

Synthese en toepassing van een lipofiel aminozuurderivaat voor het verbeteren van de membraanaffiniteit van antimicrobiële peptiden

Jack C. Slootweg *, Timo B. van Schaik, H. (Linda) C. Quarles van Ufford, Eefjan Breukink, Rob M.J. Liskamp en Dirk T.S. Rijkers

Medicinal Chemistry & Chemical Biology, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Universiteit Utrecht.

* Thans: Ruhr Universität, Bochum, Duitsland. Correspondentie: jack.slootweg@ruhr-uni-bochum.de.

Kernpunten

- De groep van antimicrobiële peptiden vormt mogelijk een nieuwe klasse antibiotica tegen de opkomende infecties van resistente bacteriën.
- Een lipofiel aminozuur werd gesynthetiseerd dat eenvoudig in ieder peptide ingebouwd kan worden met vastefase-peptidesynthese.
- Het inbouwen van het lipofiele aminozuur in het antimicrobiële peptide anopline zorgde voor een sterk verhoogde antibacteriële activiteit met behoud van selectiviteit.

Inleiding

Er is een groeiende vraag naar ontwikkeling van nieuwe antibiotica of verbetering van bestaande antibiotica, omdat er steeds meer gevallen bekend zijn van infecties door resistente bacteriën. Deze bacteriën zijn resistent tegen een of meer bestaande antibiotica, bijvoorbeeld meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en vancomycineresistente *Enterococcus* (VRE), en er zijn dringend nieuwe verbindingen nodig tegen deze resistente bacteriën [1].

Een relatief nieuwe klasse van antibiotica bestaat uit de veelbelovende groep van antimicrobiële peptiden (AMP's) [2]. AMP's werken voornamelijk op het bacteriële membraan via niet-specifieke membraanpermeabilisatie. Dit werkingsmechanisme induceert nauwelijks resistentie, omdat het voor bacteriën erg moeilijk is hun membraansamenstelling te veranderen, om zo resistent te worden tegen AMP's. Dit verklaart de enorme potentie van AMP's als startpunt voor de ontwikkeling van nieuwe, op peptiden gebaseerde antibiotica, zoals de door de Food and Drug Administration goedgekeurde lipopeptiden caspofungine (1) [3] en daptomycine

ABSTRACT

Synthesis and application of a lipophilic amino acid derivative for improving membrane anchoring of antimicrobial peptides

OBJECTIVE

To increase the potential of membrane-acting peptides as possible novel drug-like compounds by increasing lipophilicity and thereby enhancing membrane affinity.

DESIGN

An Fmoc-protected enantiomerically pure lipophilic amino acid (Fmoc-Lad-OH), which contains a nine carbon atom hydrophobic side chain, was designed. Fmoc-Lad-OH can be introduced into any peptide sequence using standard solid phase peptide synthesis to increase the lipophilicity of a peptide without sacrificing important polar segments of a peptide like for instance the N and C-termini. The antimicrobial decapeptide anoplin was chosen as a model peptide to test the hypothesis.

METHODS

Fmoc-Lad-OH was prepared via organic synthesis and incorporated into the anoplin peptide sequence using solid-phase peptide synthesis followed by reversed-phase HPLC purification. Biological activity was evaluated using microtiter dilution bacterial growth assays, haemolytic assays and membrane vesicle leakage experiments.

RESULTS

All three lipophilic analogues show a dramatic increase in antimicrobial activity: up to 4-8 times better for *Escherichia coli* (Gram-negative) and over one order of magnitude for *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) compared to anoplin. Although the haemolytic activity was increased for the lipophilic analogues, the concentration at which 50% lysis will occur (EC50) was still one order of magnitude higher than the determined MICs. In the membrane vesicle leakage experiments the lipophilic analogues showed a higher lytic activity than anoplin, in agreement with the observed MIC values.

CONCLUSION

Introduction of Lad into anoplin clearly showed a positive effect, which suggests that Fmoc-Lad-OH could be used as a general approach to increase membrane affinity of membrane-acting peptides.

