Universiteit
Leiden
The Netherlands

Potentiation of Gram-positive specific antibiotics against Gram-negative bacteria through outer membrane disruption

Wesseling, C.M.J.

Citation
Wesseling, C. M. J. (2022, July 5). *Potentiation of Gram-positive specific antibiotics against Gram-negative bacteria through outer membrane disruption*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3421483

Version:	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/1887/3421483

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

Appendices

Samenvatting

Het uitbreiden van het huidige repertoire aan antibiotica is essentieel om de wapenwedloop tussen mens en resistente bacteriën te winnen. Klassen van antibiotica die qua behandeling gelimiteerd zijn tot Grampositieve pathogenen kunnen ook worden ingezet tegen Gramnegatieve bacteriën mits de integriteit van het buitenmembraan verstoord is. Het onderzoek beschreven in deze dissertatie omvat de ontwikkeling van nieuwe synergetische additieven aan antibiotica die ontworpen zijn om selectief de structurele integriteit van het buitenmembraan van Gramnegatieve bacteriën te verstoren.

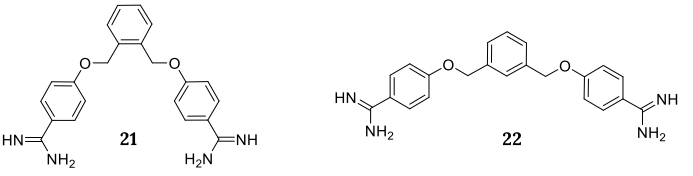
In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht van de huidige literatuur op het gebied van buitenmembraan verstorende synergetische moleculen gepresenteerd. Dit overzicht omvat lineaire en cyclische, positief geladen peptiden, positief geladen peptidenmimics, kleine moleculen met chelerende of lipofiele eigenschappen of positief ladingen, positief geladen steroïden en derivaten van aminoglycosiden antibiotica. Synergie wordt gedefinieerd door een fractioneel remmende concentratie-index (FICI) kleiner dan 0.5 (Vergelijking 1). De FICI fungeert als een numerieke representatie van de potentiëring: hoe kleiner het getal, hoe sterker de synergetische combinatie. Een bezwaar tegen een eenzijdige focus op FICI is dat men de concentratie waarmee de synergie plaatsvindt uit het oog verliest. Een ander belangrijk aspect in de evaluatie van buitenmembraan verstorende moleculen is de selectiviteit voor dit specifieke membraan. In de literatuur kan dit aspect over het hoofd worden gezien terwijl slechts een simpel hemolyse experiment met rode bloedcellen al enig inzicht in deze selectiviteit verschaft. Dit overzicht van de huidige literatuur heeft als doel om een vergelijking tussen gepubliceerde synergetische chemische verbindingen te faciliteren en kan derhalve bijdragen aan de optimalisatie en ontwikkeling van synergetische moleculen.

$$\mathrm{FICI} = \frac{\mathrm{MSC_{ant}}}{\mathrm{MIC_{ant}}} + \frac{\mathrm{MSC_{syn}}}{\mathrm{MIC_{syn}}} \quad (1)$$

Vergelijking (1). FICI berekening. MSC_{ant} = minimale remmende concentratie (MIC) van een antibioticum in combinatie met de synergist; MIC_{ant} = MIC van het antibioticum zelf; MSC_{syn} = MIC van de synergist in combinatie met het antibioticum; MIC_{syn} = MIC van de synergist zelf.

In **Hoofdstuk 2** wordt het synergetische potentieel van bis-amidines onderzocht. Recentelijk onderzoek toonde aan dat pentamidine, een anti-parasitair medicijn, ook het gebruik van Grampositieve antibiotica tegen Gramnegatieve bacteriën faciliteerde. Daarnaast werd ook een structuur-activiteit relatie (SAR) studie beschreven gelimiteerd tot commercieel verkrijgbare pentamidine analogen. In **Hoofdstuk 2** werd deze SAR studie verder uitgebreid met de synthese van bis-amidines waardoor een directe vergelijking van specifieke modificaties mogelijk werd. Screening middels checkerboard testen resulteerde in hits met verbeterde FICI waardes. Echter, de hemolyse screening toonde aan dat de meest potente hits ook hoge percentages van hemolyse veroorzaakten. Door deze bevinding verschoof onze aandacht naar bis-amidines **21** en **22** die een xyleen linker bevatten en niet in hemolyse resulteerden. (Afbeelding 1). Het brede spectrum van synergie van de chemische verbindingen **21** en **22** werd bevestigd in combinatie met verschillende antibiotica: erythromycine, rifampicine,

vancomycine en novobiocine. Synergie werd eerst vastgesteld met *Escherichia coli* en vervolgens ook aangetoond tegen *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* en resistente *E. coli* stammen.



Afbeelding 1. Moleculaire structuren van de potente, niet-hemolytische bis-amidines **21** en **22**

In de literatuur werd de binding van peptiden, afgeleid van trombine, met lipopolysacharide (LPS), een essentiële component van het Gramnegatieve buitenmembraan, gerapporteerd. Wij veronderstelden dat het binden van deze peptiden met het LPS zou kunnen leiden tot een verstoring van het buitenmembraan aangezien dit principe ook geldt voor andere synergetische moleculen. In **Hoofdstuk 3** bevestigde een screening van vier peptiden afgeleid van trombine deze hypothese aangezien er synergie met erythromycine en rifampicine voor *E. coli* werd geobserveerd. De optimalisatie van de lead peptide werd bereikt met een C-terminus amidatie gevolgd door een alanine scan. Van de 12 alanine scan peptiden zijn de peptiden resulterend in de hoogste synergie en laagste hemolyse weergeven in Tabel 1. Het spectrum van synergie werd op een vergelijkbare wijze onderzocht zoals beschreven voor de bis-amidines in **Hoofdstuk 2**. Opnieuw was er sprake van een brede synergistische activiteit: ditmaal bij de geoptimaliseerde peptiden in combinatie met meerdere antibiotica en voor resistente *E. coli* stammen en andere Gramnegatieve bacteriën.

