



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Next generation lipopeptide antibiotics

Al Ayed, U.K.

Citation

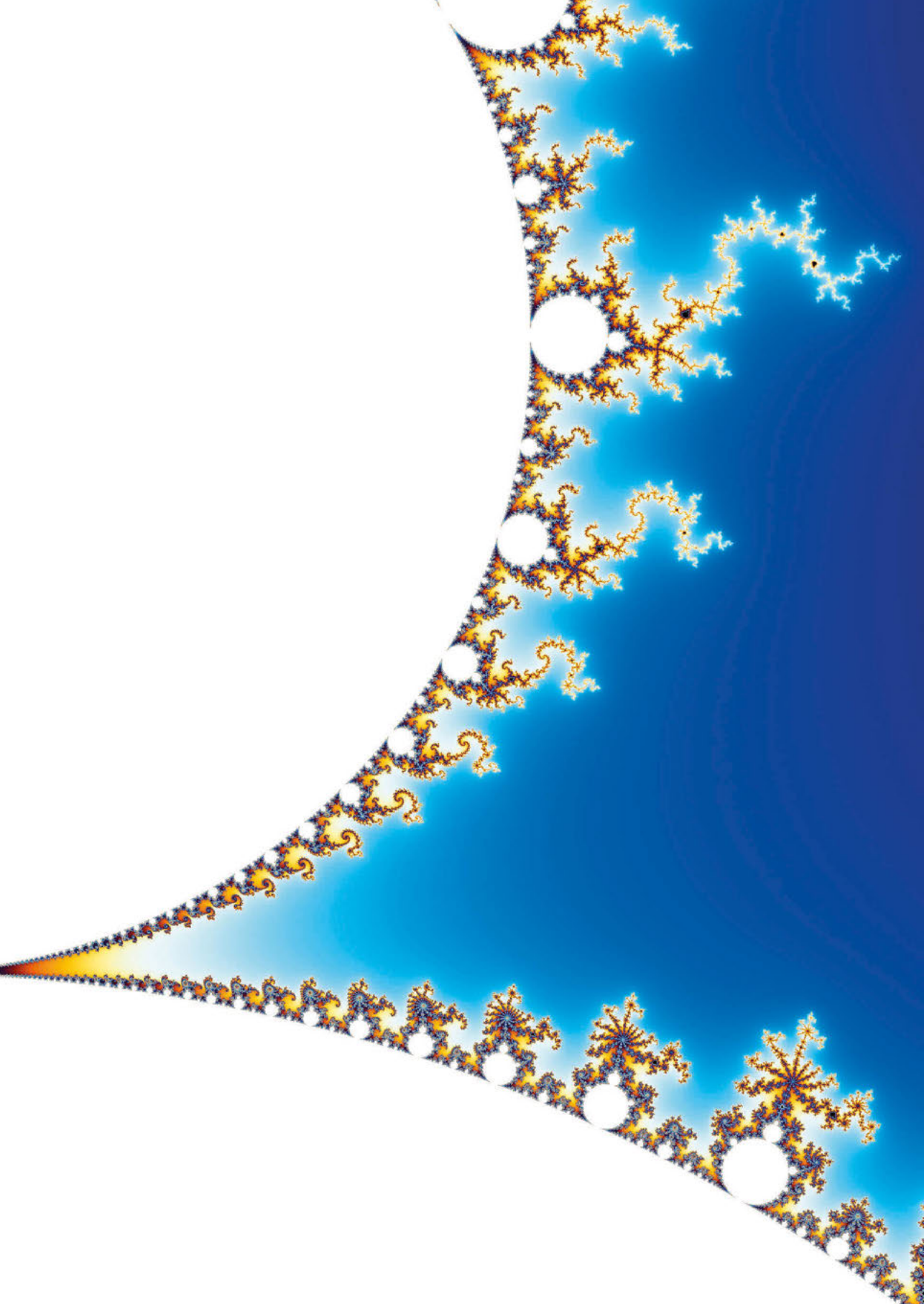
Al Ayed, U. K. (2024, January 23). *Next generation lipopeptide antibiotics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3714346>