Dit artikel is een vertaling van: Slootweg JC, van Schaik TB, Quarles van Ufford HL, Breukink E, Liskamp RM, Rijkers DT. Improving the biological activity of the antimicrobial peptide anoplin by membrane anchoring through a lipophilic amino acid derivative. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 jul 1;23(13):3749-52.

Slootweg JC, van Schaik TB, Quarles van Ufford HC, Breukink E, Liskamp RMJ, Rijkers DTS. Synthese en toepassing van een lipofiel aminozuurderivaat voor het verbeteren van de membraanaffiniteit van antimicrobiële peptiden. *PW Wetenschappelijk Platform*. 2014;8:a1435.

(2) [4], welke actief zijn tegen respectievelijk schimmel- en bacteriële infecties (figuur 1).

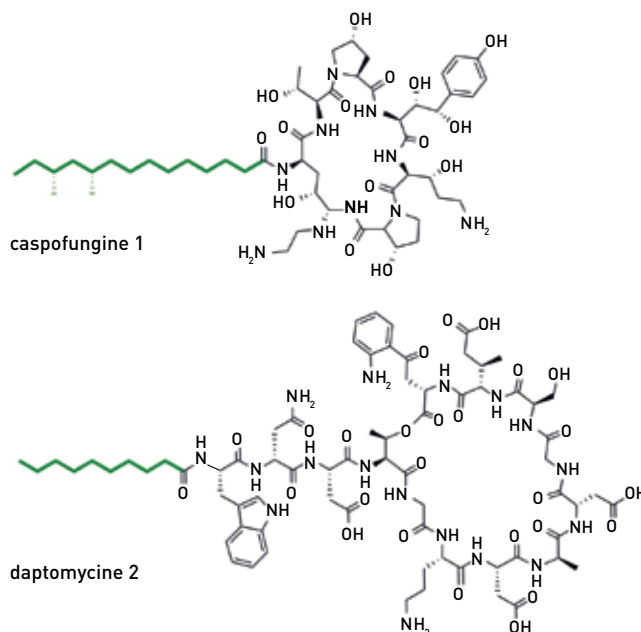
Lipopeptiden behoren tot een subklasse van de antimicrobiële peptiden, welke een lipofiele alkylstaart of, simpel gezegd, vetstaart bevatten. Deze lipofiele staart is belangrijk voor de activiteit omdat hij zorgt voor membraanaffiniteit en werkt als een soort membraananker (figuur 2). De lengte van de staart is erg belangrijk, wat blijkt uit twee studies die laten zien dat analogen van caspofungine en daptomycine met kortere staarten een sterk verminderde activiteit hebben [5, 6]. Geïnspireerd door deze lipopeptiden zijn door N-acylering AMP's gesynthetiseerd met een alkylstaart aan het N-uiteinde, een eenvoudige manier om alkylstaarten te koppelen [7-12]. Het gevolg van N-acylering is echter het verlies van een positief geladen N-uiteinde van het natuurlijke antimicrobiële peptide. Een positief geladen N-uiteinde in combinatie met een peptidesequentie met veel arginines en lysines – aminozuren met allebei een positief geladen zijketen – is vaak erg belangrijk voor de activiteit en vooral voor de selectiviteit [10]. De selectiviteit van AMP's voor bacteriële membranen is een gevolg van de interactie tussen de positief geladen AMP's en de negatief geladen bacteriële membranen, in tegenstelling tot de netto ongeladen (neutrale) humane membranen.

