



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).

List of abbreviations

| | |
|---------------------|--|
| $^1\text{H-NMR}$ | Proton nuclear magnetic resonance |
| <i>A. baumannii</i> | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| Ab-Cath | Anilos bitubercalatus cathelicidin |
| AMP | Antimicrobial peptide |
| AMR | Antimicrobial resistance/antimicrobial resistant |
| APC | Allophycocyanin |
| BEC | Biofilm eradication concentration |
| BHI | Brain heart infusion |
| BPE | Bovine pituitary extract |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CD | Circular dichroism/cluster of differentiation |
| CFU | Colony forming units |
| CPP | Cell penetrating peptide |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenylindool |
| DC | Dendritic cell |
| DDS | Drug delivery system |
| DL | Drug loading |
| DLS | Dynamic light scattering |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium |
| DS | Drug substitution |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. faecium</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| EC | Effective concentration |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| EE | Encapsulation efficiency |
| EGF | Epidermal growth factor |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EPS | Extracellular polymeric substances |
| FBS | Fetal bovine serum |
| FBSi | Inactivated fetal bovine serum |
| FICI | Fractional inhibitory concentration index |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| fMLP | N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HA | Hyaluronic acid |
| HDP | Host defense peptide |
| HLA | Human leukocyte antigen |
| HSE | Human skin equivalent |

| | |
|----------------------|--|
| iDC | Immature dendritic cell |
| IFN- γ | Interferon gamma |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Iscove's modified Dulbecco's medium |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| KSFM | Keratinocyte serum-free medium |
| LC | Lethal concentration |
| LDH | Lactate dehydrogenase |
| LNC | Lipid nanocapsule |
| LPS | Lipopolysaccharides |
| MAP | Model amphiphilic peptide |
| MBC | Minimum bactericidal concentration |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| mDC | Mature dendritic cell |
| MH | Mueller-Hinton |
| MIC | Minimum inhibitory concentration |
| MRSA | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| M ϕ | Macrophage |
| M ϕ -1 | Macrophage type 1 (pro-inflammatory) |
| M ϕ -2 | Macrophage type 2 (anti-inflammatory) |
| NAC | N-acetyl cysteine |
| NLC | Nanostructured lipid carrier |
| NP | Nanoparticle |
| OSA | Octenyl succinic anhydride |
| OSA-HA | Octenyl succinic anhydride-modified hyaluronic acid |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PBMCs | Peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PDI | Polydispersity index |
| PE | Phycoerythrin |
| PEG | Polyethylene glycol |
| Pen/strep | Penicillin/streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyde |
| PK/PD | Pharmacokinetic/pharmacodynamic |
| PLA | Poly(lactic acid) |
| PLGA | Poly(lactic-co-glycolic acid) |
| PPD | Purified protein derivative |
| PVA | Polyvinyl alcohol |
| RiPPs | Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides |

| | |
|------------------|---|
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SAAP-148 | Synthetic antimicrobial and antibiofilm peptide 148 |
| SD | Standard deviation |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| sLNP | Solid lipid nanoparticle |
| TAMRA | 6-Carboxytetramethylrhodamine |
| TEM | Transmission electron microscopy |
| TFE | Trifluoroethanol |
| TSB | Tryptic soy broth |
| UPLC | Ultrahigh performance liquid chromatography |
| WST | Water-soluble tetrazolium |
| ZP | Zeta potential |

Training program

PhD candidate: Miriam E. van Gent
 PhD period: 01-09-2018 until 31-01-2023
 Department: Infectious Diseases
 Graduate school: Leiden University Medical Center
 Promotor: Prof. dr. Leo G. Visser
 Co-promotor: Dr. Peter H. Nibbering

| Courses | Year | ECTS |
|--|-------------|-------------|
| Data stewardship – Handling data in all phases of research | 2018 | 1.0 |
| Flow cytometry core facility user course for beginners | 2018 | 0.4 |
| PhD introductory meeting | 2018 | 0.2 |
| Safe microbiological techniques | 2018 | 1.0 |
| Infection, immunity and tolerance | 2019 | 2.6 |
| Scientific conduct in science | 2019 | 0.2 |
| Academic resilience | 2020 | 0.1 |
| Academic writing | 2021 | 2.1 |
| Basic methods and reasoning in biostatistics | 2021 | 1.5 |
| eBROK: Basic course on Regulations and Organization for clinical investigators | 2021 | 1.5 |
| Speed reading for PhDs | 2021 | 0.6 |
| Job orientation for PhDs | 2022 | 0.4 |

| Conferences | Year | ECTS |
|--|-------------|-------------|
| 5th Institute for Chemical Immunology (ICI) Conference | 2019 | 0.3 |
| Dutch Society for Immunology (NVVI) Congress | 2019 | 0.6 |
| 9th International Meeting on Antimicrobial Peptides (IMAP) | 2019 | 0.9 |
| Copenhagen nanomedicine day - online | 2020 | 0.1 |
| NWO Chemistry As INovating Science (CHAINS) - online | 2020 | 0.6 |
| European Congress of Immunology (ECI) - online | 2021 | 0.9 |
| Gordon Research Conference | 2022 | 1.1 |