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/1887/3714346>

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



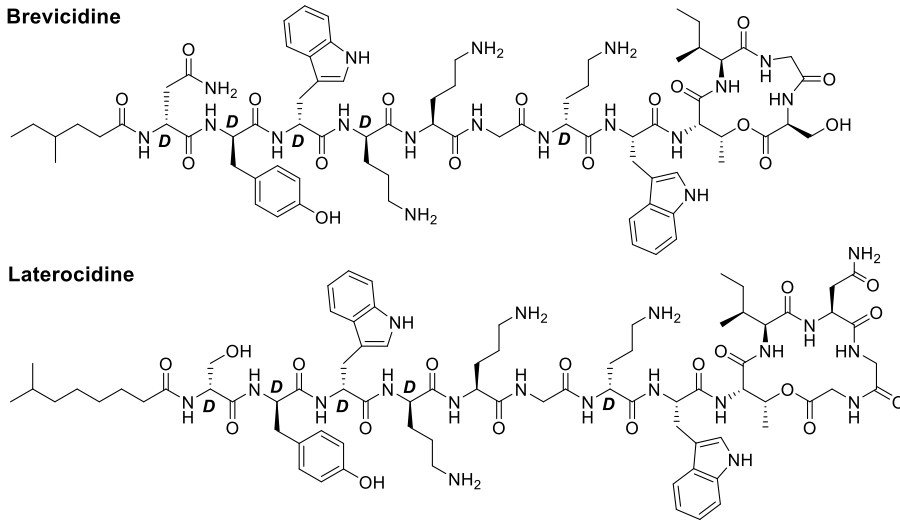
Appendices

Samenvatting

Hoofdstuk 1 beschrijft kort de geschiedenis van het onderzoek naar infectieziekten en geeft voorbeelden van belangrijke ontdekkingen die in de loop van de geschiedenis zijn opgetekend. Voortbouwend op het werk van vele generaties onderzoekers heeft de hedendaagse samenleving een breed inzicht gekregen in infectieziekten en pas onlangs de ziektekiemtheorie overgenomen in plaats van de miasmatheorie. Het hoofdstuk bespreekt ook de ontdekking van het eerste synthetische antibioticum Salvarsan en het eerste natuurlijk verkregen antibioticum penicilline. Voornamelijk penicilline en antibiotica hebben geholpen de medische wereld te transformeren, maar de dreiging van antibioticaresistentie (AMR) hangt boven onze samenleving als het zwaard van Damocles en het aanbod van effectieve antibiotica in de toekomst is niet gegarandeerd. De AMR-dreiging is onlangs door Cook en Wright welsprekend beschreven als een kinetisch probleem.¹ Het evenwicht kan worden verschoven door de verspreiding van resistentie te vertragen of de snelheid van ontdekkingen te verhogen. Terwijl programma's voor antibioticabeheer steeds meer terrein winnen, ontbreekt het ernstig aan investeringen in de ontdekking van nieuwe antibiotica, waarbij de meeste onderzoeken en ontwikkelingsinspanningen momenteel worden geleid door academische instellingen. De lage kosten per behandeling, de onvermijdelijke schijn van resistentie en de noodzaak om superioriteit te tonen ten opzichte van bestaande behandelingen maken de ontwikkeling van antibiotica momenteel te riskant voor de meeste farmaceutische bedrijven.² In een perfect scenario zou een bedrijf gemakkelijk een medicijn kunnen ontwikkelen dat effectief en veilig genoeg is om een infectie te behandelen en zou dat medicijn bewaard worden voor toekomstig gebruik als andere behandelingen niet meer effectief zijn. In een dergelijk scenario wordt de verspreiding van resistentie geminimaliseerd en de snelheid van ontdekking geoptimaliseerd. In de echte wereld genereren bedrijven die een nieuw antibioticum ontwikkelen echter niet genoeg inkomsten om het hoofd boven water te houden, omdat er momenteel al meerdere goedkope generieke alternatieven in de kliniek bestaan. Er is duidelijk een verandering nodig in de manier waarop de ontwikkeling van deze levensreddende medicijnen in het huidige economische systeem wordt gefinancierd. Gelukkig zijn er een aantal dingen aan het veranderen nu proefinitiatieven worden onderzocht met nieuwe vormen van financiële prikkels, zoals in de vorm van beloningen voor markttoegang, die een rendement op de investering voor de ontwikkelaar garanderen, waardoor de inkomsten effectief worden losgekoppeld van het aantal uitgeschreven recepten.³ Recentelijk is men ook steeds meer geïnteresseerd geraakt in alternatieve therapeutische strategieën zoals faagtherapieën,⁴ endolysinen,⁵ vaccins,⁶ antilichaam-antibioticumconjugaten⁷ en zelfs bacteriële proteolyse inducerende chimaera's.⁸ Dergelijke strategieën zouden een enorm therapeutisch potentieel kunnen hebben, maar totdat ze klinisch gevalideerd worden, zullen klassieke benaderingen zoals die beschreven in dit proefschrift centraal blijven in de strijd tegen bacteriële infecties.