Hier presenteren wij een methode om de membraanaffiniteit van AMP's te verhogen zonder de belangrijke positieve ladingen, zoals de N-uiteinden en geladen zijketens, op te offeren. Hiervoor is een lipofiel aminozuurderivaat (Lad) ontworpen dat een lipofiele staart van negen koolstofatomen bevat als de aminozuur-zijketen. Lad werd gesynthetiseerd als een bouwsteen voor peptidesynthese, zodat het gemakkelijk op elke positie in een peptidesequentie toegevoegd kan worden (figuur 2). Met deze methode zijn drie lipofiele analogen gesynthetiseerd van het natuurlijk antimicrobiële peptide anopline, een decapeptide met de sequentie H-Gly¹-Leu²-Leu³-Lys⁴-Arg⁵-Ile⁶-Lys⁷-Thr⁸-Leu⁹-Leu¹⁰-NH₂, waarin Lad op de posities Leu², Ile⁶ en Leu¹⁰ werd geïntroduceerd. Deze lipofiele anoplinderivaten bleken tien maal zo actief te zijn als natuurlijk anopline, terwijl de selectiviteit voor bacteriële membranen behouden bleef.

Synthese van het lipofiele aminozuurderivaat

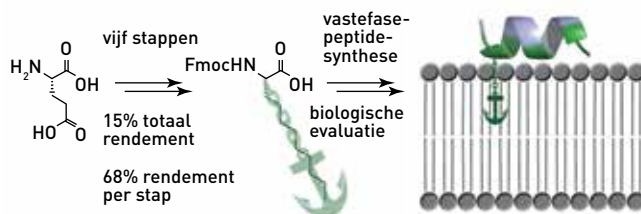
Het lipofiele aminozuurderivaat is te synthetiseren vanuit het natuurlijk aminozuur L-glutaminezuur (3) in slechts in vijf stappen, zoals weergegeven in figuur 3 [13]. De synthese startte met het introduceren van benzyl-beschermgroepen op 3, waardoor diëster 4 werd verkregen in een goede opbrengst van 73% [14]. Vervolgens werd diëster 4 onderworpen aan een gecontroleerde reductie met DIBAL-H, volgens de werkwijze van Martin e.a. [15], om selectief de γ -benzylester om te zetten naar de aldehydefunctionaliteit, resulterend in aldehyde 5. Hexyltrifenyfosfoniumbromide (6) werd omgezet naar ylide 7 en vervolgens werd met aldehyde 5 een Wittig-reactie uitgevoerd met als product alkeen 8. In de volgende stap lieten we alkeen 8 reageren met water-

Figuur 1 Chemische structuren van caspofungine en daptomycine



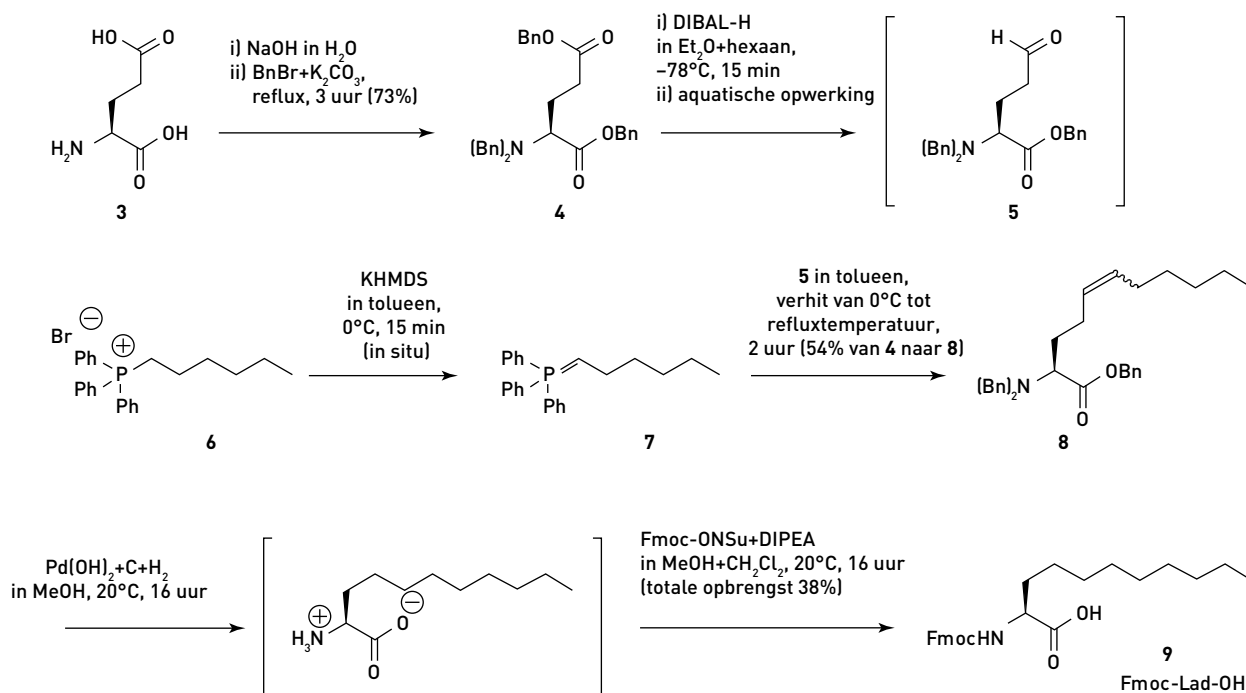
De vetstaart welke belangrijk is voor de activiteit, is groen weergegeven.