Oral presentations

- Overview of the project: Next stage development of the novel synthetic antimicrobial peptide SAAP-148 (NESDAP). *NWO NACTAR program day*, 2022, Utrecht, the Netherlands.
- Results and progress. *Antimicrobial peptide group meetings*, biweekly, Leiden, the Netherlands.
- Results and progress, *NESDAP project meetings*, monthly, online.
- Results and progress. *User committee meetings of the NESDAP project*, twice a year, Leiden or Amsterdam, the Netherlands.
- Results and progress. *Infectious diseases research meetings*, once a year, Leiden, the Netherlands.

Poster presentations

- Lead optimization of SAAP-148 provides promising candidates with reduced cytotoxicity profile. *9th International Meeting on Antimicrobial Peptides (IMAP)*, 2019, Utrecht, the Netherlands.
- PEGylation of SAAP-148 improves its immunomodulatory activities. *European Congress of Immunology (ECI)*, 2021, online.
- SAAP-148-loaded polymeric nanogels for treatment of skin infections. *NWO NACTAR program day*, 2022, Utrecht, the Netherlands.
- Improved selectivity index of SAAP-148- and snake cathelicidin Ab-Cath-loaded polymeric nanogels for treatment of skin infections. *Gordon Research Conference: New Antibacterial Discovery and Development*, 2022, Lucca, Italy.

Teaching activities

| Teaching activities | Year(s) | ECTS |
|---|-----------|------|
| Workgroup tutor course Infectious agents and immunity | 2019 | 1.5 |
| Supervision of Bachelor student (Maureen Severin) | 2020-2021 | 3.0 |
| Supervision of Bachelor student (Tom van Baaren) | 2021-2022 | 3.0 |

Grants

Received an Erasmus+ Staff Mobility Grant (€1,395) for a six-week stay in the Center for Biopharmaceuticals and Biobarriers in Drug Delivery (BioDelivery) at the Department of Pharmacy within the Faculty of Health and Medical Sciences (University of Copenhagen, Denmark) to learn formulation techniques for production of OSA-HA and OL-HA nanogels under supervision of dr. Sylvia N. Kłodzińska and prof. dr. Hanne M. Nielsen.

List of publications

1. **Miriam E. van Gent**, Bep Schonkeren-Ravensbergen, Asma Achkif, Daan Beentjes, Natasja Dolezal, Krista E. van Meijgaarden, Jan Wouter Drijfhout and Peter H. Nibbering. C-terminal PEGylation improves SAAP-148 peptide's immunomodulatory activities. Submitted.
2. **Miriam E. van Gent**, Sylvia N. Kłodzińska, Maureen Severin, Muhanad Ali, Bjorn R. van Doodewaerd, Erik Bos, Roman I. Koning, Jan Wouter Drijfhout, Hanne M. Nielsen and Peter H. Nibbering. Encapsulation into hyaluronic acid-based nanogels improves the selectivity index of the snake cathelicidin Ab-Cath. Submitted.
3. Muhanad Ali, **Miriam E. van Gent**, Amy M. de Waal, Bjorn R. van Doodewaerd, Erik Bos, Roman I. Koning, Robert A. Cordfunke, Jan Wouter Drijfhout and Peter H. Nibbering. Physical and functional characterization of PLGA nanoparticles containing the antimicrobial peptide SAAP-148. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(3):2867
4. **Miriam E. van Gent**, Tom van Baaren, Sylvia N. Kłodzińska, Muhanad Ali, Natasja Dolezal, Bjorn R. van Doodewaerd, Erik Bos, Amy M. de Waal, Roman I. Koning, Jan Wouter Drijfhout, Hanne M. Nielsen and Peter H. Nibbering. Encapsulation of SAAP-148 in octenyl-succinic anhydride-modified hyaluronic acid nanogels for treatment of skin wound infections. *Pharmaceutics*. 2023; 15(2):429
5. **Miriam E. van Gent**, Tanny J. K. van der Reijden, Patrick R. Lennard, Adriëtte W. de Visser, Bep Schonkeren-Ravensbergen, Natasja Dolezal, Robert A. Cordfunke, Jan Wouter Drijfhout and Peter H. Nibbering. Synergism between the synthetic antibacterial and antibiofilm peptide (SAAP)-148 and halicin. *Antibiotics*. 2022; 11(5):673. Editor's Choice.
6. **Miriam E. van Gent**, Muhanad Ali, Peter H. Nibbering and Sylvia N. Kłodzińska. Current advances in lipid and polymeric antimicrobial peptide delivery systems and coatings for the prevention and treatment of bacterial infections. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11):1840.
7. Can Araman, **Miriam E. van Gent**, Nico J. Meeuwenoord, Nicole Heijmans, Mikkil H. S. Marqvorsen, Ward Doelman, Bart W. Faber, Bert A. 't Hart, Sander I. van Kasteren. Amyloid-like behavior of site-specifically citrullinated myelin oligodendrocyte protein (MOG) peptide fragments inside EBV-infected B-cells influences their cytotoxicity and autoimmunogenicity. *Biochemistry*. 2019; 58(6):763-775.