Tabel 1. Overzicht van de peptiden afgeleid van het eiwit trombine: sequentie, synergetische en hemolytische activiteit.

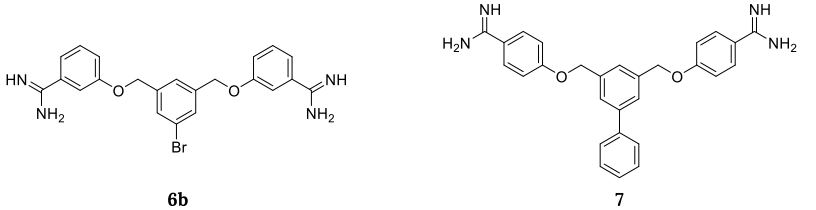
Peptide	Peptide sequentie	MIC[a]	$MSC_{peptide}$[b]	FICI[c]	Hemolyse %[d]
6	H_2N-VFRLKKWIQKVI-NH_2	12.5	3.13	0.313	4%
14	H_2N-VFRLKK**A**IQKVI-NH_2	>200	6.25	0.078	1%
19	H_2N-VFRLKKWIQKV**A**-NH_2	100	3.13	0.094	1%

[a]Minimale remmende concentratie (MIC); [b]Minimale synergistische concentratie (MSC); [c]Fractionele remmende concentratie-index (FICI); [d]Hemolyse percentage na 20 uur incubatie van de chemische verbindingen (200 μg/ml) met gedefibrineerd schapenbloed.

Recentelijk werd de synergie tussen human serum met zowel vancomycine en nisine voor Gramnegatieve bacteriën gerapporteerd. Het membraan-aanval complex (MAC) aanwezig in humaan bloed bleek verantwoordelijk voor deze synergie door het vormen van poriën in bacteriële membranen. Deze bevinding werd verder ondersteund doordat inhibitie van het MAC leidde tot een verlies van synergie. De synergie van andere Grampositieve antibiotica met humaan serum werd verder onderzocht in **Hoofdstuk 4**. Een cytoplasmamembraan permeabiliteitstest resulteerde in nisine en vancomycine als hits voor *E. coli*, terwijl alleen een bescheiden effect werd geobserveerd voor daptomycine en de overige geteste glycopeptide-antibiotica; telavancine, oritavancine en dalbavancine. Een bacteriële levensvatbaarheid test had als rol om deze hits te

valideren: de levensvatbaarheid van de *E. coli* cellen werd significant gereduceerd met nisine, vancomycine en dalbavancine in de aanwezigheid van serum. Daarnaast onthulde de bacteriële levensvatbaarheid test ook dat andere antibiotica in combinatie met serum een significant effect hadden op de levensvatbaarheid van *E. coli* cellen: erythromycine, quinupristine & dalfopristine en rifampicine. Helaas resulteerden de serum concentraties voor *K. pneumoniae* en *P. aeruginosa* zelf al in een reductie van levensvatbaarheid. Dit effect overschaduwde de resultaten met antibiotica. Langdurige blootstelling of blootstelling aan hoge concentraties humaan serum leidt tot de permeabilisatie van het bacteriële cytoplasmamembraan met een bacteriedodende activiteit tot gevolg. De optimalisatie van de serum concentratie is daarom raadzaam. Desalniettemin is de huidige data al een sterke indicatie dat nisine, rifampicine en vancomycine synergie vertonen met serum voor *K. pneumoniae*. Nisine, quinupristine & dalfopristine, rifampicine en vancomycine demonstreren synergie met serum tegen *P. aeruginosa*.

Een bescheiden activiteit van pentamidine tegen Grampositieve bacteriën was reeds bekend in de literatuur. Om deze reden volgde een screening van de bis-amidines uit **Hoofdstuk 2** voor antibacteriële activiteit tegen Grampositieve bacteriën in **Hoofdstuk 5**. De laagste minimale remmende concentratie (MIC) die werd geobserveerd was 0.25 μg/mL. Zoals tevens het geval in **Hoofdstuk 2**, bleken de meest potente bis-amidines hemolytisch te zijn. Het was echter opmerkelijk dat de hemolytische waardes aanzienlijk uit elkaar lagen, terwijl meerdere bis-amidines een overeenkomstig lipofiele structuur hadden. Om te onderzoeken of de oriëntatie van de linker ten opzichte van de amidine positie een rol speelde, werd er een nieuwe set van bis-amidines gesynthetiseerd met een aangepaste amidine positie. Van de vier nieuwe gesynthetiseerde bis-amidines was bis-amidine **6b** niet hemolytisch met het behoud van de inherente activiteit (Afbeelding 2). Tezamen met de minimaal hemolytische bis-amidine **7** werd de antibacteriële activiteit geëvalueerd voor meerdere Grampositieve stammen in verschillende groeimedia. Over het geheel bleek bis-amidine **7** potenter te zijn dan bis-amidine **6b**. Dit leidde tot het voorstel voor een therapeutisch venster aangezien de verschillen tussen de concentratie die hemolyse veroorzaakten (128 μg/mL) en de MIC waardes (0.25-4 μg/mL) voor bis-amidine **7** zeer groot waren.



6b **7**

Afbeelding 2. Chemische structuren van de meest potente bis-amidines **6b** en **7**