Universiteit
Leiden
The Netherlands

Semisynthetic glycopeptide antibiotics

Groesen, E. van

Citation
Groesen, E. van. (2022, October 12). *Semisynthetic glycopeptide antibiotics*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3480199

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/1887/3480199

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

Appendices |

Nederlandse samenvatting

List of abbreviations

List of publications

Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting

Antibiotica zijn essentiële medicijnen om bacteriële infecties te bestrijden. Veel antibiotica hebben het peptidoglycaan, een onderdeel van de bacteriële celwand, als doelwit. De bouwsteen voor peptidoglycaan is *lipid II*, dat na twee reacties – transglycosylatie en transpeptidatie – de peptidoglycaan laag vormt (**Fig. 1**). Dit maakt *lipid II* een interessant doelwit voor antibiotica. Een antibioticum dat *lipid II* als doelwit gebruikt is vancomycine, een glycopeptide antibioticum die gebruikt wordt om Grampositieve bacteriële infecties te behandelen. Door met hoge affiniteit aan de D-Ala-D-Ala termini van *lipid II* te binden, remt vancomycine de biosynthese van de Grampositieve bacteriële celwand (**Fig. 1** en **Fig. 2**), aangezien de transglycosylatie en transpeptidatie reacties hierdoor geblokkeerd worden. Echter, deze Grampositieve bacteriën kunnen resistent worden, waardoor vancomycine zijn activiteit verliest. Vancomycineresistentie kan voorkomen op verschillende manieren, waaronder: 1) modificatie van de D-Ala-D-Ala termini naar D-Ala-D-Lac, het meest voorkomende resistentiemechanisme, wat er in resulteert dat vancomycine niet meer goed kan binden aan zijn doelwit *lipid II* (**Fig. 2**), 2) modificatie naar D-Ala-D-Ser, en 3) verdikking van de peptidoglycaan laag en een verhoogd aantal D-Ala-D-Ala verbindingen om vancomycine te verstrikken. Om vancomycineresistente bacteriën te bestrijden, ontwikkelen onderzoekers nieuwe semisynthetische glycopeptide antibiotica. In semisynthese wordt gebruikt maakt van een bestaande glycopeptide structuur die gemodificeerd wordt door middel van organische synthese. Omdat de glycopeptide niet van de grond af aan opgebouwd hoeft te worden, is semisynthese een toegankelijke en kost-effectieve manier om nieuwe glycopeptide antibiotica te produceren. Het werk in deze thesis beschrijft de ontwikkeling en beoordeling van zulke nieuwe semisynthetische glycopeptide antibiotica.

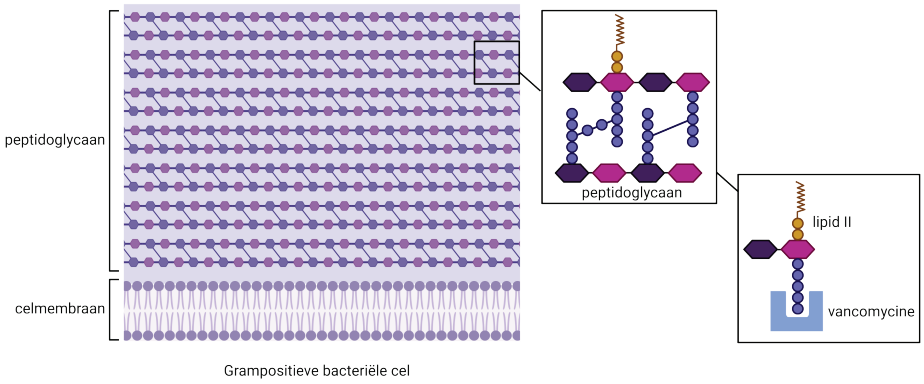

Fig. 1. Grampositieve bacteriële celwand ingezoomd op de peptidoglycaan laag en vancomycine binding aan peptidoglycaan precursor *lipid II*.