Hoofdstuk 2 beschrijft de eerste totaalsynthese van brevicidine en laterocidine (Fig. 1), die wij samen met de groep van Stephen Cochrane (Belfast) hebben voorgesteld als een nieuwe familie van lipopeptide-antibiotica. Deze nieuwe familie hebben we de ornicidine-klasse van antibiotica genoemd. Brevicidine en laterocidine werden oorspronkelijk ontdekt door Li en collega's met behulp van een genominingstrategie. Daarmee werd aangetoond dat ze zich op Gram-negatieve bacteriën richten via interactie met lipopolysaccharide (LPS). De daaropvolgende isolatie van beide lipopeptiden uit de fermentatie van *Brevibacillus laterosporus* leidde tot een beperkte hoeveelheid materiaal. Daarnaast kon in het geval van laterocidine alleen *in vitro* activiteit tegen Gram-negatieve pathogenen worden aangetoond

vanwege fermentatieopbrengsten van minder dan een milligram per liter.⁹ De beschreven aanpak in dit hoofdstuk maakte het mogelijk om voldoende materiaal te synthetiseren voor verdere biologische evaluatie en wordt momenteel gebruikt om meer uitgebreide studies van het werkingsmechanisme (MOA) mogelijk te maken. Dit hoofdstuk beschrijft ook de synthese van een aantal analogen van zowel brevicidine als laterocidine, zoals de enantiomeren van de moederverbindingen, waarvan is aangetoond dat ze minder actief zijn. Interessant is dat er ook werd aangetoond dat de activiteiten van de enantiomeren door LPS worden geantagoneerd. Deze bevinding roept de vraag op of er mogelijk een ander biomoleculair doelwit betrokken is bij de MOA van deze antibiotica. Aangezien tridecaptinen, die structureel vergelijkbaar zijn met de ornicidines, Gram-negatieve Lipid II binden, zou het interessant kunnen zijn om te onderzoeken of de ornicidines een vergelijkbare MOA vertonen.¹⁰ Het kan echter een uitdaging zijn om een voorraad Gram-negatieve Lipid II te vinden, omdat het doorgaans wordt gemaakt via arbeidsintensieve meerstapssynthese op kleine schaal. Een klein onderzoek naar de structuur-activiteitsrelatie (SAR) waarin het belang van Thr9 werd geëvalueerd, wordt ook beschreven in **Hoofdstuk 2**. Daarbij werd Thr9 vervangen door Ser om het effect van de zijketenmethylgroep te bestuderen, wat resulteerde in analogen met vergelijkbare activiteit als de natuurlijke producten. We hebben ook ester-naar-amide-modificaties onderzocht in de C-terminale macrocycli van brevicidine en laterocidine door Thr9 te vervangen door (S)-2,3-diaminopropaanzuur (Dap) of (2S,3R)-2,3-diaminobutaanzuur (MeDap). Interessant is dat, hoewel de amide-analogen van brevicidine een verminderde activiteit vertoonden, in het geval van laterocidine dezelfde substituties goed werden verdragen en zowel de Dap9- als de MeDap9-analogen hun activiteit tegen de meeste van de geteste bacteriestammen behielden. Deze discrepantie zou kunnen voortkomen uit het verschil in macrocyclusgrootte en/of conformatie tussen de brevicidine- en laterocidine-scaffold. Een onderzoek naar de vouwing van deze peptiden, met technieken zoals röntgendiffractie of nucleaire magnetische resonantie (NMR), zou licht kunnen werpen op de waargenomen verschillen. Opmerkelijk is ook de recente bevinding gerapporteerd door de groep van Oscar Kuipers (Groningen). Zij ontdekten dat een natuurlijk analoog van brevicidine genaamd brevicidine B, dat Phe in plaats van Tyr op positie 2 bezit, een breed spectrum activiteit vertoont tegen zowel Gram-negatieve als Gram-positieve bacteriën. Gegeven deze bevindingen zou het interessant zijn om na te gaan of het effect kan worden gerepliceerd op het laterocidine-scaffold.¹¹ Ten slotte moeten er inspanningen worden geleverd om de potentie te vergroten en de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van de ornicidines te verbeteren voordat ze als geschikte kandidaat-geneesmiddelen kunnen worden beschouwd.