Figuur 2 Synthese van een lipofiel aminozuurderivaat en verankering ervan in een biologisch membraan



stofgas om de dubbele binding te reduceren naar een eenvoudige binding en tegelijkertijd de benzyl-beschermgroepen te verwijderen. Er werden meerdere reactiecondities uitgetoetst en een succesvolle reactie werd bereikt door het gebruik van Pearlman's katalysator (10% palladiumhydroxide op actieve koolstof). Na het verwijderen van de benzylgroepen ontstaat een zwitterionisch product (een molecuul dat zowel een negatieve als een positieve lading bevat) met een amfipatisch karakter. Dit komt door de aanwezigheid van een enerzijds sterk geladen (polaire) gedeelte en anderzijds een ongeladen en apolaire vetstaart. Dit zorgde ervoor dat het product moeilijk te isoleren was en er werd besloten om na het verwijderen van de katalysator (door filtratie) het ruwe product meteen door te zetten in de volgen-

Figuur 3 Syntheseroute naar het lipofiele aminozuurderivaat



Tabel 1 Biologische activiteit van anopline en de lipofiele derivaten

Peptide	EC50 (mg/L)*	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		MIC (mg/L)†	TI‡	MIC (mg/L)†	TI‡
Anopline (10)	>500	41	>12,2	20,6	>24,3
Ano-Lad02 (11)	circa 108	5,2-10,3	10,5-20,8	2,5	43,2
Ano-Lad06 (12)	circa 39	10,3-20,6	1,9-3,8	2,5	15,6
Ano-Lad10 (13)	circa 77	10,3-20,6	3,7-7,5	2,5	30,8
C9-anopline (14)	circa 5	2,5	2,0	2,5	2,0

* Hemolytische activiteit, uitgedrukt als de concentratie van een peptide die 50% hemolyse induceert (EC50 in mg/L).

† Antimicrobiële activiteit, uitgedrukt als de minimale inhiberende concentratie (MIC in mg/L).

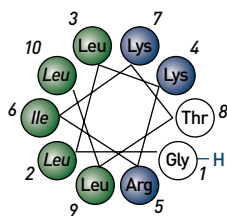
‡ Therapeutische index = EC50/MIC; een hoge waarde betekent een hoge bacteriespecificiteit [17].

de reactie. Als laatste stap werd de α -aminogroep succesvol beschermd met een Fmoc-groep, een beschermgroep welke standaard gebruikt wordt voor aminozuren bij vastefase-peptidesynthese. Fmoc-Lad-OH (9) was nu klaar om in een peptide gezet te worden.

