



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

The battle against antimicrobial resistant bacterial infections: next stage development of antimicrobial peptides

Gent, M.E. van

Citation

Gent, M. E. van. (2023, May 30). *The battle against antimicrobial resistant bacterial infections: next stage development of antimicrobial peptides.*

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3619323>

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/1887/3619323>

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

Appendix

Nederlandse samenvatting

List of abbreviations

Training program

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

1. Introductie

Bacteriële infecties zijn steeds moeilijker te behandelen met de huidige antibiotica. Een aantal factoren spelen hierbij een rol. Ten eerste ontwikkelen bacteriën steeds vaker en sneller resistentie tegen antibiotica, ook wel antimicrobiële resistentie (AMR) genoemd. Daarnaast kunnen bacteriën zich verstoppen in een biofilm. Dit is een slijmerige substantie die bacteriën zelf produceren en die de toegang van antibiotica naar de bacteriën verspert. Ook kunnen bacteriën zichzelf van actieve naar niet-actieve staat veranderen. Deze niet-actieve bacteriën worden ook wel persister cellen genoemd en zijn niet te behandelen met antibiotica die de actieve processen van de bacteriën aanpakken. Deze factoren onderschrijven hoe belangrijk het is om nieuwe antimicrobiële moleculen te ontwikkelen.

Antimicrobiële peptiden (AMPs) zijn veelbelovende moleculen om bacteriële infecties te behandelen. Deze peptiden zijn relatief kort (10 tot 60 aminozuren), hebben in de meeste gevallen een positieve lading en zijn onderdeel van het afweersysteem van veel organismen, waaronder de mens. De meeste AMPs hebben een werkingsmechanisme dat anders is dan die van antibiotica: ze werken direct op het celmembraan van de bacteriën en doden de bacteriën snel na binding, perforatie en destabilisatie van het membraan. Door dit niet-specifieke werkingsmechanisme van AMPs ontwikkelen bacteriën veel minder snel resistentie dan het geval is bij het gebruik van antibiotica. Toch hebben AMPs ook nadelen die met name gerelateerd kunnen worden aan hun peptidestructuur. Zo kunnen AMPs relatief toxisch zijn voor menselijke cellen bij een effectieve dosis. Dit resulteert in een relatief lage selectiviteitsindex. Daarnaast hebben AMPs een korte halfwaardetijd in het menselijk lichaam, is hun stabiliteit en biologische beschikbaarheid beperkt en kunnen ze soms moeizaam weefsel binnendringen.

In dit proefschrift worden drie strategieën beschreven om onze kandidaat AMP, het synthetisch antimicrobieel en antibiofilm peptide (SAAP)-148, verder te ontwikkelen voor gebruik als behandeling van AMR bacteriële infecties. Ten eerste is SAAP-148 chemisch aangepast met als doel zijn eigenschappen te verbeteren. Ten tweede is SAAP-148 gebruikt in combinatie met een nieuw antibioticum halicine om te onderzoeken of de combinatie van de moleculen beter werkt ten opzichte van de behandeling met één van beiden. Ten derde is SAAP-148 geformuleerd in nanogels (zeer kleine polymeerdeeltjes met hoog watergehalte die gevormd worden na fysische of chemische verstrengeling) om zo afgifte te reguleren en de selectiviteitsindex van SAAP-148 te vergroten. Deze laatste strategie is ook toegepast op een ander AMP, het slangenpeptide Ab-Cath, vernoemd naar de slang *Anilos bitubercalatus* en de

cathelicidine peptidefamilie waartoe dit peptide behoort. Een uitgebreide introductie op dit proefschrift staat beschreven in **hoofdstuk 1**.