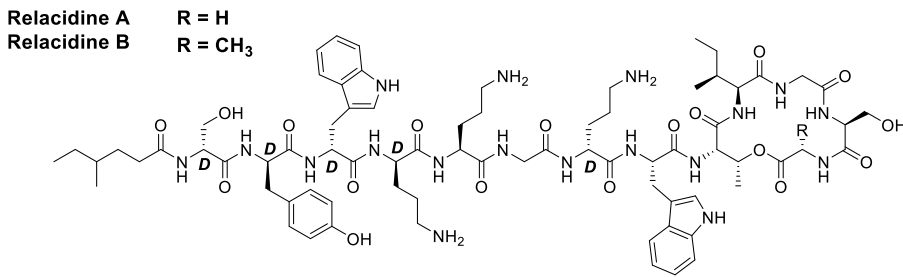
Figuur 1. Structuren van brevicidine and laterocidine. D-aminozuren aangegeven met D.

Hoofdstuk 3 rapporteert over de SAR-studie uitgevoerd op het brevicidine- en laterocidine-scaffold waarin de vertakte lipiden, gevonden in de natuurlijke producten, werden vervangen door eenvoudigere lineaire verzadigde lipiden van variërende lengte. Hoewel de exacte functie van het lipide niet is onderzocht, resulteerde verwijdering van het lipide in een volledig verlies van antibacteriële activiteit, zoals waargenomen bij andere lipopeptiden. Er wordt bijvoorbeeld gedacht dat de polymyxines het buitenmembraan destabiliseren door LPS te binden en uiteindelijk tot de lyse van de cel leiden.¹² Het polymyxine B nonapeptide, het macrocyclische deel van polymyxine B zonder lipide, vertoont echter geen noemenswaardige activiteit tegen de meeste bacteriële stammen.¹³ Hoewel er meer gegevens nodig zijn om dit te bevestigen, zijn de lipidestaarten van brevicidine en laterocidine waarschijnlijk ook nodig om in het bacteriële membraan te worden ingebracht. Bovendien laten de gegevens gepresenteerd in **Hoofdstuk 3** duidelijk zien dat er een enigszins optimale lipidelengte van acht koolstofatomen bestaat die de lipidelengte van de natuurlijke producten dicht benadert. Het vergroten van de lipidelengte produceerde geen actievere verbindingen. Het resulteerde echter wel in meer lyse van rode bloedcellen, een parameter die wijst op niet-selectieve membraanverstoring.

Hoofdstuk 4 schetst de ontdekking van lineaire brevicidine- en laterocidine-analogen die antibacteriële activiteit behouden. Eerder vonden Li *et al.* dat de lineaire analogen van brevicidine en laterocidine minder actief waren dan de natuurlijke producten.¹⁴ In dit hoofdstuk konden we echter aantonen dat de lineaire analogen van brevicidine en laterocidine een activiteit kunnen vertonen die vergelijkbaar is met de oorspronkelijke verbindingen, op voorwaarde dat ze worden bereid als de C-terminale amiden. Omdat de lineaire analogen bereid door Li *et al.* een carbonzuur aan het C-uiteinde bevatten, is bij fysiologische pH hun totale lading lager dan die van hun cyclische tegenhangers. Het is bekend dat de algehele lading van het antibacteriële peptide van cruciaal belang is voor de activiteit als gevolg van bindingsinteracties met geladen fosfolipiden die overal in het bacteriële membraan worden aangetroffen.¹⁵ Door de negatieve lading aan de C-terminus te maskeren door vervanging