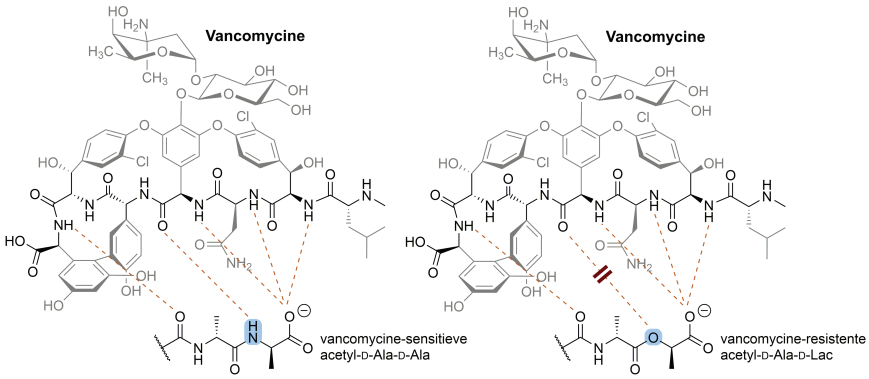

Fig. 2. Vancomycine activiteit en resistentie tegen Grampositieve bacteriën. Vancomycine bindt aan de D-Ala-D-Ala termini van lipid II met 5 waterstofbruggen. Doelwit modificatie naar D-Ala-D-Lac resulteert in het verlies van een waterstofbrug, wat leidt tot vancomycine resistentie.

Hoofdstuk 1 beschrijft alle semisynthetische glycopeptide antibiotica die gebruikt worden in de kliniek of die recent ontwikkeld zijn, met een focus op hun structuur, werkingsmechanisme, resistentieontwikkeling, *in vitro* en *in vivo* antibacteriële activiteit, farmacokinetiek, en toxiciteit. Telavancine, dalbavancine, en oritavancine zijn de enige semisynthetische glycopeptide antibiotica in gebruik in de kliniek. Hoewel deze glycopeptides vancomycineresistentie deels omzeilen, zijn de eigenschappen van deze antibiotica niet ideaal, zoals de slechte oplosbaarheid, de ongewone farmacokinetiek, en de toxiciteitsproblemen. Daarom is de ontwikkeling van nieuwe glycopeptide antibiotica met verbeterde antibacteriële activiteit en verbeterde farmacokinetiek- en toxiciteitsprofielen essentieel. Strategieën om deze glycopeptide antibiotica te ontwikkelen omvatten onder andere 1) het verkrijgen van verhoogde cel oppervlakte binding door lipide en/of positief geladen groepen in de glycopeptide structuur te verwerken, 2) het verkrijgen van een tweedelig werkingsmechanisme door conjugatie van glycopeptides aan pyrofosfaat-bindende groepen of antibiotica met andere werkingsmechanismen, 3) het covalent verbinden van twee glycopeptides, resulterend in glycopeptide dimeren, die colokalisatie naar het doelwit kunnen faciliteren, 4) focus op gerichte medicijnafgifte aan ziekte-gerelateerd weefsel, en 5) het uitbreiden van het antibacteriële spectrum van glycopeptides naar Gramnegatieve bacteriën.

Hoofstuk 2 gaat in op de synthese van een nieuwe klasse van semisynthetische glycopeptide antibiotica, de guanidino lipoglycopeptides (**Fig. 3**). Deze guanidino lipoglycopeptides bestaan uit vancomycine, gelinkt aan een aromatische linker, een positief geladen guanidino groep (bij fysiologische pH), en een lipofiele staart. Met vancomycine als start materiaal zijn deze antibiotica gesynthetiseerd in twee reactiestappen. Ondanks dat ze niet actief zijn tegen Gramnegatieve bacteriën, hebben de guanidino lipoglycopeptides potente antibacteriële activiteit *in vitro* tegen ziekte-

gerelateerde Grampositieve bacteriën, zoals meticilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridia*, en vancomycineresistente *S. aureus* en enterokokken. De guanidino lipoglycopeptides overtreffen de antimicrobiële activiteit van zowel vancomycine als telavancine, dalbavancine, en oritavancine tegen veel van de geteste pathogene Grampositieve micro-organismen.

