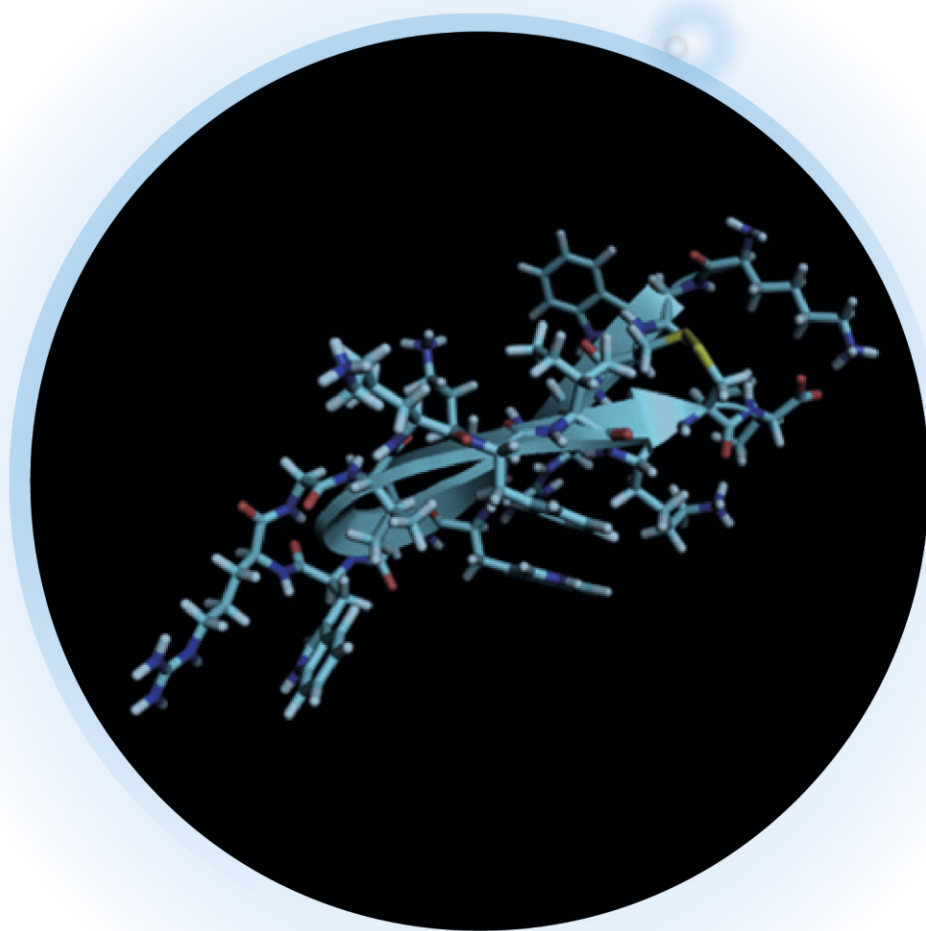


AMP2041

The Evolution of Knowledge

BORDEAUX 2016



Reserved to Veterinarians and Pharmacists



AMP2041

The Evolution of Knowledge
Bordeaux 2016

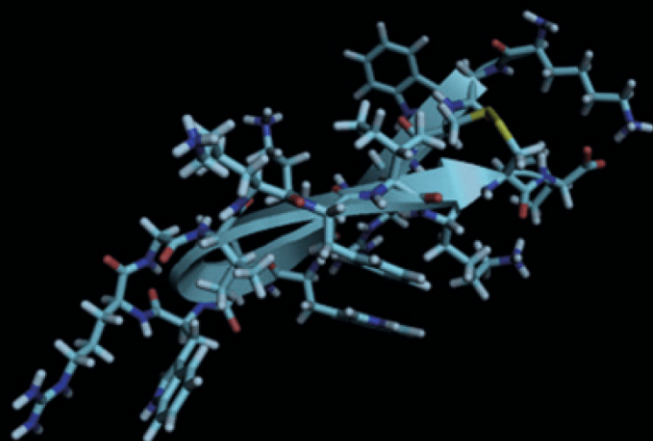


SPIS TREŚCI

1. Oporność na antybiotyki.....	2
2. ICF: nasze inicjatywy	3
3. AMP2041, czas o tym porozmawiać.....	4
3.1 Cechy.....	4
3.2 Mechanizm działania.....	7
4. Profil bezpieczeństwa	10
5. Wnioski	12

AMP2041

The Evolution of Knowledge



1. OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI

Antybiotykooporność to rzeczywisty i niepożądany element leczenia stawiający ciągłe wyzwania w medycynie ludzi i zwierząt. Postęp medycyny, a w tym opracowywanie nowych antybiotyków, znacząco przyczynił się do zmniejszenia zachorowalności oraz umieralności, spowodowanych infekcjami bakteryjnymi. Pojawienie się i rozpowszechnienie bakterii opornych na antybiotyki ograniczyło postęp w medycynie, ponieważ infekcje, które wcześniej dawały się łatwo kontrolować, stają się teraz coraz trudniejsze do wyleczenia.¹

Oporność na antybiotyki to problem europejski i ogólnosiwiatowy, dotykający szeregu branż, takich jak medycyna, weterynaria, hodowla zwierząt, rolnictwo, środowisko i handel.²

Globalny charakter problemu skłonił instytucje międzynarodowe takie jak: Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), do wydania poważnego ostrzeżenia. Ustalono priorytety, jakim sprostać będą musiały kraje członkowskie Wspólnoty Europejskiej. W rezolucji zatytułowanej „Europejska strategia walki z zagrożeniem mikrobiologicznym” (1999/C195/01) stwierdza się, że skutecznej redukcji zjawiska oporności na antybiotyki nie da się osiągnąć z pomocą środków wprowadzanych na poziomie krajów. Wymaga ona wspólnej strategii i skoordynowanych działań na arenie międzynarodowej.