van de carbonzuurgroep naar een neutraal geladen amide, waren we in staat om analogen te produceren die qua potentie concurreren met de natuurlijke producten. Bovendien werd een volledige alaninescan van beide lineaire peptide scaffolds uitgevoerd, evenals verkortingsstudies die verder inzicht gaven in residuen die essentieel zijn voor activiteit. Hieruit bleek dat voor beide peptiden de residuen (D-Tyr2, D-Trp3, D-Orn4, Orn5, D-Orn7 en Trp8) essentieel zijn voor bioactiviteit. Deze residuen zijn kationisch of aromatisch (hydrofoob) en zijn waarschijnlijk de sleutel tot doelbinding en het behouden van een actieve conformatie om het bacteriële celmembraan te passeren. Verdere MOA-studies zullen nodig zijn om te bevestigen hoe deze peptiden hun activiteit opwekken, aangezien linearisatie de MOA mogelijk heeft beïnvloed. Op dezelfde manier moet de proteolytische stabiliteit van deze peptiden worden beoordeeld als ze verder in ontwikkeling willen worden gebracht. Er mag echter verwacht worden dat de verbindingen stabiel zijn tegen proteolytische afbraak vanwege het grote aantal D-aminozuren in hun sequenties. Bovendien lieten de stabiliteitsstudies met brevicidine en laterocidine, beschreven in **Hoofdstuk 2**, zien dat de lineaire peptiden werden geïdentificeerd als de afbraakproducten en dat deze niet verder werden afgebroken na 24 uur incubatie in menselijk serum.

Hoofdstuk 5 rapporteert de totaalsynthese van de recent ontdekte lipodepsipeptide-antibiotica relacidine A en B (Fig. 2). Deze werd geleid door bioinformatische analyse van het biosynthetische gencluster (BGC). Net als de brevicidines en laterocidines behoren relacidine A en B tot de klasse van ornidicine-antibiotica en zijn onlangs ontdekt door de Kuipers-groep. Met name de stereochemische configuraties van de aminozuren die relacidine A en B omvatten, waren niet bepaald in het initiële rapport, wat ons ertoe bracht een volledige structurele karakterisatie na te streven.¹⁶ Daarbij waren we in staat deze configuraties eerst te voorspellen door de positie van de epimerisatiedomeinen binnen de relacidine BGC te onderzoeken. Bovendien leidde het onderzoek van de BGC tot de ontdekking van de mogelijke oorzaak van de promiscuïteit van het adenylatiedomein dat het 13e aminozuur in de relacidines incorporeert, wat leidt tot de productie van twee isovormen. Het is waarschijnlijk dat een tryptofaan-naar-tyrosine mutatie in dit domein het mogelijk maakt dat het iets grotere alanineresidu ook wordt ingebouwd naast de glycine die op andere posities in de ornidicinefamilie wordt ingebouwd. Hierna hebben we ook relacidine A en B gesynthetiseerd, evenals verschillende analogen, en daarmee onze bioinformatische voorspelling gevalideerd door HPLC co-elutie-experimenten en vergelijking met de NMR-gegevens gerapporteerd door de Kuipers-groep. De serumstabiliteit van de gesynthetiseerde lipopeptiden werd beoordeeld, wat aantoont dat een amide-analoog die een Thr9-naar-Dap9-substitutie bevat, een verhoogde stabiliteit vertoont terwijl de krachtige activiteit behouden blijft. Het amide-analoog werd daarom gekozen voor evaluatie in een *Galleria mellonella*-larveninfectiemodel vanwege de hoge serumstabiliteit, lage hemolytische activiteit, het gemak van synthese en veelbelovende *in vitro* activiteit.



Figuur 2. Structuren van relacidine A en B. D-aminozuren aangegeven met D.

Er kan geconcludeerd worden dat het in dit proefschrift beschreven onderzoek ons begrip van de ornicidineklasse van lipopeptide-antibiotica heeft verbeterd. Omdat genetische manipulatie van niet-ribosomale peptid synthetases nog in de kinderschoenen staat, heeft de ontwikkeling van synthetische benaderingen om deze natuurlijke producten en hun analogen te produceren de kracht om de toegang tot deze veelbelovende verbindingen te vergroten en verder onderzoek naar hun werkingsmechanismen mogelijk te maken. De gegevens gepresenteerd in dit proefschrift hebben eveneens licht geworpen op enkele van de overtuigende kenmerken van de ornicidines en hun analogen, zoals hun potentie tegen geneesmiddelresistente stammen van pathogene bacteriën, zowel *in vitro* als *in vivo*. Omgekeerd zijn er ook kenmerken geïdentificeerd die een hindernis vormen voor verdere ontwikkeling. Sommige daarvan, zoals de proteolytische stabiliteit van de natuurlijke producten, zijn al in dit proefschrift behandeld, maar andere, zoals de toxiciteit en het farmacokinetische/farmacodynamische profiel, moeten grondig worden geoptimaliseerd. Het is duidelijk dat er aanzienlijke preklinische ontwikkeling nodig zal zijn om deze verbindingen verder in de pijplijn te brengen.

