



Universiteit
Leiden
The Netherlands

New cationic amphiphilic compounds as potential antibacterial agents

Visser, Peter Christian de

Citation

Visser, P. C. de. (2006, February 23). *New cationic amphiphilic compounds as potential antibacterial agents*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4335>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4335>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

New Cationic Amphiphilic Compounds as Potential Antibacterial Agents

Bacteriële resistentie tegen antibiotica is een wereldwijd, steeds groter wordend probleem. Door foutief en overgebruik van bestaande antibiotica is het aantal typen bacteriën dat niet meer te bestrijden valt met deze middelen sterk gestegen. In het bijzonder voor Gram-negatieve bacteriën is resistentie een niet te verwaarlozen bedreiging; naast het feit dat dit soort bacteriën moeilijk te bestrijden is door het vrij impermeabele extra celmembraan, zijn patiënten die te maken hebben met een verergerde Gram-negatieve bacteriële infectie (bloedvergiftiging of sepsis) niet altijd gebaat bij de huidige antibiotica. Immers, nadat de bacterie gedood is door het antibioticum, komen membraanfragmenten vrij in de bloedbaan, die elders (weer) immunologische reacties kunnen veroorzaken waardoor de toestand van de patiënt verslechtert. De kans op overleven bij een dergelijke septische shock (de verergerde toestand van sepsis) is slechts 50-70%.

Het onderwerp van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is de ontwikkeling van nieuwe verbindingen met antibacteriële activiteit, specifiek gericht tegen Gram-negatieve bacteriën. Deze verbindingen zijn afgeleid van kationische antimicrobiële peptides (CAPs), een klasse van antibiotica die volgens een alternatief mechanisme werkt. Hoewel in het midden van de vorige eeuw ontdekt, kreeg deze klasse van antibiotica pas de laatste paar decennia meer aandacht vanwege de unieke eigenschappen. De meeste CAPs zijn selectief voor Gram-negatieve bacteriën vanwege hun kationisch karakter, waardoor elektrostatische interacties kunnen optreden met anionische bacteriële membraancomponenten. Bovendien zijn de meeste CAPs door hun natuurlijke samenstelling niet toxisch voor het menselijk lichaam; het menselijk lichaam maakt zelf ook gebruik van CAPs (bijvoorbeeld α - en β -defensines) in het aangeboren immuunsysteem.

De **Algemene Introductie** van dit proefschrift geeft een overzicht van de huidige status van antibiotica en lopend onderzoek naar nieuwe antibiotica gericht tegen Gram-negatieve bacteriën. De pathogenese van Gram-negatieve sepsis en septische shock worden verklaard aan de hand van de samenstelling van het buitenmembraan van Gram-negatieve bacteriën. In deze

Introductie wordt ook de CAP klasse van antibiotica besproken en een kort overzicht gegeven van onderzoek naar CAPs en door CAPs geïnspireerde verbindingen.

Hoofdstuk 1 beschrijft de synthese van een aantal analoga van het CAP drosocine. Dit CAP, geïsoleerd uit de fruitvlieg, mag op grond van een aantal gewenste eigenschappen als *lead compound* voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica worden beschouwd; het is volledig selectief voor Gram-negatieve bacteriën waarin het een *heat shock protein* inactieveert. Het bindt niet aan de menselijke variant van dit eiwit, is niet hemolytisch en niet toxisch. Het wordt echter afgebroken in menselijk serum voordat het zijn werk heeft kunnen doen. Door substituties van aminozuren aan weerszijden van de amide binding die in serum verbroken wordt, alsmede van het N-terminale aminozuur, werd een drosocine derivaat verkregen dat ~30x stabiel is dan drosocine zelf, maar met eenzelfde antibiotische activiteit.

De CAP subfamilie van polymyxines is onderwerp van **Hoofdstuk 2**. In dit hoofdstuk wordt een nieuwe syntheseroute voor deze cyclische lipopeptides gepresenteerd, die gebaseerd is op het gelijktijdig vormen van het cyclische peptide en afsplitsing van de hars waarop het peptide opgebouwd is. Deze synthese procedure vergemakkelijkt de zuivering van het eindproduct aanzienlijk omdat niet-gecycliseerde peptides achterblijven op de vaste drager. Via deze syntheseroute werden een aantal polymyxine B1 analoga bereid met substituties in een van beide hydrofobe regionen, omdat de toxiciteit van polymyxines aan deze regionen wordt toegedicht. De verkregen analoga vertoonden echter lagere tot geen antibacteriële activiteit en verminderde affiniteit voor lipopolysaccharide (LPS), de anionische membraancomponent van Gram-negatieve bacteriën.