Curriculum Vitae

Miriam E. van Gent was born in Venlo, the Netherlands on the 3rd of December 1993. In 2012 she started the joined degree Molecular Science and Technology of Leiden University and Technical University Delft, and she obtained her bachelor's degree in January 2015. During her bachelors she also spend one year as secretary in the board of the study association "Chemisch Disput Leiden (CDL)". Thereafter, she continued her studies at the Leiden University and successfully finished the master Chemistry in May 2018. She performed her master thesis at the department of Chemical Immunology of the Leiden Institute of Chemistry (LIC) under supervision of dr. Can Araman and prof. dr. Sander I. van Kasteren. Here, she developed interest in the interplay of peptides and immunology. Thereafter, she started her PhD in the department of Infectious Diseases of the Leiden University Medical Center (LUMC) under supervision of dr. Peter H. Nibbering and prof. dr. Leo G. Visser. During her PhD she worked on various strategies to optimize antimicrobial peptides (AMPs) to combat antimicrobial resistant bacterial infections. These strategies included chemical lead optimization of AMPs, combination therapy of AMPs and other antimicrobial agents and the development of nano-sized formulations for encapsulation of AMPs.



Miriam E. van Gent werd geboren op 3 december 1993 in Venlo, Nederland. In 2012 begon zij met de studie "Molecular Science and Technology" aan de Universiteit Leiden en Technische Universiteit (TU) Delft en behaalde haar bachelorsdiploma in januari 2015. Tijdens haar bachelor nam ze voor één jaar plaats in het bestuur van de studievereniging Chemisch Disput Leiden (CDL) als secretaris. Zij vervolgde haar opleiding aan de Universiteit Leiden en ronde succesvol de master Chemie af in mei 2018. Haar afstudeerstage vond plaats op de afdeling Chemische Immunologie van het Leids Instituut voor Chemisch onderzoek (LIC) onder leiding van dr. Can Araman en prof. dr. Sander I. van Kasteren. Hier ontwikkelde ze haar interesse in peptiden en immunologie. Vervolgens startte ze haar PhD op de afdeling infectieziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) onder leiding van dr. Peter H. Nibbering en prof. dr. Leo G. Visser. Gedurende haar PhD heeft ze gewerkt aan diverse strategieën om antimicrobiële peptiden (AMPs) te optimaliseren voor behandeling van antimicrobiële resistente bacteriële infecties. Deze strategieën omvatten chemische optimalisatie van AMPs, combinatie therapie van AMPs en andere antimicrobiële moleculen en de ontwikkeling van afgiftesystemen op nanoschaal voor het verpakken van AMPs.

Dankwoord

“Het gaat niet om de bestemming, maar om de reis ernaartoe.”

Bij deze wil ik iedereen bedanken die heeft bijgedragen aan deze mooie reis met als eindbestemming het proefschrift dat nu in jullie handen ligt.

Allereest Peter, bedankt voor de kans die je mij hebt gegeven als promovendus in jouw antimicrobiële peptiden (AMP) groep en om formuleringstechnieken te leren aan de Universiteit van Kopenhagen, dit is een ervaring die mij altijd bij zal blijven. Ik waardeer jouw eindeloze enthousiasme en laagdrempelige manier van communiceren en daarmee de open discussies die wij hebben kunnen voeren over dit onderzoek.

Leo, ik waardeer jouw positieve en zeer betrokken instelling als promotor tijdens de jaarlijkse evaluatiemomenten. Daarnaast wil ik jou bedanken voor de duidelijke en concrete begeleiding tijdens de afronding van mijn proefschrift.

Annelies, Bep, Tanny, Els en Adriëtte, als “fossielen” van E5 wil ik jullie bedanken voor de gezellige en open sfeer die jullie tijdens mijn promotieonderzoek hebben gebracht. Daarnaast heb ik mogen bouwen op al jullie kostbare kennis in en rond het lab, daar ben ik jullie erg dankbaar voor.