Synthese van lipofiele antimicrobiële peptiden

Het antimicrobiële peptide anopline werd gekozen om er het lipofiele aminozuurderivaat in te bouwen. In een eerder gepubliceerde studie betreffende de structuur-activiteitsrelatie van anopline [16] was gebleken dat het vervangen van de lysine- of arginineresiduen door alanine, of het

modificeren van de N-uiteinden resulteerde in anoplinderivaten met een verhoogde hemolytische activiteit (het doden van humane rode bloedcellen). Dit demonstreert het belang van de positieve lading voor de selectiviteit van het antimicrobiële peptide. Ook werd aangetoond dat de antimicrobiële activiteit drastisch afnam wanneer de hydrofobe aminozuren leucine op posities 2 en 10 en isoleucine op positie 6 werden vervangen door alanine, wat bevestigt dat de hydrofobie van het peptide op deze posities belangrijk is voor de activiteit. Daarom is besloten het lipofiele aminozuur in de anoplinesequentie in te bouwen op posities 2, 6 of 10, met het idee om de activiteit van anopline te verhogen en de

Figuur 4 Helical wheel representation van anopline

Deze weergave laat de positie van de aminozuren zien in een voorgestelde alfa-helixstructuur. De aminozuurresiduen op posities 2, 6 en 10 vormen samen een hydrofoob gedeelte.

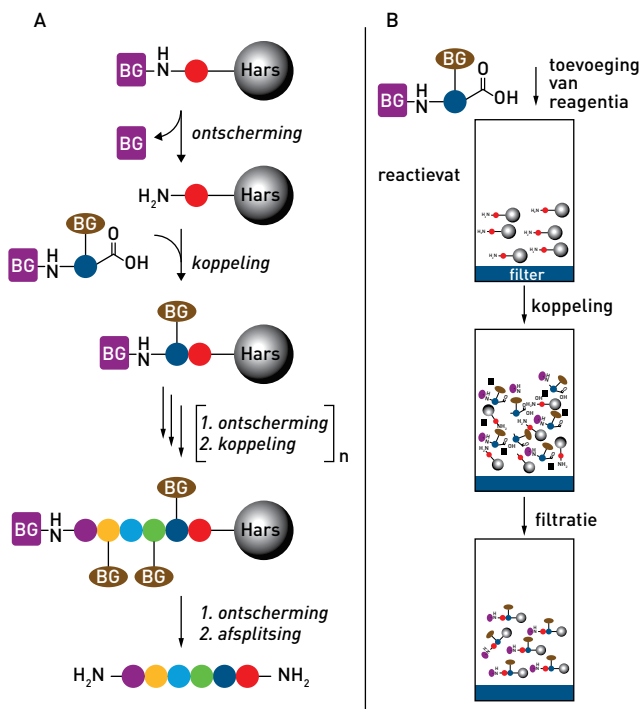
bacteriële selectiviteit te behouden. De *helical wheel representation* in figuur 4 laat zien dat in de veronderstelde actieve helixstructuur van het peptide de posities 2, 6 en 10 bij elkaar zitten en een soort hydrofobe plek maken.

De drie lipofiele antimicrobiële peptiden Ano-Lad02, Ano-Lad06 en Ano-Lad10 werden gesynthetiseerd via vastefase-peptidesynthese, een methode waarin het peptide opgebouwd wordt terwijl het gebonden is aan een vaste drager, vaak een polymerebolletje. Deze methode heeft als groot voordeel dat bijproducten van de reactie gemakkelijk uit het reactiemengsel gefiltreerd kunnen worden, zoals geïllustreerd is in figuur 5. Bovendien kan om dezelfde reden een overmaat aan reagentia worden gebruikt om de reacties optimaal te laten verlopen. Naast de synthese van de drie lipofiele anoplinederivaten werd ook een 'klassiek' lipofiel derivaat (C9-anopline) gesynthetiseerd door N-acylering met decaanzuur. Een overzicht van de structuren van anopline (10) en de vier lipofiele analogen (11-14) is weergegeven in figuur 6.

Biologische activiteit

Peptiden 10-14 werden getest op hun antibacteriële activiteit, uitgedrukt als de minimale inhiberende concentratie (MIC), wat de laagste concentratie is van de remmende stof waarbij zichtbaar de groei van het micro-organisme geremd wordt. Voor deze test werden twee verschillende bacteriestammen gebruikt: een gramnegatieve (*Escherichia coli*) en een grampositieve (*Staphylococcus aureus*). Om te kijken hoe selectief de peptiden zijn voor bacteriële membranen ten opzichte van humane membranen, werden de peptiden ook getest op rode bloedcellen. Wanneer de peptiden actief zijn op de membranen van rode bloedcellen is dat te detecteren door het vrijkomen van hemoglobine. Deze activiteit wordt uitgedrukt als EC50: de concentratie van het peptide waarbij 50% van de maximale activiteit (maximale hemoglobinelekkage) plaatsvindt.