Hoofdstuk 3 laat zien hoe de structuur van een bijproduct opgehelderd is dat gevormd werd tijdens de laatste zuiveringsstap van de polymyxines beschreven in Hoofdstuk 2. Dit bijproduct bleek hetzelfde molekulgewicht te hebben als de betreffende polymyxine, maar een andere LC retentietijd en MS/MS fragmentatiepatroon. De hypothese dat het hier gaat om een isomeer waarin de acyl groep van de N α van Dab1 verhuisd is naar de N γ positie van hetzelfde aminozuur werd bevestigd door deze isomeer te synthetiseren en te karakteriseren.

Hoofdstuk 4 behandelt het ontwerp en de synthese van antibiotica conjugaten gebaseerd op CAPs. In deze conjugaten zijn twee aparte verbindingen geconjugeerd door middel van een disulfide brug. Het betreft conjugaten van de CAPs tritrypticine, buforine II, het synthetische KFF peptide en een drosocine derivaat uit Hoofdstuk 1, met het polymyxine B nonapeptide (PMBN). Dit nonapeptide is een kleinere variant van polymyxine B dat niet alleen de antibiotische werking verloren heeft, maar tegelijkertijd ook de toxiciteit. Het nonapeptide heeft echter nog wel affiniteit voor LPS, en kan in deze conjugaten optreden als *sensitizer*; plaatselijke verstoring van

het buitenmembraan (*sensitizing*) zorgt ervoor dat het gehele conjugaat gemakkelijker het buitenmembraan kan passeren. Slechts de conjugaten met membraanactieve CAPs zijn antibacterieel actief; het KFF/PMBN conjugaat bleek in de tests zelfs een hogere affiniteit voor LPS te hebben dan de controle polymyxines.

Quaternaire ammonium verbindingen (QACs) behoren tot de eenvoudigste structuren die, net als CAPs, hydrofoob en kationisch zijn. In **Hoofdstuk 5** wordt de synthese en de antibacteriële activiteit besproken van een aantal op imidazool- en pyrrolidine-gebaseerde QACs. De meeste van deze verbindingen konden in gelfase gebracht worden door toevoeging van water, ethyleen glycol of glycerol. Deze gels bleken alle zeer effectief in antibiotische tests tegen *Escherichia coli*. Van de gel bestaande uit *N*-hexadecyl-*N'*-methylimidazolium bromide met 35% (gew.) ethyleen glycol bleek, in tegenstelling tot bijna alle andere gels, slechts een klein gedeelte weg te spoelen in een waterstroom. Deze positieve eigenschappen kunnen leiden tot de ontwikkeling van antibacteriële gels voor (preventieve) ontsmettingstoepassingen.

Het onderwerp van **Hoofdstuk 6** is peptide-gerelateerd en betreft de toepassing van polygefluoreerde groepen in de chemische synthese van peptiden. Door een polygefluoreerde (*fluorous*) groep te koppelen selectief aan een synthetisch peptide op de vaste drager, bleek dit gewenste peptide eenvoudig te zuiveren uit een mengsel met ongewenste incomplete verbindingen door middel van *fluorous* vloeistofchromatografie of *fluorous* vastestofextractie. Deze groep, FMsc genaamd, werd speciaal ontwikkeld voor dit doel. Voorts beschrijft dit Hoofdstuk ook een *fluorous* strategie waarin juist alle ongewenste verbindingen van een polygefluoreerde groep werden voorzien, zodat het gewenste peptide meteen verkregen kan worden zonder dat eerst de FMsc groep verwijderd hoeft te worden.

Tot slot wordt in **Hoofdstuk 7** een samenvatting gegeven van de voorgaande Hoofdstukken en worden een aantal toekomstperspectieven behandeld, waaronder de synthese van pentamidine/CAP conjugaten, als uitbreiding op Hoofdstuk 4. Pentamidine, een geneesmiddel voor de behandeling van de Afrikaanse slaapziekte, blijkt een grotere affiniteit voor LPS te hebben dan het polymyxine B nonapeptide, en kan de laatstgenoemde vervangen in de constructie van verbindingen die zowel een antibacterieel als een LPS-affiniteitsgedeelte hebben.