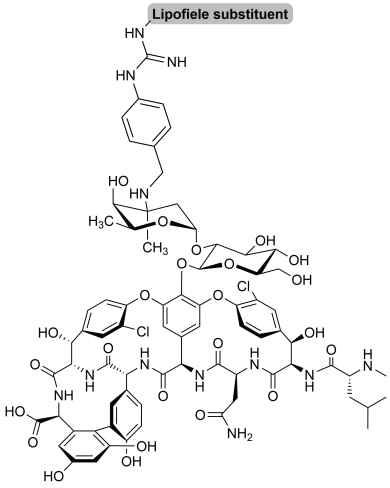

Fig. 3. Guanidino lipoglycopeptides

Voortbouwend op deze bevindingen, beschrijft **Hoofdstuk 3** een meer uitgebreide *in vitro* en *in vivo* beoordeling van de guanidino lipoglycopeptides. Deze nieuwe antibiotica hebben activiteit tegen *S. aureus* biofilms, en hebben bacteriedodende kinetiek gelijkwaardig aan de glycopeptides die in de kliniek gebruikt worden. Daarnaast hebben de guanidino lipoglycopeptides lage initiële toxiciteit en veroorzaken ze minimale resistentieselectie. Het werkingsmechanisme van deze antibiotica is gelijk aan vancomycine, namelijk remming van de biosynthese van de celwand, aangezien ze de D-Ala-D-Ala termini van *lipid II* binden met een nog hogere affiniteit dan vancomycine. In tegenstelling tot vancomycine, binden de guanidino lipoglycopeptides ook aan vancomycineresistente D-Ala-D-Lac *lipid II*. Verder veroorzaken deze antibiotica geen significante membraandepolarisatie, wat een indicatie kan zijn voor lage toxiciteit. De meest potente guanidino lipoglycopeptide, die een alifatische C_7 verbinding bevat, werd geselecteerd voor meer extensieve *in vivo* testen. Het antibioticum werd goed getolereerd door muizen en concentraties van de guanidino lipoglycopeptide in het bloed van de muizen bleven >8 uur lang boven concentraties vereist voor effectieve remming van bacteriële groei. De C_7 guanidino lipoglycopeptide is ook effectief in het bestrijden van infecties in muizen: de bacteriële MRSA lading in een dij-infectie model was significant lager in muizen behandeld met C_7 guanidino lipoglycopeptide in vergelijking met vancomycine, en 100% van de muizen behandeld met C_7 guanidino lipoglycopeptide

overleefden een *S. aureus* sepsis infectie tegen 10% van de vancomycine-behandelde groep (**Fig. 4**). Vervolgstudies zullen de focus leggen op extensieve farmacokinetiek- en toxiciteitstesten.

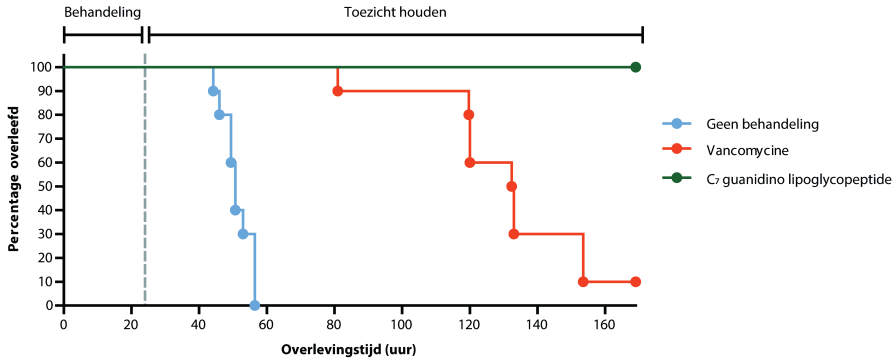

Fig. 4. *In vivo S. aureus* sepsis overlevingsstudie. Overleving van *S. aureus* geïnfecteerde muizen over een periode van 7 dagen na een behandeling van 24 uur met placebo (blauw), vancomycine (oranje), of C_7 guanidino lipoglycopeptide (groen).

Waar de guanidino lipoglycopeptides potent zijn tegen Grampositieve micro-organismen, beschrijft **Hoofdstuk 4** glycopeptide derivaten die Gramnegatieve bacteriën bestrijden. Ondanks dat het doelwit van vancomycine, *lipid II,* onderdeel is van het peptidoglycaan in Gramnegatieve bacteriën, is vancomycine niet effectief in het behandelen van Gramnegatieve bacteriële infecties. Deze micro-organismen bevatten een extra buitenmembraan die niet door vancomycine gepenetreerd kan worden (**Fig. 5**). Dientengevolge was vancomycine gekoppeld aan een buitenmembraan verstoorder genaamd polymyxine E nonapeptide (PMEN), met als gevolg de ontwikkeling van een nieuwe antibioticaklasse genaamd 'vancomyxins' (**Fig. 6**). Exogene toevoeging van PMEN resulteert in verbeterde antimicrobiële activiteit van vancomycine tegen Gramnegatieve bacteriën, maar covalent verbonden, zoals in de vancomyxins, is deze antimicrobiële activiteit nog meer evident. De vancomyxins binden aan een belangrijk bestandsdeel van het buitenmembraan, lipopolysaccharide. Daarnaast behouden de vancomyxins ook activiteit tegen Grampositieve micro-organismen die sensitief zijn voor vancomycine en omzeilen ze vancomycineresistentie in sommige Grampositieve micro-organismen. Tevens zijn de vancomyxins niet hemolytisch, wat lage initiële toxiciteit indiceert, en vertonen ze lage toxiciteit tegen menselijke proximale tubulus epitheelcellen, gezien de 50% cytotoxische concentratie meerdere ordes van grootte hoger is dan de concentratie vereist voor effectieve remming van bacteriële groei.