2. Chemische optimalisatie van AMPs

AMPs kunnen op verschillende manieren chemisch aangepast worden om hun activiteiten te verbeteren. Denk hierbij aan veranderingen in lengte en aminozuursamenstelling van het peptide, maar ook aan de chemische koppeling aan andere moleculen. Deze laatste strategie wordt beschreven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift, waarbij SAAP-148 gekoppeld is aan het molecuul polyethyleen glycol (PEG), ook wel PEGylering genoemd. Koppeling van medicijnen aan lange PEG ketens wordt vaker toegepast met als doel het medicijn in te kapselen en hiermee de oplosbaarheid en halfwaardetijd van het medicijn in het menselijk lichaam te verbeteren. Echter kan binding van zulke lange PEG ketens aan de relatief kleine AMPs de antimicrobiële activiteiten van deze peptiden verminderen. Daarom is gekozen om SAAP-148 te koppelen aan relatief korte PEG ketens van verschillende lengten en zijn de antimicrobiële en cytotoxische activiteiten van deze moleculen onderzocht alsmede hun immunologische activiteiten. Om de selectiviteitsindex van het peptide te vergroten kunnen de relatief korte PEG ketens het beste aan de C-terminus van SAAP-148 gekoppeld worden. Deze varianten van SAAP-148 waren minder toxisch voor menselijke rode bloedcellen, terwijl hun antimicrobiële activiteiten ten aanzien van AMR *Staphylococcus aureus* en *Escherichia coli* gelijk bleven. Dus deze varianten van SAAP-148 hadden een verbeterde selectiviteitsindex ten opzichte van SAAP-148. Opmerkelijk was de bevinding dat PEGylering van SAAP-148 ook leidde tot verbeterde immuunmodulerende activiteiten van het peptide en dus verhoogde activatie van het immuunsysteem. Zo was SAAP-148-PEG₂₇ beter in staat om cellen te activeren die betrokken zijn bij de aangeboren immuniteit, zoals neutrofielen, macrofagen en dendritische cellen. Daarnaast werd gevonden dat de lengte van de PEG keten, de koppelingspositie (N-terminus versus C-terminus) en de aminozuursamenstelling van het peptide allemaal bijdroegen aan deze verbeterde immuunmodulerende activiteiten. De ontstekingsbevorderende activiteiten van SAAP-148-PEG₂₇ kunnen van groot belang zijn in situaties waarbij het immuunsysteem niet adequaat optreedt, zoals in het geval van tumoren en chronisch geïnfecteerde wonden.

3. Gebruik van AMPs in combinatie met andere antimicrobiële moleculen

AMPs kunnen gebruikt worden in combinatie met andere antimicrobiële moleculen, zoals antibiotica, om de activiteiten van deze peptiden verder te verbeteren. Als bijkomend voordeel ontwikkelen bacteriën minder makkelijk resistentie tegen zulke combinatietherapieën. In **hoofdstuk 3** van dit proefschrift worden de individuele antimicrobiële en cytotoxische activiteiten beschreven van SAAP-148 en het nieuwe

antibioticum halicine alsmede de combinatie van beide moleculen. SAAP-148 was beter in staat losse (planktonische) AMR *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii* en *E. coli* bacteriën te elimineren dan halicine, met name in aanwezigheid van biologisch relevante stoffen als plasma en urine. Echter, beide moleculen waren even effectief ten aanzien van AMR bacteriën in biofilms. Daarnaast was SAAP-148 toxischer dan halicine, maar nam de toxiciteit van halicine toe bij langere incubatietijd. SAAP-148 en halicine hebben verschillende werkingsmechanismen en daarom werd onderzocht of de combinatie van beide moleculen tot verbeterde antimicrobiële activiteiten zou leiden, ook wel synergie genoemd ($1+1=3$). De combinatie van SAAP-148 en halicine resulteerde inderdaad in synergie tegen planktonische AMR bacteriën behorend tot specifieke *S. aureus* en *E. coli* stammen. Deze verbeterde antimicrobiële activiteiten werden vervolgens bevestigd in drie klinisch relevante modellen. Een bacteriële infectie van intraveneuze- of urinewegkatethers werd nagebootst door het groeien van een *S. aureus* biofilm op een siliconen oppervlak. Daarnaast werd een bacteriële wondinfectie gesimuleerd door het kweken van een 3D huidmodel dat werd geïnfecteerd met *S. aureus* en een bacteriële blaasontsteking door het kweken van een 3D urinewegmodel dat werd geïnfecteerd met *E. coli*.

4. Formuleren van AMPs in een afgiftesysteem

AMPs kunnen verpakt worden in een afgiftesysteem om zo het AMP op de locatie van de bacteriële infectie vrij te geven. Daarnaast kunnen een aantal beperkingen van AMPs worden weggenomen door verpakking in zo'n afgiftesysteem. Ten eerste beschermt een afgiftesysteem het AMP tegen enzymatische afbraak en verhindert het binding aan moleculen als eiwitten. Ten tweede wordt het AMP gestaag vrijgegeven uit dit systeem waardoor er controle is op het behalen van therapeutische concentraties zonder toxiciteit te induceren. Ten derde kan een afgiftesysteem het transport van AMPs door weefsels en penetratie in biofilms of in cellen bevorderen. Als laatste geeft een afgiftesysteem de mogelijkheid om intrinsieke eigenschappen, zoals afgifteprofiel, grootte en oppervlaktelading, aan te passen door formuleringsparameters te veranderen.