Żywność i bezpośredni kontakt ze zwierzętami, stanowią jedną z dróg przenoszenia antybiotykooporności z patogenów zwierzęcych na patogeny ludzkie, a istotność tego typu zależności pomiędzy medycyną i weterynarią, ujęto w koncepcji „One Health” [Jedno Zdrowie]*.

W chwili obecnej w branży weterynaryjnej również pojawiły się niepokojące sygnały.³ Opublikowane w 2007 i 2010 r. przez EFSA raporty wspólnie stwierdzają, że niektóre spośród najpowszechniej występujących u zwierząt i w żywności bakterii zoonotycznych, wykształciły oporność na antybiotyki.

W szczególności zaś, wielokrotnie stwierdzano oporność na ampicylinę, sulfonamid i tetracykliny u badanych bakterii. Wiele krajów zgłaszało również oporność na fluorochinolony, makrolidy czy cefalosporyny trzeciej generacji (czyli antybiotyki, które odgrywają ważną rolę w leczeniu także ludzkich chorób⁴).

W ostatnich 10 latach znacznie wzrosła świadomość dotycząca problemu wykrywania opornych na antybiotyki bakterii u zwierząt domowych jak również możliwych skutków zdrowotnych dla ludzi. Mimo to problem antybiotykooporności nie znika.

Dzieje się tak przez wzrost ilości przepisywanych zwierzętom antybiotyków w sytuacji, gdy nie zawsze jest to zasadne. Powyższe zjawisko jeszcze bardziej zwiększyło ryzyko rozwoju oporności na antybiotyki i możliwe międzygatunkowe rozprzestrzenienie się opornych szczepów.

W związku z powyższym, pojawiła się pilna potrzeba wynalezienia nowych substancji o działaniu antybiotycznym. Podjęto znaczące wysiłki, choć nie zawsze są one zwieńczone zadawalającymi wynikami, w poszukiwaniu nowych związków funkcjonalnych, które mogą zostać wykorzystane jako alternatywa dla antybiotyków, gdy te drugie nie są konieczne wymagane. W dniu dzisiejszym najbardziej obiecującą opcją jest rozwój syntetycznych peptydów antyrodnoustrojowych (AMP). Badania naukowe nad rozwojem naturalnych peptydów wykazały ich wysoką skuteczność w szybkim likwidowaniu mikroorganizmów chorobotwórczych.

2. ICF: NASZE INICJATYWY

Od ponad dziesięciu lat nasze wysiłki skupiają się na poszukiwaniu skutecznych i bezpiecznych związków, które mogłyby stać się niezawodną alternatywą dla konwencjonalnych antybiotyków. Badania te doprowadziły do syntezy peptydów antydrobnoustrojowych, które są nie tylko skuteczne, ale również selektywne i bezpieczne.

W związku z tym dnia 28.10.2012 r. złożyliśmy wniosek o patent krajowy, a dnia 26.10.2015 r. został nam on przyznany z nr IT 1418804. Dnia 30.12.2013 r. złożyliśmy również wniosek o ochronę międzynarodową nr WO2014102596. Dzięki temu nasze sekwencje cyklicznych peptydów antydrobnoustrojowych zostały objęte ochroną patentową.

Osiągnięte wyniki uzyskaliśmy dzięki współpracy z wydziałami Medycyny Klinicznej i Eksperymentalnej oraz Nauk Medycznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu w Parmie oraz ze Szpitalem Klinicznym w Parmie. Peptydy stworzono i wyselekcjonowano z użyciem specjalnie zaprojektowanego oprogramowania przesiewowego - Generators Peptydów Antydrobnoustrojowych o nazwie STAMP, opracowanego przez ARTA PEPTIDION S.r.l.s., Parma.

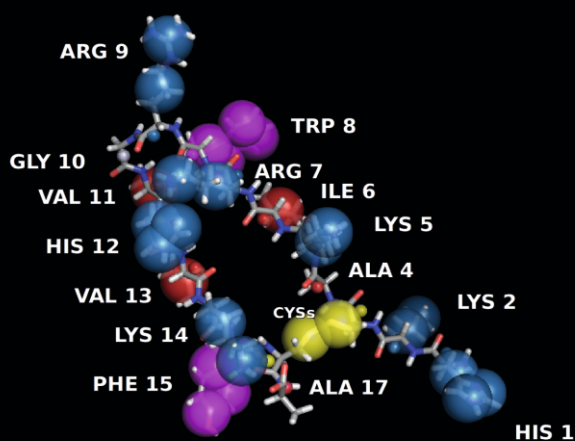
Na oprogramowanie składają się 4 moduły:

- 1 Generator losowych peptydów** - moduł tworzący poszczególne aminokwasy w liczbach całkowitych od 1 do 20 przez zastosowanie algorytmu Mersenne Twister i generatora liczb pseudolosowych, opracowanego przez Makoto i Takuji;
- 2 Pierwszy filtr przepływowy** - kontrolujący każdy wygenerowany losowy peptyd i eliminujący peptydy o nierokujących sekwencjach;
- 3 Moduł przesiewowy** - główny moduł oprogramowania wykorzystujący odpowiedź 5 sieci neuronowych do wybrania potencjalnie antydrobnoustrojowych peptydów; na sieci neuronowe składają się 3 w pełni połączone warstwy (wejścia-ukryta-wyjścia); na warstwę wejściową składa się szereg funkcji, po jednej dla każdego deskryptora (parametry fizykochemiczne lub strukturalne) użytego do opisu charakterystyk eksperymentalnie zweryfikowanych peptydów antydrobnoustrojowych; warstwa ukryta zawiera szereg neuronów w liczbie od połowy do dwukrotności ilości użytych deskryptorów;
- 4 Drugi filtr przepływowy** - filtrujący peptydy posiadające potencjał antydrobnoustrojowy i na przykład szacowaną rozpuszczalność w wodzie powyżej 90%; oprogramowanie wybiera 1 peptyd antydrobnoustrojowy spośród każdych 10.000 wygenerowanych peptydów.