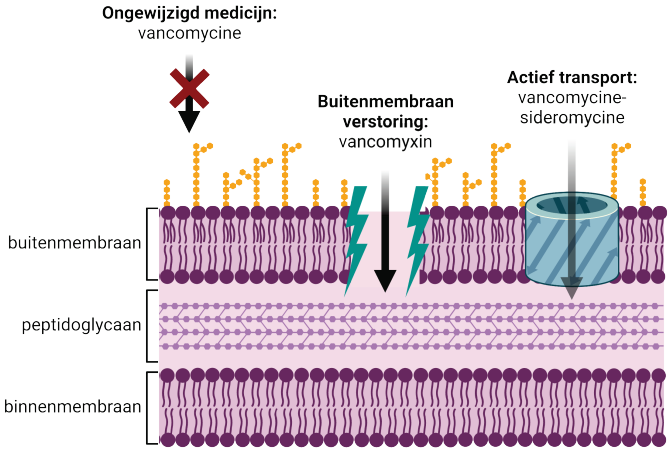

Fig. 5. Strategieën om het spectrum van vancomycine uit te breiden naar antimicrobiële activiteit tegen Gramnegatieve bacteriën.

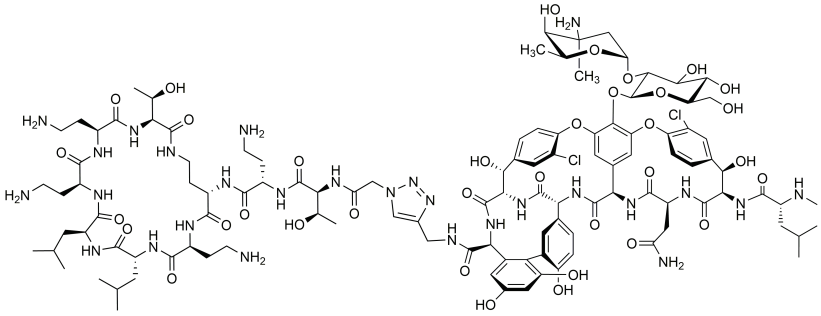

Fig. 6. Representatieve vancomyxin

Naast buitenmembraan verstoring, is actief transport van vancomycine door het buitenmembraan tevens een optie om vancomycine activiteit tegen Gramnegatieve bacteriën te verkrijgen (**Fig. 5**), zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. Hier wordt de synthese van de vancomycine-sideromycines beschreven, een nieuwe antibioticum waarin de ijzer-chelerende siderofoor trihydroxymaat covalent verbonden is aan vancomycine (**Fig. 7**). Sideforen sekwestreren ijzer in de omgeving en worden vervolgens actief getransporteerd door het buitenmembraan van Gramnegatieve bacteriën naar onder andere het periplasma. Op deze locatie bevindt *lipid II*, het doelwit van vancomycine, zich. Ondanks dat de vancomycine-sideromycines remmers van celwand biosynthese blijven, verliezen ze hun antimicrobiële activiteit tegen Grampositieve bacteriën. Daarnaast zijn ze ook niet actief tegen siderofoor-producerende Gramnegatieve bacteriën. Dit valt onder andere te wijden aan de lagere efficiëntie in ijzerchelatie van de vancomycine-sideromycines in vergelijking met natuurlijk geproduceerde sideroforen. Echter, tegen *E. coli* gebrekkig

aan endogene siderofoorproductie of export, tonen de vancomycine-sideromycines verbeterede *in vitro* antibacteriële activiteit in vergelijking met vancomycine. Vervolgstudies moeten duidelijk maken of deze antimicrobiële activiteit het resultaat is van actief transport van de antibiotica door het buitenmembraan of van complete ijzerchelatie leidend tot een ijzertekort in de bacteriële cellen.

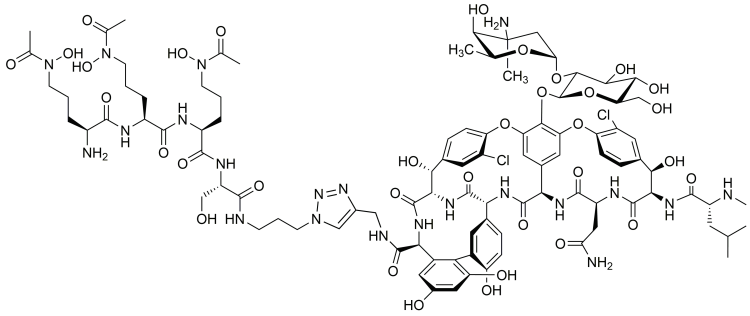

Fig. 7. Representatieve vancomycine-sideromycine