20%</sub>, saj se okoli koncentracije 1000 µg/mL vpliv polimera na eritrocite zmanjša nato pa pri večjih koncentracijah zopet poveča. Zanimivo je, da je celotna hemolizna aktivnost qPLL<sub>20%</sub> manjša kot pri qPLL<sub>12%</sub>, poleg tega pa qPLL<sub>20%</sub> izkazuje boljše protibakterijsko delovanje na obe vrsti bakterij, *E. coli* in *B. subtilis*.

Polimera qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub> imata v primerjavi z vsemi drugimi polimeri zelo visoko stopnjo hemolize, ki z večanjem koncentracije polimera strmo narašča (slika 18). To se na grafu, ki prikazuje časovno odvisnost OD za koncentracijo polimera 2000 µg/mL vidi kot hitro zmanjšanje vrednosti OD qPLL<sub>38%</sub>, v zelo kratkem času. Pri najmanjši testirani koncentraciji 4 µg/mL je hemoliza eritrocitov v prisotnosti različnih polipeptidov približno enaka in s tem neodvisna od strukture polipeptida. Predstavljeni rezultati so pomembni z vidika ustreznega razmerja med kationskimi in hidrofobnimi skupinami v polipeptidu. S tem dosežemo ustrezeno selektivnost protibakterijskih polipeptidov med bakterijskimi in sesalskimi celicami.



**Slika 18:** C-Kinetični profil hemolize PLL derivatov, pri koncentracijah 2000 µg/mL, 125 µg/mL in 4 µg/mL

Hemolizna aktivnost kvaterniziranih polilizinov je odvisna tudi od načina porazdelitve oktilnih verig vzdolž polimernih verig. Glede na dobljene rezultate in samo naravo sinteze qPLL polimerov so oktilne verige najverjetneje razporejene vzdolž glavne verige naključno. V literaturi so poročali, da so imeli naključni kopolimeri večjo hemolizno aktivnost in slabšo selektivnost kot pa blok kopolimeri, kar so razložili z nastankom enostransko amfifilnih struktur v primeru naključnih kopolimerov, ki so se vezali tako na membrane bakterijskih celic kot tudi na eritrocite. Blok kopolimeri, ki se v raztopini uredijo v urejene strukture tako, da imajo na zunanjih strani le kationski naboj, pa se nasprotno selektivno vežejo le na bakterijske celice (43, 44). Pri sintetiziranih qPLL sta kationska skupina in hidrofobna skupina vezani na isti center. Zato se pri tvorbi enostranskih amfifilnih struktur obe skupini obrneta v isto smer, kar je lahko razlog za delno zmanjšanje hemolizne aktivnosti, zlasti v primeru qPLL z manjšim deležem hidrofobnih skupin.

## 5. ZAKLJUČEK

Namen našega dela je bila priprava protibakterijskih sinteznih polipeptidov na osnovi lizina, ki bi predstavljali alternativo naravnim protibakterijskim peptidom, prav tako pa bi bili biološko razgradljivi, za razliko od večine znanih sinteznih protibakterijskih polimerov. Želeli smo dokazati, da lahko s specifičnimi po-polimerizacijskimi modifikacijami pripravimo polipeptide, ki imajo od strukture odvisne protibakterijske lastnosti.

Iz aminokisline lizin smo s polimerizacijo z odpiranjem obroča najprej pripravili  $\alpha$ -poli(L-lizina). S po-polimerizacijskimi modifikacijami, kot sta metilacija in oktilacija, smo pripravili vodotopne, amfifilne, kvaternizirane produkte, ki so vsebovali različen delež hidrofobnih skupin. S pripravljenimi derivati poli(L-lizina), ki smo jih označili kot PLL, PDMLL, PTMLL, qPLL<sub>12%</sub>, qPLL<sub>20%</sub>, qPLL<sub>31%</sub> in qPLL<sub>38%</sub>, smo proučili vpliv različnih aminskih skupin in vpliv hidrofilno/hidrofobnega ravnotežja v strukturi polipeptidov na protibakterijsko in hemolizno delovanje sinteznih derivatov poli(L-lizina).