Dzięki odpowiednim modyfikacjom filtrów i deskryptorów, to wyjątkowo elastyczne oprogramowanie pozwala na generowanie peptydów o ściśle określonych cechach chemicznych, fizycznych i strukturalnych. Peptydy te tworzone są nie tylko przeciw ogólnym kategoriom bakterii Gram(+) lub Gram(-), lecz także przeciw różnym grupom bakterii (np. *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*). Spośród opatentowanych sekwencji peptydów jeden wyróżnia się swoimi cechami szczególnymi i jednostkowymi. Nazwaliśmy go AMP2041.

3. AMP2041: CZAS O NIEJ POROZMAWIAĆ. NASTAŁA PRZYSZŁOŚĆ!

3.1. CECHY



Rys. Schemat peptydu AMP2041 w "pełno-atomowej" konfiguracji oraz w konfiguracji „gruboziarnistej”. Nałożenie na siebie obu tych konfiguracji pozwala na redukcję złożoności peptydu w stosunku 4:1.

AMP2041 ma następujące cechy:

- działanie antybakteryjne przeciw mikroorganizmom Gram(-) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp.) i Gram(+) (*Staphylococcus aureus* wrażliwy na metycylinę oraz *S. aureus* oporny na nią – MRSA)^{7,8},
- skuteczność przeciwko *Candida albicans* oraz *Malassezia pachydermatis*,
- wysoka rozpuszczalność w środowisku wodnym (>95%) gwarantująca łatwość zastosowania w różnych recepturach⁷,
- wysoka stabilność zapewniona przez obecność mostku dwusiarczkowego⁷,
- niewrażliwość na sól w stężeniach pozwalających na skuteczne zastosowanie w różnych środowiskach (skuteczność powyżej 90% w obecności 250 mM NaCl przeciw *P. aeruginosa* i *E. coli*)⁷,
- swoistość działania na komórki prokariotyczne⁷,
- szerokie spectrum działania na bakterie i grzyby⁷,
- działanie synergiczne z antybiotykami konwencjonalnymi⁷.
- działanie synergiczne z chlorheksydyną.

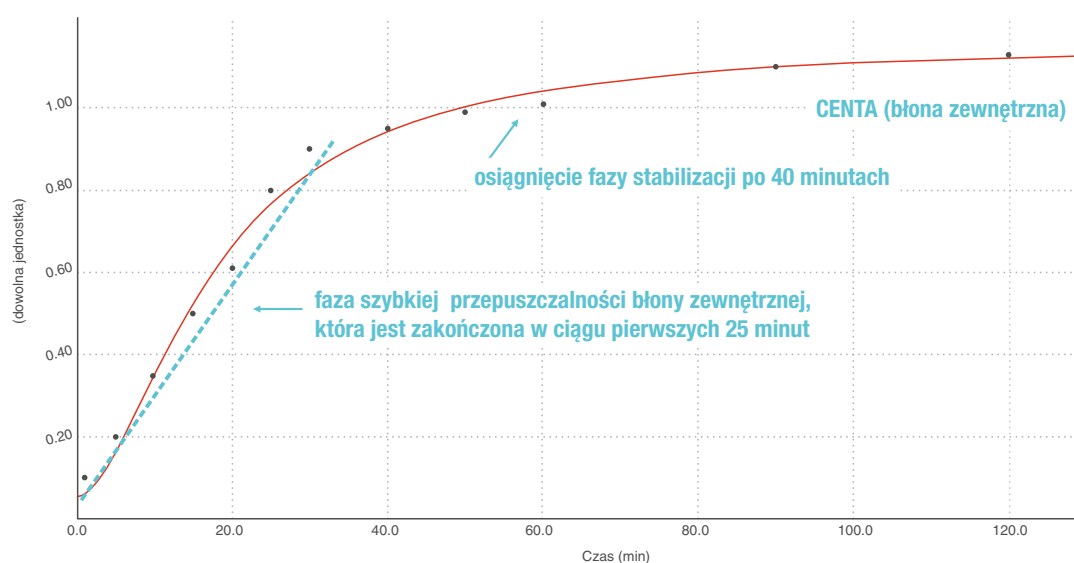
Szczególną cechą produkowanego przez ICF peptydu AMP2041 jest jego swoiste działanie, oparte na rozpoznawaniu różnic w ładunku oraz składzie błon wyższych komórek eukariotycznych oraz komórek prokariotycznych i grzybów.

Błony komórkowe bakterii zbudowane są ze znacznej ilości ujemnie naładowanych fosfolipidów, takich jak fosfatydyloseryna, fosfatydyloglicerol oraz difosfatydyloglicerol. Błony komórek eukariotycznych składają się z kolei ze składników o neutralnym ładunku oraz fizjologicznym pH – fosfatydylocholiny, sfingomieliny oraz cholesterolu, dzięki czemu nie są „atakowane” przez peptydy!