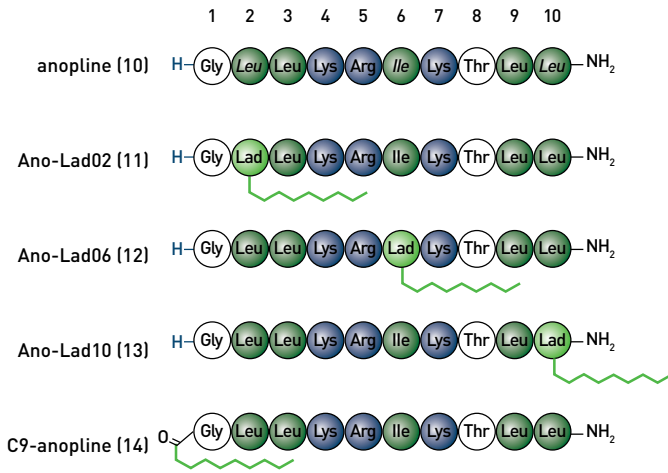
Anopline (10) was actief tegen beide bacteriestammen met MIC-waarden van 41 en 20,6 mg/L en was zeer selectief voor bacteriële membranen aangezien er geen hemolyse was waargenomen tot een concentratie van 500 mg/L, zoals te

Figuur 5 Schematische weergave van vastefase-peptidesynthese

- A)** Een aminozuur (rood) is aan een harsbolletje gekoppeld. In een ontschermingsstap wordt de paarse beschermgroep (BG) verwijderd. Vervolgens wordt er een nieuw aminozuur (blauw) gekoppeld. Deze twee stappen worden herhaald totdat de volledige sequentie opgebouwd is. In de laatste stap wordt het peptide van het harsbolletje afgesplitst.
- B)** In het reactievat wordt het te koppelen aminozuur toegevoegd aan de hars en nadat de koppeling klaar is worden de overmaat aan reagentia en de bijproducten verwijderd door filtratie.

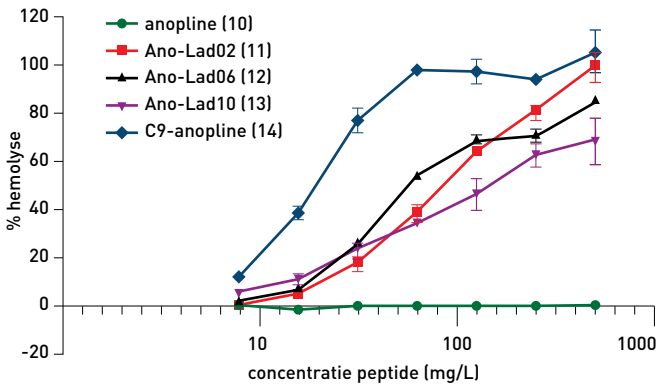
zien in tabel 1 en figuur 7. De lipofiele analoga van anopline (11-13) waren 4 tot 8 maal zo actief tegen *E. coli* en zelfs 10 maal zo actief tegen *S. aureus* als anopline (tabel 1). De hemolytische activiteit van analogen 11-13 (figuur 7) is hoger dan die van anopline (39-108 mg/L versus >500 mg/L), maar de concentratie waarbij 50% lyse optrad (EC50) was nog een orde van grootte hoger dan de respectieve MIC-waarden. Dit demonstreert dat de lipofiele anoplinederivaten 11-13 nog steeds selectief zijn voor bacteriële membranen (tabel 1). De specificiteit van antimicrobiële stoffen voor bacteriële membranen wordt uitgedrukt als de therapeutische index (TI) en wordt bepaald als de verhouding van de hemolytische activiteit (EC50 in mg/L) en de antimicrobiële activiteit (MIC in mg/L) [17]. Dit betekent: hoe hoger de TI, hoe groter de antimicrobiële specificiteit. De TI-waarden zijn weergegeven in tabel 1 en vooral anoplinederivaat 11 bleek veelbelovend wat betreft de antimicrobiële specificiteit. Het N-gedecanoylerde anopline 14 is een