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da lahko s preprosto in dobro ponovljivo po-polimerizacijsko modifikacijo  $\alpha$ -poli(L-lizina) pripravimo dobro definirane kvaternizirane polipeptide. Za uspešnost po-polimerizacijske modifikacije je bilo treba primarne aminske skupine  $\alpha$ -poli(L-lizina) najprej dimetilirati ter nato kvaternizirati. Z dodatkom metiljodida in oktiljodida smo na aminske skupine dodali metilno ali oktilno skupino. Delež metilnih in oktilnih verig v polipeptidu smo uravnali s časom, po katerem smo v reakcijsko zmes dodali metiljodid, ter z razmerjem med oktiljodidom in metiljodidom ter polipeptidno verigo.

Vsi pripravljeni produkti so izkazali dobro protibakterijsko aktivnost na *B. subtilis* in nekoliko slabšo protibakterijsko aktivnost na *E. coli*. Ugotovili smo, da tako protibakterijska kot hemolizna aktivnost kvaterniziranega  $\alpha$ -poli(L-lizina) naraščata, z večanjem deleža hidrofobnih oktilnih verig, ki so vezane na polipeptid. Izjema je qPLL<sub>20%</sub>, ki ima optimalno protibakterijsko aktivnost proti bakterijam *B. subtilis* in najmanjšo hemolizno aktivnost med vsemi sintetiziranimi kvaterniziranimi polipeptidi. To nakazuje na pomembnost ustreznegra razmerja med kationskimi in hidrofobnimi skupinami v strukturi polimera, saj smo na tak način dosegli najbolj ugodno selektivnost polimera za bakterije.

Pri vseh kvaterniziranih derivatih  $\alpha$ -poli(L-lizina) je bil pri testu na bakterijah *B. subtilis* opažen pojav faze nedelitve bakterijskih celic, in sicer pri koncentracijah qPLL ravno pod MIC. Pri qPLL z manjšim deležem oktilnih skupin je bil pri večjih koncentracijah opažen

pojav zmanjšanja protibakterijske aktivnosti na *E. coli*. To v tem primeru kaže na samoorganizacijo polimernih verig pri večjih koncentracijah. Ta pojav ni bil opažen pri qPLL z večjim deležem oktilnih skupin, saj je njihova protibakterijska aktivnost boljša in morebitna samoorganizacija polimernih verig, zaradi dovolj visoke vsebnosti hidrofobnih skupin, ne vpliva na zmanjšanje protibakterijske aktivnosti.

## 6. LITERATURA

1. Dorner F., Lienkamp K.: Polymer-Based Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides (SMAMPs)-A New Class of Nature-Inspired Antimicrobial Agents with Low Bacterial Resistance Formation Potential. Royal Society of Chemistry **2014**, 9: 97-135.
2. Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J.: Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7th Edition, McGraw-Hill, New York, **2008**.
3. Sobczak M., Debek C., Oledzka E., Kozlowski R.: Polymeric systems of antimicrobial peptides – strategies and potential applications. Molecules **2013**, 18: 14122-14137.
4. Zhou C., Qi X., Li P., Chen W., Mouad L., Chang M., Leong S., Chan-Park M.: High potency and broad-spectrum antimicrobial peptides synthesized via ring-opening polymerization of  $\alpha$ -aminoacid-N-carboxyanhydrides. Biomacromolecules **2010**, 11, 60-67.
5. Nguyen L. T., Haney E. F., Vogel H. J.: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in Biotechnology **2011**, Vol. 29, No. 9: 464-472.
6. Engler A. C., Wiradharma N., Ong Z. Y., Coady D.J., Hedrick J. L., Yang Y.: Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections. Nano Today **2012**, 7: 201-222.
7. Yount N. Y., Yeaman M. R.: Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **2012**, 52: 337-360.
8. Cherkasov A., Hilpert K., Jenssen H., Fjell C.D., Waldbrook M., Mullaly S.C., Volkmer R., Hancock R.E.W.: Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. ACS Chemical biology **2008**, 4(1): 65-74.
9. Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. W.: Peptide antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews **2006**, 19(3): 491-511.
10. Chen J., Wang F., Liu Q., Du J.: Antibacterial polymeric nanostructures for biomedical applications. The Royal Society of Chemistry **2014**, 50: 14482-14493.