Działanie peptydu AMP2041 polega na zaburzeniu i destabilizacji błony komórkowej, co potwierdzono w badaniach:

Aktywność peptydu AMP2041 na wewnętrznej i zewnętrznej błonie *E. coli* MLY35pYC

Do oceny kinetyki przepuszczalności błony wykorzystano szczep *E. coli* MLY35pYC. Szczep ten, charakteryzujący się konstytutywną ekspresją beta-galaktozydazy, utworzony został poprzez transformację plazmidami kodującymi peryplazmatyczną beta-laktamazę. Kinetykę reakcji oceniono poprzez oznaczenie wartości absorbancji przy długościach fali 600 nm dla ONPG (błony wewnętrznej) oraz 405 nm dla CENTA (błony zewnętrznej). Pomiarów dokonywano co 10 minut przez łączny czas 120 minut.



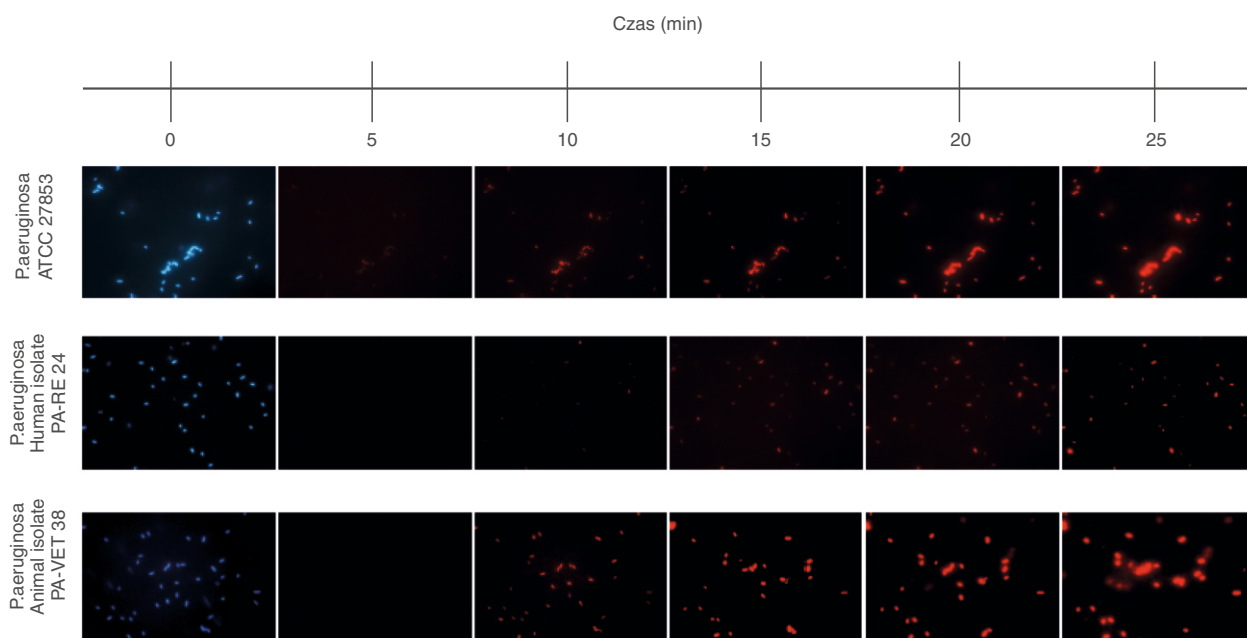
Rys. W następstwie uszkodzenia zewnętrznej błony komórkowej, peryplazmatyczna beta-laktamaza przerywa pierścień laktamowy CENTA, co skutkuje pojawieniem się zabarwienia możliwego do detekcji przez spektrofotometr. Powstanie zabarwienia jest możliwe dzięki zastosowaniu w buforze inkubacyjnym chromogennego antybiotyku betalaktamowego, zwanego CENTA. Wzrost gęstości optycznej (natężenia barwy) jest proporcjonalny do liczby bakterii z uszkodzoną błoną zewnętrzną. Wykres uwidacznia dwa wyraźne etapy. Podczas pierwszych 20-25 minut następuje faza gwałtownej przepuszczalności błon, co wskazuje na silną aktywność membranolytyczną peptydu AMP2041. W kolejnym etapie dochodzi do osiągnięcia fazy plateau w następstwie zmniejszenia się ilości bakterii z nienaruszoną błoną, a zatem zahamowaniem dalszego wybarwiania.



W następstwie uszkodzenia wewnętrznej błony komórkowej, cytoplazmatyczna beta-galaktozydaza degradowe substrat do jego dwóch składowych, co skutkuje pojawieniem się zabarwienia możliwego do detekcji przez spektrofotometr. Powstanie zabarwienia jest możliwe dzięki zastosowaniu w buforze inkubacyjnym ONPG, chromogennego substratu złożonego z jednej cząsteczki nitrofenolu oraz jednej cząsteczki galaktozy. Wzrost gęstości optycznej (natężenia barwy) jest proporcjonalny do liczby bakterii z uszkodzoną błoną wewnętrzną.

Wykres uwidacznia dwa wyraźne etapy. Podczas pierwszych 20-25 minut następuje faza gwałtownej przepuszczalności błon, co wskazuje na silną aktywność membranolytyczną peptydu AMP2041. W kolejnym etapie dochodzi do osiągnięcia fazy plateau w następstwie zmniejszenia się ilości bakterii z nienaruszoną błoną, a zatem zahamowaniem dalszego wybarwiania.

Kolejny test kinetyki przepuszczalności błony wykonano z zastosowaniem cytofluorometru przepływowego oraz pomiaru absorpcji jodku propidyny (PI), potwierdzając lityczną aktywność peptydu AMP2041 w stosunku do błon komórkowych bakterii.