Hoofdstuk 4 vat de recente literatuur samen over lipide- en polymeer-afgiftesystemen en coatings die gebruikt zijn om AMPs te verpakken voor de preventie en behandeling van bacteriële infecties. Deze literatuurstudie beschrijft vooral veelbelovende *in vitro* studies (onderzoek in een reageerbuis) van deze afgiftesystemen, omdat *in vivo* studies (onderzoek op levende objecten) beperkt beschikbaar waren. Dit is ook meteen een belangrijke beperking binnen dit onderzoeksveld. Gebaseerd op deze literatuurstudie is een overzicht gemaakt van vereisten en aanbevelingen van AMP afgiftesystemen en coatings voor de behandeling van moeilijk te behandelen infecties.

Zo zijn positief geladen solide nanodeeltjes het meest geschikt voor behandeling van long- en intracellulaire infecties door hun slijmdoordringende en celbinnendringende eigenschappen. Daarentegen zijn negatief geladen hydrofiële nanodeeltjes het beste voor behandeling van chronische wondinfecties die gecompliceerd worden door vorming van biofilms. Daarnaast zijn inzichten verkregen in uitdagingen die overwonnen moeten worden om AMP afgiftesystemen en coatings succesvol te kunnen implementeren in de kliniek. Voorbeelden hiervan zijn het gebrek aan gestandaardiseerd testen in biologisch relevante condities, de beperkte hoeveelheid *in vivo* studies en het tekort aan lang houdbare formuleringen.

Nanogels zijn zeer geschikt als AMP afgiftesysteem voor toediening op de huid door de gecombineerde eigenschappen van nanodeeltjes en water-gebaseerde gels. Hierdoor kunnen grote hoeveelheden wateroplosbare moleculen, zoals AMPs, geformuleerd worden in nanogels. Daarnaast zorgt de hoge concentratie water in het systeem voor een vochtige omgeving die wondheling bevordert.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling van hyaluronzuur-gebaseerde nanogels met daarin geformuleerd het slangenpeptide Ab-Cath voor toepassing op de huid. Deze studie laat zien dat Ab-Cath efficiënt werd ingekapseld in de nanogels en dat deze nanogels excellente fysisch-chemische en functionele eigenschappen hebben. Bovendien werd een succesvolle methode ontwikkeld voor het vriesdrogen van de nanogels in aanwezigheid van cryoprotectant dextran-40 of polyvinyl alcohol (stof die beschermt tegen vriezen, dehydratie en rehydratie). Dit proces is cruciaal voor de ontwikkeling van een lang houdbare formulering en zorgt ervoor dat de nanogels geconcentreerd kunnen worden. De gevriesdroogde Ab-Cath nanogels verbeterden de selectiviteitsindex van Ab-Cath aanzienlijk door antimicrobiële activiteiten tegen AMR *S. aureus*, *A. baumannii* en *E. coli* bacteriën te behouden en toxiciteit ten aanzien van humane primaire huidfibroblasten te verminderen.

Dezelfde strategie werd gebruikt voor formulering van SAAP-148 in hyaluronzuur-gebaseerde nanogels voor behandeling van bacteriële wondinfecties op de huid en is beschreven in **hoofdstuk 6**. Net zoals voor de Ab-Cath nanogels verbeterde de gevriesdroogde SAAP-148 nanogels de selectiviteitsindex van het peptide door behoud van antimicrobiële activiteiten tegen AMR *S. aureus* en *A. baumannii* en werd toxiciteit ten aanzien van humane erythrocyten, humane primaire huidfibroblasten en Ker-CT keratinocyten verminderd. Deze verbeterde selectiviteitsindex van SAAP-148 in de nanogels werd bevestigd in een klinisch relevant 3D huidmodel, geïnfecteerd met AMR *S. aureus* of *A. baumannii*.

5. Conclusie

Dit proefschrift draagt bij aan de ontwikkeling van SAAP-148 en Ab-Cath als therapieën voor de behandeling van AMR bacteriële infecties. De belangrijkste bevindingen van dit proefschrift worden besproken in **hoofdstuk 7**. Hier worden ook mogelijkheden genoemd om de ontwikkeling van AMPs te versnellen, zoals het gebruik van biologisch relevante condities tijdens de preklinische screening van nieuwe antibiotica. Daarnaast worden strategieën aangedragen om de activiteiten van AMPs te verbeteren ten aanzien van AMR bacteriën, biofilms en persister cellen. Denk hierbij aan het combineren van AMPs met antibiotica of andere antimicrobiële moleculen. Ook kunnen AMP afgiftesystemen verbeterd worden door middel van chemische modificatie van het afgiftesysteem. Hierdoor kan een afgiftesysteem zich bijvoorbeeld specifiek richten op bacteriële biofilms en daarmee de selectiviteit van het peptide verder vergroten. Gezamenlijk zouden deze strategieën kunnen leiden tot de introductie van effectieve SAAP-148 en Ab-Cath therapieën in de kliniek.