In het eerste jaar van mijn promotieonderzoek was ik veel te vinden op het bacterielab, waar het altijd heel gezellig was op de achterste bench met de stralende aanwezigheid van Michella en Joanne. Door jullie energie en enthousiasme waren zelfs de grootste experimenten een feestje. Bedankt daarvoor.

Ellen, jou heb ik pas echt goed leren kennen tijdens het congres in Lucca (Italië) waar wij data hebben gepresenteerd van onze PhD projecten. Ik waardeer de goede gesprekken die wij hebben gehad over het onderzoek en alles daarbuiten, maar bovenal de gezelligheid.

Ik wil graag de INZI infrastructure groep (Michella, Ellen, Amy, Arthur, Moh, Sven en Patrick) bedanken voor de gezellige (film)avondjes en kerstdiners. Deze momenten waren voor mij erg belangrijk om mijn focus te verleggen en te ontspannen. Daarnaast wil ik ook graag de FECO bedanken voor de gezellige borrels en labuitjes met iedereen van C5, E5 en K5.

Maureen en Tom, bedankt voor de tomeloze inzet tijdens jullie stages bij de AMP groep. Jullie onderzoeksstages hebben een belangrijke bijdrage geleverd aan

onderdelen van dit proefschrift. Daarnaast wil ik ook de andere AMP studenten Oscar, Dennis, Alina, Emily, Yunus, Julia S., Julia W., Ezgi, Asma, Britt, Noor, Sterre en Victor bedanken voor de gezellige gesprekken tijdens hun stageperiode.

Liesbeth en Ingrid, bedankt voor de secretariële ondersteuning. Jan Wouter, Robert en Natasja, bedankt voor de fijne samenwerking en de productie van de antimicrobiële peptiden. Bjorn, bedankt voor alle hulp met de UPLC.

Hans, jij hebt mij erg thuis laten voelen bij Avivia en ik waardeer de fijne gesprekken die wij gevoerd hebben. Daarnaast wil ik Menno, Dennie, Hans, Rianne en Wout bedanken voor hun hulp en gezelligheid bij Avivia. Remko en Leonie van Madam Therapeutics wil ik bedanken voor alle fijne gedachtewisselingen over het onderzoek. Hetzelfde geldt voor Bauke en Gabriëlle van het brandwondencentrum Beverwijk en Bas en Martijn van het Amsterdam UMC.

Belangrijk voor de totstandkoming van mijn proefschrift is de samenwerking geweest met Sylvia en Hanne van de Universiteit van Kopenhagen. Zes weken heb ik op jullie lab formuleringstechnieken mogen leren die de basis zijn geweest voor twee van de publicaties in dit proefschrift. Sylvia, bedankt voor jouw aanstekelijke enthousiasme tijdens de intensieve samenwerking op het lab en de jaren daarna. Ik heb genoten van mijn tijd in Kopenhagen en ben jou nog steeds dankbaar dat ik de laatste paar dagen bij jou thuis heb mogen crashen.

Graag wil ik mijn familie bedanken. Pappa, mamma, Anne en Lucas, bedankt voor jullie steun tijdens mijn promotietraject en het enthousiasme waarmee jullie mijn publicaties hebben gelezen. Dit betekent veel voor mij. Ook wil ik oom Rob en oma bedanken. De momenten dat wij elkaar zien is jullie betrokkenheid en enthousiasme mij veel waard.

Daarnaast wil ik graag Wesley bedanken voor zijn steun en toeverlaat tijdens mijn promotietraject. Ik kan bij jou altijd terecht met mijn uitbundige verhalen en het vieren van mijlpalen, maar ik kan bij jou ook mijn zorgen uiten. Jij bent altijd een luisterend oor en jouw mening betekent veel voor mij.

Als laatste wil ik graag mijn goede vrienden bedanken. Mark, bedankt voor de goede gesprekken over het PhD leven. Ik waardeer jouw nuchtere kijk hierop en hoe je altijd positieve punten weet te benoemen. Claire, bedankt voor onze langdurige vriendschap vanaf de middelbare school. Jij bent er als ik jou nodig heb en weet mij altijd op te beuren. Tyrza, bedankt voor de gezellige gesprekken met een drankje, waardoor ik los kon komen van werk. Annechien, bedankt voor de gezelligheid en

fijne gesprekken, met name tijdens de coronaperiode. Fenneke, bedankt voor onze mooie vriendschap vol goede gesprekken en gezelligheid. Deze verbondenheid met jullie allemaal is voor mij erg belangrijk geweest in mijn leven en zeker tijdens dit promotietraject.