Rys. Obraz membranolitycznej aktywności peptydu AMP2041 uzyskany z użyciem kontrastu w postaci jodku propidyny (PI), który nie przenika przez nieuszkodzoną błonę. Po uszkodzeniu błony jodek propidyny penetruje komórki i wiąże się z DNA. Po wzbudzeniu światłem niebieskim, uszkodzone komórki emitują jasną czerwoną fluorescencję. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości kontrastu związanego DNA. Ilustracja przedstawia pierwotne uszkodzenie błony po 10 minutach inkubacji z peptydem AMP2041. Wraz z upływem czasu uszkodzenia stają się coraz bardziej widoczne aż do maksimum wysycenia osiąganego po 25 minutach inkubacji. Membranolityczne działanie peptydu jest specyficzne dla szczepu.

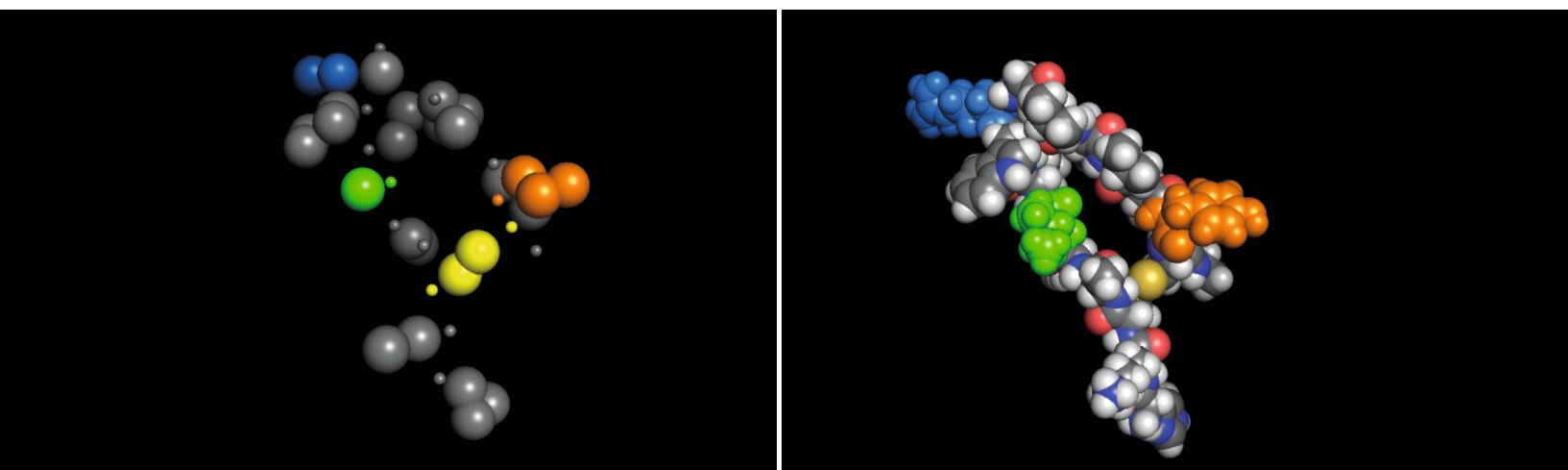
3.2. MECHANIZM DZIAŁANIA

Poznanie mechanizmu działania peptydu AMP2041 jest kluczowe dla zrozumienia mechanizmu jego interakcji z błonami bakterii. Interakcja pomiędzy peptydem, a powierzchnią błony komórkowej bakterii determinowana jest w pierwszej kolejności przez oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. W dalszym etapie cząsteczki AMP2041 tworzą otwory w błonie komórkowej, co wiąże się z redukcją jej gradientu protonowego. Skutkuje to wypływem cząsteczek z cytoplazmy, zahamowaniem produkcji ATP oraz spowolnieniem procesów metabolicznych komórki bakteryjnej aż do jej śmierci.

Niezwykle ważną rolę w działaniu peptydu odgrywa sekwencja aminokwasów. Zamiana któregośkolwiek z aminokwasów na inny może znacząco wpłynąć na efektywność jego oddziaływania względem bakterii. Aktywność andydnobnoustrojowa peptydu AMP2041 została potwierdzona w testach *in vitro*. Charakteryzuje się on również doskonałym profilem bezpieczeństwa, co ocenione zostało równolegle w testach wykonanych *in vitro* na zwierzęcych komórkach epitelialnych.

Oceniono wiązanie powstające między peptydem AMP2041 a błoną komórkową bakterii z zastosowaniem obliczeń metodą dynamiki molekularnej. Proces ten przeprowadzono z zastosowaniem modelu „gruboziarnistego”, dzięki czemu zredukowano złożoność systemu i wydłużono czas trwania symulacji.

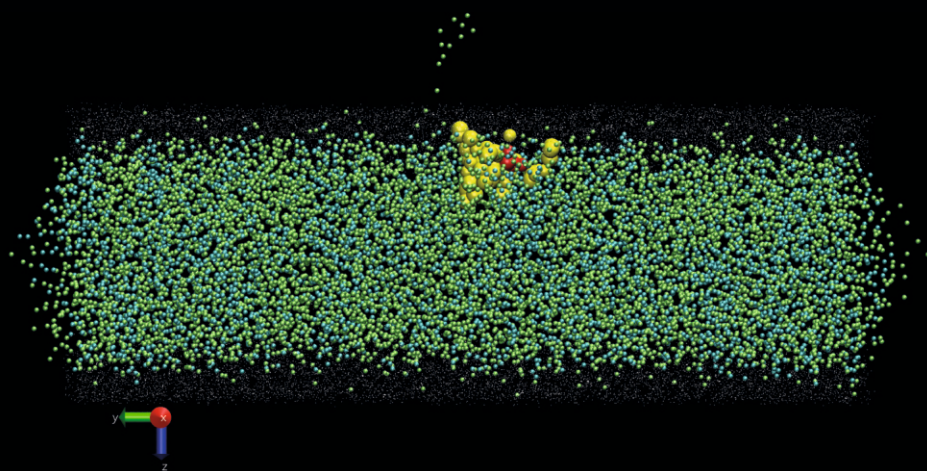
Poniżej przedstawiono model peptydu AMP2041 zarówno w widoku „pełno-atomowym” jak i „gruboziarnistym”¹⁰.