Referentielijst

- (1) Cook, M. A.; Wright, G. D. The Past, Present, and Future of Antibiotics. *Sci Transl Med* **2022**, *14* (657). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>.
- (2) Jacobs, A. Crisis Looms in Antibiotics as Drug Makers Go Bankrupt. *The New York Times*. 2019, pp 1–3. <https://www.nytimes.com/2019/12/25/health/antibiotics-new-resistance.html> (accessed 2023-07-04).
- (3) Dutescu, I. A.; Hillier, S. A. Encouraging the Development of New Antibiotics: Are Financial Incentives the Right Way Forward? A Systematic Review and Case Study. *Infect Drug Resist* **2021**, *Volume 14*, 415–434. <https://doi.org/10.2147/IDR.S287792>.
- (4) Hatfull, G. F.; Dedrick, R. M.; Schooley, R. T. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annu. Rev. Med.* **2022**, *73*, 173. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219>.
- (5) Rahman, M. U.; Wang, W.; Sun, Q.; Shah, J. A.; Li, C.; Sun, Y.; Li, Y.; Zhang, B.; Chen, W.; Wang, S. Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* **2021**, *10* (11), 1277. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111277>.
- (6) Osterloh, A. Vaccination against Bacterial Infections: Challenges, Progress, and New Approaches with a Focus on Intracellular Bacteria. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10* (5), 751. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050751>.
- (7) Lehar, S. M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K. K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W. L.; Hiroshi Morisaki, J.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B.-C.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J. P.; Strandh, M.; Koefoed, K.

- Andersen, P. S.; Flygare, J. A.; Wah Tan, M.; Brown, E. J.; Mariathasan, S. Novel Antibody–Antibiotic Conjugate Eliminates Intracellular *S. Aureus*. *Nature* **2015**, *527* (7578), 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature16057>.
- (8) Morreale, F. E.; Kleine, S.; Leodolter, J.; Junker, S.; Hoi, D. M.; Ovchinnikov, S.; Okun, A.; Kley, J.; Kurzbauer, R.; Junk, L.; Guha, S.; Podlesainski, D.; Kazmaier, U.; Boehmelt, G.; Weinstabl, H.; Rumpel, K.; Schmiedel, V. M.; Hartl, M.; Haselbach, D.; Meinhart, A.; Kaiser, M.; Clausen, T. BacPROTACs Mediate Targeted Protein Degradation in Bacteria. *Cell* **2022**, *185* (13), 2338–2353.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.009>.
- (9) Li, Y. X.; Zhong, Z.; Zhang, W. P.; Qian, P. Y. Discovery of Cationic Nonribosomal Peptides as Gram-Negative Antibiotics through Global Genome Mining. *Nat Commun* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05781-6>.
- (10) Cochrane, S. A.; Findlay, B.; Bakhtiary, A.; Acedo, J. Z.; Rodriguez-Lopez, E. M.; Mercier, P.; Vederas, J. C. Antimicrobial Lipopeptide Tridecaptin A1selectively Binds to Gram-Negative Lipid II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (41), 11561–11566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608623113>.
- (11) Zhao, X.; Kuipers, O. P. BrevicidineB, a New Member of the Brevicidine Family, Displays an Extended Target Specificity . *Frontiers in Microbiology* . 2021. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.693117>.
- (12) Ayoub Moubareck, C. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes (Basel)* **2020**, *10* (8), 181. <https://doi.org/10.3390/membranes10080181>.
- (13) Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Fridkin, M. Structure–Function Studies of Polymyxin B Nonapeptide: Implications to Sensitization of Gram-Negative Bacteria. *J Med Chem* **2000**, *43* (16), 3085–3092. <https://doi.org/10.1021/jm0000057>.
- (14) Li, Y. X.; Zhong, Z.; Zhang, W. P.; Qian, P. Y. Discovery of Cationic Nonribosomal Peptides as Gram-Negative Antibiotics through Global Genome Mining. *Nat Commun* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05781-6>.
- (15) Ouardien, S.; Brul, S.; Zaat, S. A. J. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4* (OCT), 208078. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00111/BIBTEX>.
- (16) Li, Z.; Chakraborty, P.; de Vries, R. H.; Song, C.; Zhao, X.; Roelfes, G.; Scheffers, D. J.; Kuipers, O. P. Characterization of Two Relacidines Belonging to a Novel Class of Circular Lipopeptides That Act against Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Environ Microbiol* **2020**, *22* (12), 5125–5136. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15145>.