11. Samal S. K., Dash M., Van Vlierberghe S., Kaplan D. L., Chiellini E., van Blitterswijk C., Moroni L., Dubrule P.: Cationic polymers and their therapeutic potential. *The Royal Society of Chemistry* **2012**, 41: 7147-7194.
12. Kenaway E.-L., Worley S. D., Broughton R.: The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, 8(5): 1359-1384.
13. Muñoz-Bonilla A., Fernández-García M.: Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer science* **2012**, 37: 281-339.
14. Kuroda K., DeGrado W. F.: Amphiphilic polymethacrylate derivatives as antimicrobial agents. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127: 4128-4129.
15. Mowery B. P., Lee S. E., Kissounko D. A., Epand R. F., Epand R. M., Weisblum B., Stahl S. S., Gellman S. H.: Mimicry of antimicrobial host-defense peptides by random copolymers. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129: 15474-15476.
16. Sahariah P., Benediktssdóttir B. E., Hjálmarsdóttir M. A., Sigurjonsson O. E., Sørensen K. K., Thygesen M. B., Jensen K. J., Másson M.: Impact of chain length on antibacterial activity and hemocompatibility of quaternary N-alkyl and N,N-dialkyl chitosan derivatives. *Biomacromolecules* **2015**, 16: 1449-1460.
17. Eren T., Som A., Rennie J. R., Nelson C. F., Urgina Y., Nüsslein K., Coughlin E. B., Tew G. N.: Antibacterial and hemolytic activities of quaternary pyridinium functionalized polynorbornenes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2008**, 209: 516-524.
18. Lienkamp K., Madkour A. E., Musante A., Nelson C. F., Nüsslein K., Tew G. N.: Antimicrobial polymers prepared by ROMP with unprecedented selectivity: A molecular construction kit approach. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130: 9836-9843.
19. Kadlecova Z., Baldi L., Hacker D., Wurm F. M., Klok H.-A.: Comparative study on the in vitro cytotoxicity of linear, dendritic and hyperbranched polylysine analogues. *Biomacromolecules* **2012**, 13: 3127-3137.
20. Yang X., Hu K., Hu G., Shi D., Jiang Y., Hui L., Zhu R., Xie Y., Yang L.: Long hydrophilic and cationic polymer: A different pathway toward preferential activity

- against bacterial over mammalian membranes. *Biomacromolecules* **2014**, *15*: 3267-3277.
21. Aliferis T., Iatrou H., Hadjichristidis N.: Living polypeptides. *Biomacromolecules*, **2004**, *5*: 1653-1656.
22. Habraken G. J. M., Peeters M., Dietz C. H. J. T., Koning C. E., Heise A.: How controlled and versatile is *N*-carboxy anhydride (NCA) polymerization at 0 °C? Effect of temperature on homo-, block- and graft (co)polymerization. *Polymer Chemistry* **2010**, *1*: 514-524.
23. Habraken G. J. M., Koning C. E., Heise A.: Peptide Block Copolymers by *N*-carboxyanhydride ring-opening Polymerization and atom transfer radical polymerization: The effect of amide macroinitiators. *Journal of Polymer Science* **2009**, *47*: 6883-6893.
24. Brulc B., doktorska disertacija: Sinteza blokkopolimerov različnih arhitektur na osnovi asparaginske kisline in laktida. Ljubljana, **2011**.
25. Exley S. E., Paslay L. C., Sahukhal G. S., Abel B. A., Brown T. D., McCormick C. L., Heinhorst S., Koul V., Choudhary V., Elasri M. O., Morgan S. E.: Antimicrobial peptide mimicking primary amine and guanidine containing methacrylamide copolymers prepared by raft polymerization. *Biomacromolecules* **2015**, *16*: 3845-3852.
26. Zhou C., Qi X., Li P., Chen W.N., Mouad L., Chang M.W., Leong S.S.J., Chan-Park M.B.: High potency and broad-spectrum antimicrobial peptides synthesized via ring-opening polymerization of  $\alpha$ -aminoacid-*N*-carboxyanhydrides. *Biomacromolecules* **2010**, *11*: 60-67.
27. Engler A. C., Shukla A., Puranam S., Buss H.G., Jreige N., Hammond P. T.: Effects of side group functionality and molecular weight on the activity of synthetic antimicrobial polypeptides. *Biomacromolecules* **2011**, *12*: 1666-1674.
28. Conte M., Aliberti F., Fucci L., Piscopo M.: Antimicrobial activity of various cationic molecules on foodborne pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *23*: 1679-1683.
29. Yoshida T., Nagasawa T.:  $\epsilon$ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and applicaton potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*: 21-26.
30. Shirbin S. J., Lam S. J., Chan N. J., Ozmen M. M., Fu Q., O'Brien-Simpson N., Reynolds E. C., Qiao G. G.: Polypeptide-based macroporous cryogels with inherent