Rys. Badanie przeprowadzono z użyciem oprogramowania symulacyjnego GROMACS v 5.02, wykorzystującym pole siłowe Martini do konwersji „gruboziarnistości”. System symulujący błonę wewnętrzną bakterii Gram(-) składa się z 11.272 cząsteczek wody, 301 atomów sodu, 1.024 cząsteczek fosfolipidów. Fosfolipidy to: POPE (palmitoilo-oleoilo-fosfatydylo-etanolu-amina) oraz POPG (palmitoilo-oleoilo-fosfatydylo-glicerol).

Na początku symulacji peptyd AMP2041 umieszczany jest równoległe do błony. Następnie w wyniku oddziaływań z błoną, cząsteczka zaczyna się „obracać” przez pierwsze 500 ns symulacji. Po 30 ns AMP2041 wchodzi w styczność z błoną komórkową bakterii.

po 30ns

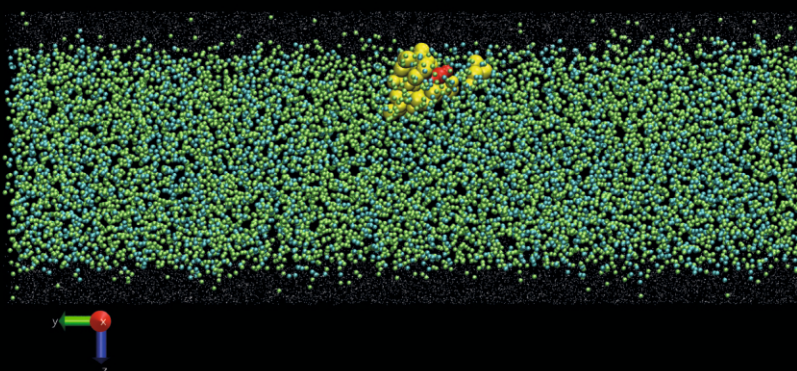


Rys. Badanie przeprowadzono z użyciem oprogramowania symulacyjnego GROMACS v 5.02, wykorzystującym pole siłowe Martini do konwersji „gruboziarnistości”.

System symulujący błonę wewnętrzną bakterii Gram-ujemnych składa się z 11.272 cząsteczek wody, 301 atomów sodu, 1.024 molekul fosfolipidów. Fosfolipidy to: POPE (palmitoilo-oleoilo-fosfatydylo-etanol-amina) oraz POPG (palmitoilo-oleoilo-fosfatydylo-glicerol).

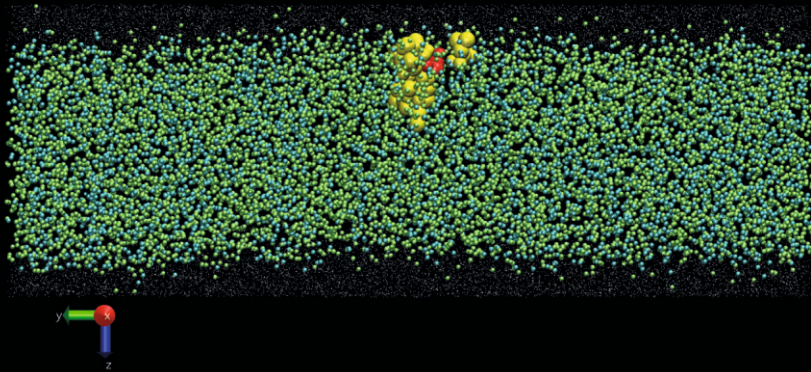
Obraz modelu błony (kule zielone/niebieskie), wody jako rozpuszczalnika (białe kropki) i peptydu (kule żółte, mostek dwusiarczkowy zaznaczono na czerwono) po 30 ns symulacji. Peptyd związany jest z błoną i zorientowany równoległe do niej.

po 100ns



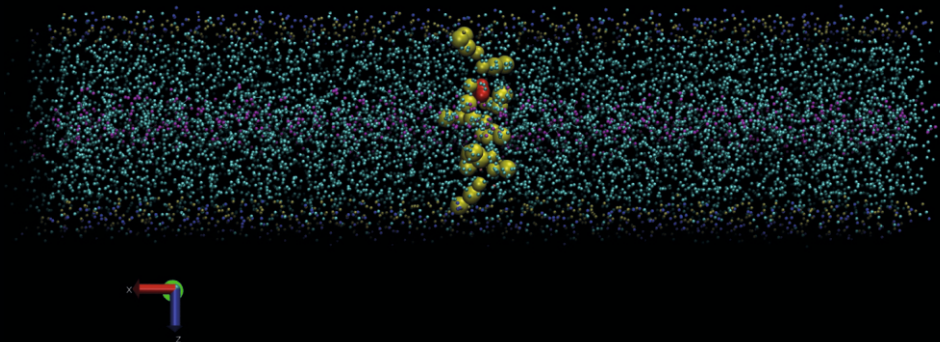
Rys. Obraz modelu błony (kule zielone/niebieskie) - wody jako rozpuszczalnika (białe kropki) i peptydu (kule żółte, mostek dwusiarczkowy zaznaczono na czerwono) po 100 ns symulacji. Peptyd związany jest z błoną. Można zaobserwować „obracanie się” peptydu o kąt około 25°.

po 250ns



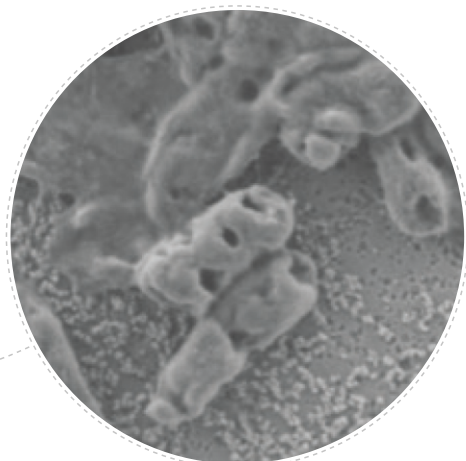
Rys. Obraz modelu błony (kule zielone/niebieskie) - wody jako rozpuszczalnika (białe kropki) i peptydu (kule żółte, mostek dwusiarczkowy zaznaczono na czerwono) po 250 ns symulacji. Peptyd związany jest z błoną i zorientowany prostopadle do niej pod kątem około 85° .

po 500ns



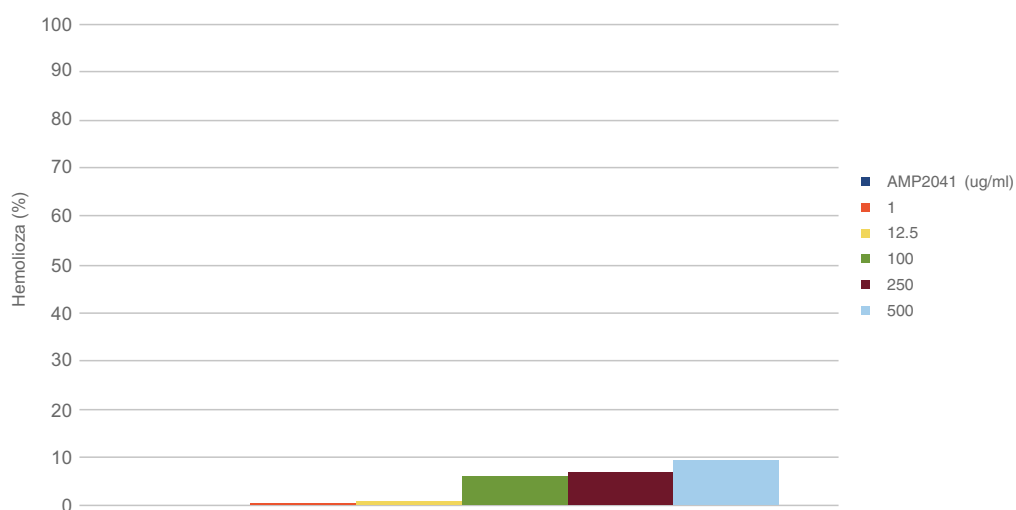
Rys. Obraz modelu błony (kule zielone/niebieskie) - wody jako rozpuszczalnika (białe kropki) i peptydu (kule żółte, mostek dwusiarczkowy zaznaczono na czerwono) po 500 ns symulacji. Peptyd zorientowany jest prostopadle do osi błony.

Zdjęcie bakterii pałeczkowatych z widocznymi otworami w błonie komórkowej spowodowanymi przez AMP2041.



4. PROFIL BEZPIECZEŃSTWA

Zakładając, że cytolityczne i bakteriobójcze działanie stanowi ostateczny wynik połączenia się AMP2041 z błoną komórkową, można zdecydowanie przyjąć, że AMP2041 jest więcej niż bezpiecznym peptydem.



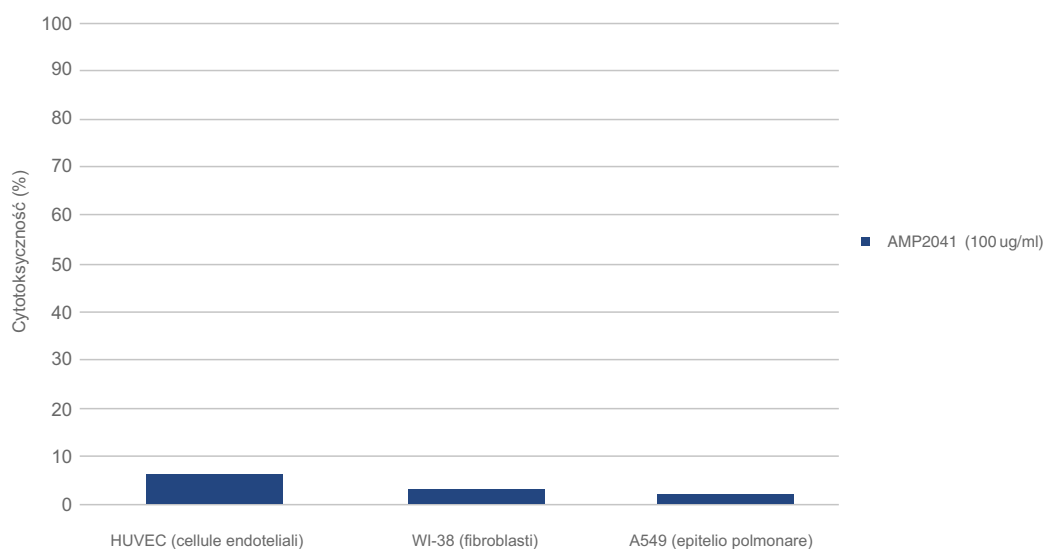
Rys. Metody hemolizy: bezpośrednio po pobraniu erytrocyty traktowane heparyną poddano wirowaniu przez 15 minut. Następnie przepłukano je trzykrotnie roztworem PBS, po czym zawieszono w 2% PBS z dodatkiem 308mM sacharozy. W dalszym etapie 50 µl zawiesiny erytrocytów inkubowano z 30 µl AMP2041 o różnych stężeniach (500; 250; 100; 12,5 i 1 ug/ml) w temperaturze 37°C przez 60 minut.