- antimicrobial properties: The importance of a macroporous structure. American Chemical Society Macro Letters 2016, 5: 552-557.
31. Wilder R., Mobashery S.: The use of triphosgene in preparation of *N*-carboxy- $\alpha$ -amino acid anhydrides. The Journal of Organic Chemistry 1992, 57: 2755-2756.
32. Cheng J., Deming T. J.: Synthesis of polypeptides by ring-opening polymerization of  $\alpha$ -amino acid *N*-carboxyanhydrides. Topics in Current Chemistry 2012, 310: 1-26.
33. Vayaboury W., Giani O., Cottet H., Bonaric S., Schue F.: Mechanistic study of  $\alpha$ -amino acid *N*-carboxyanhydride (NCA) polymerization by capillary electrophoresis. Macromolecular Chemistry and Physics 2008, 209: 1628-1637.
34. Venkataraman S., Zhang Y., Liu L., Yang Y.-Y.: Design, synthesis and evaluation of hemocompatible pegylated-antimicrobial polymers with well-controlled molecular structures. Biomaterials 2010, 31: 1751-1756.
35. Huesmann D., Birke A., Klinker K., Türk S., Räder H. J., Barz M.: Revisiting secondary structures in NCA polymerization: Influences on the analysis of protected polylysines. Macromolecules 2014, 47: 928-936.
36. Shima S., Matsuoka H., Iwamoto T., Sakai H.: Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine. The Journal of Antibiotics 1984, 37: 1449-1455.
37. Palermo E. F., Kuroda K.: Chemical structure of cationic groups in amphiphilic polymethacrylates modulates the antimicrobial and hemolytic activities. Biomacromolecules 2009, 10: 1416-1428.
38. Theophil K., Schacht V. J., Schlüter, Schnell S., Stingu C. S., Schaumann R., Bunge M.: The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. Frontiers in Microbiology 2014, 5(544): 1-10.
39. Feder R., Dagan A., Mor A.: Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. The Journal of Biological Chemistry 2000, 276(6): 4230-4238.
40. Lienkamp K., Kumar K.-N., Som A., Nüsslein K., Tew G. N.: “Doubly selective” antimicrobial polymers: How do the differentiate between bacteria? Chemistry – A European Journal 2009, 15: 11710-11714.

41. Thoma L. M., Boles B. R., Kuroda K.: Cationic methacrylate polymers as topical antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Biomacromolecules* **2014**, 15: 2933-2943.
42. Kuroda K., Caputo G. A.: Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides. Wiley Interdisciplinary Reviews, Nanomedicine and Nanobiotechnology **2013**, 5: 49-66.
43. Oda Y., Kanaoka S., Sato T., Aoshima S., Kuroda K.: Block versus random amphiphilic copolymers as antibacterial agents. *Biomacromolecules* **2011**, 12: 3581-3591.
44. Wang Y., Xu J., Zhang Y., Yan H., Liu K.: Antimicrobial and hemolytic activities of copolymers with cationic and hydrophobic groups: A comparison of block and random copolymers. *Macromolecular Bioscience* **2011**, 11: 1499-1504.