Na koniec uwolnienie hemoglobiny z erytrocytów zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Jako próbę pozytywną zastosowano 1% roztwór Tween-20, zaś do próby negatywnej użyto 10mM buforu fosforanowego z dodatkiem 308 mM sacharozy (w celu zachowania osmotyczności).

Wyniki badania wskazują, że AMP2041 jest peptydem bezpiecznym. Przy stężeniu 500 µg/ml hemoliza utrzymuje się na poziomie poniżej 10%. Pierwszym stężeniem peptydu, przy którym zaobserwowano hemolizę było 100 µg/ml, co odpowiada dawce 10mg/kg.

Bezpieczeństwo peptydu AMP2041 oceniono również na próbkach składników 3 głównych tkanek: komórek śródbłonna (z których zbudowane są naczynia krwionośne), fibroblastów (nadających strukturę tkankom) i komórek nabłonka (tworzących tkankę nabłonkową).

Wykres wyraźnie wskazuje na selektywną zdolność AMP2041 do skutecznego wiązania się z błonami komórkowymi bakterii (z redukcją ilości komórek), w odniesieniu do próbki kontrolnej w przedziale od 2 do 6%.



Rys. Ocenę cytotoxyczności przeprowadzono za Gillies RJ i in.¹²

Komórki inkubowano z AMP2041 w stężeniu 100µg/ml przez dwie godziny w temperaturze 37°C. Następnie zakonserwowano komórki w 1% formaldehydzie oraz zabarwiono 0,1% fioletem krystalicznym w PBS. Niezwiązany kontrast przemyto kilkukrotnie. Na koniec barwnik związany z komórkami rozpuszczono w 0,2% roztworze Triton-X w PBS. Intensywność wybarwienia roztworu, proporcjonalną do ilości komórek, analizowano spektrofotometrem przy długości fali 570 nm.

5. WNIOSKI

AMP2041 jest innowacyjną i skuteczną substancją antydrobnoustrojową, której działanie polega na zakłóceniu i destabilizacji błon komórkowych zarówno bakterii Gram-dodatnich (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*), jak i Gram(-) (*S. aureus* wrażliwy na metycylinę i odporny na nią – MRSA). Wykazuje również skuteczność przeciwko komórkom grzybów (*C. albicans*, *M. pachydermatis*).

Z niezliczonych testów dotyczących skuteczności działania peptydu AMP2041 wynika, że jest on:

- swoisty dla komórek prokariotycznych,
- synergiczny z konwencjonalnymi antybiotykami,
- synergiczny z nabytym układem odporności,
- niewywołujący oporności bakterii,
- bezpieczny.

Dzięki sumiennie przeprowadzonym badaniom ICF złożyło pierwszy wniosek o patent krajowy dnia 28.12.2012 r., który skutkowało otrzymaniem dnia 26.10.2015 r. patentu nr IT 1418808. Kolejnym był wniosek o patent międzynarodowy o numerze WO2015102596 złożony dnia 20.12.2013 r. Patenty te dotyczą nie tylko AMP2041, lecz także szeregu innych sekwencji cyklicznych peptydów antydrobnoustrojowych.

Po raz kolejny ICF wnosi olbrzymi wkład w medycynę weterynaryjną, nie tylko w sposób teoretyczny, lecz także w sposób konkretny i praktyczny, w oparciu o zademonstrowane fakty naukowe.

Wszystko to, by zaoferować lekarzom weterynarii pełny zakres rozwiązań, służący współczesnej wizji zawodu poświęconego dobru psów i kotów.

“those who think it is impossible, should not interrupt those who are doing it!” » (A. Einstein)

Więcej informacji:



GEULINCX POLAND Sp. z o.o.
ul. Wiatraczna 18,
72-004 Tanowo

tel.: +48 505 350 900
e-mail: biuro@geulincx.pl
www.geulincx.pl

BIBLIOGRAFIA

- 1 (Wang SY, George D, Purych D, Patrick DM, Antibiotic resistance: A global threat to public health. *BCMJ*, 2014, 6:295-296 — BC Centre for Disease Control).
- 2 (Roca I, Akova M, Baquero F, i in. *The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New Microbes and New Infections*. 2015;6:22-29).
- 3 (Carattoli A i in. 2005; Busani C. i in. 2004).
- 4 *EFSA Trends for Sources of zoonoses and Zoonotic Agents*, 2007
- 5 *EFSA Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, 2010*
- 6 *EFSA Trends for Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents an Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, 26 Aprile 2010;*
- 7 Romani AA, i in. *In vitro activity of novel in silico-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens. J Pept Sci*. 2013 Wrz; 19(9):554-65;
- 8 Cabassi CS, Taddei S, Cavirani S, Barinu MC, Sansoni P, Romani AA, *Broad-spectrum activity of a novel antibiotic peptide against multidrug-resistant veterinary isolates, Vet J*. 2013 Lis; 198(2):534-7;
- 9 Tossi A, Sandri L, Giangaspero A, 2000, *Biopolymers* 55, 4-30;
- 10 (D.H. de Jong, G. Singh, W.F.D. Bennett, C. Arnarez, T.A. Wassenaar, L.V. Schäfer, X. Periole, D.P. Tieleman, S.J. Marrink. *Improved parameters for the Martini coarse-grained force field, JCTC*, 2013 9:687-697;
- 11 Berendsen D, van der Spoel R, van Drunen *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, 1995, Comp. Phys. Comm.* 91:43-56;
- 12 Gilles RJ, Didier N, Denton M, *Determination of cell number in monolayer cultures. Anal. Biochem*, 1986; 159:109-113;