Figuur 6 Schematische weergave van de op anopline gebaseerde gesynthetiseerde peptiden

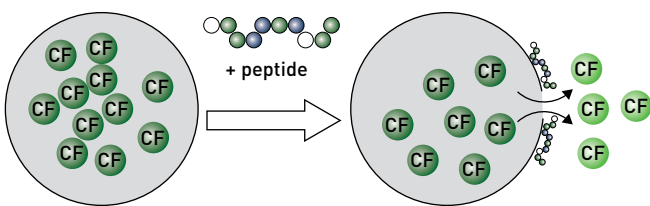


De hydrofobe aminozuren zijn aangegeven in groen en de positief geladen aminozuren in blauw.

Figuur 7 Hemolytische activiteit: anopline vergeleken met de lipofiele analogen



Figuur 8 Fluorescentiedetectie van lyse



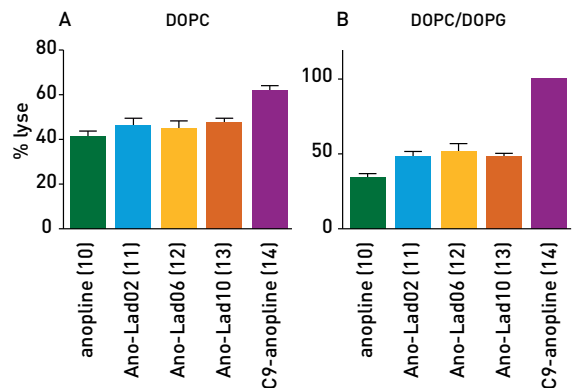
Grote unilamellaire vesicles (GUV's) waarin de fluorescerende stof carboxyfluoresceïne (CF) is opgesloten, worden behandeld met het peptide. Wanneer het peptide een activiteit heeft op het membraan zullen de vesicles lyseren en komt CF vrij, wat resulteert in een verhoging van de fluorescentie.

voorbeeld van een niet-selectief antimicrobieel peptide, omdat de EC50 en de MIC in hetzelfde concentratiebereik liggen: 5 versus 2,5 mg/L, wat resulteert in een erg lage TI van 2,0 (tabel 1 en figuur 7).

In een ander experiment om de biologische activiteit te bepalen werden peptiden 10-14 getest op hun activiteit in een modelmembraansysteem [18]. Hiervoor werden grote unilamellaire vesicles (GUV's, een soort vetbolletjes) gemaakt met daarin de fluorescerende stof carboxyfluoresceïne (CF). De peptiden werden toegevoegd aan deze GUV's en wanneer het peptide interageert met het membraan en de GUV's lyseert, dan zorgt het vrijkomen van CF voor een verhoogde fluorescentie, wat gemeten wordt met fluorescentiespectroscopie (figuur 8). Allereerst werden GUV's geprepareerd met het lipide 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholine (DOPC), wat resulteert in een zwitterionisch membraan dat enigszins lijkt op een (neutraal) humaan membraan. Deze DOPC-GUV's werden behandeld met anopline (10; 50 mg/L) en daarbij werd ongeveer 41% lyse waargenomen (figuur 9A). Anoplinderivaten 11-13 bleken een lyse van respectievelijk 47, 45 en 48% te veroorzaken, terwijl het N-gedecanoyleerde anopline 14 een veel hogere lyse van ongeveer 62% vertoonde (figuur 9A).

Als model voor een bacteriële membraan werden negatief geladen GUV's geprepareerd uit een equimolaire hoeveelheid van DOPC en het anionische lipide 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol (DOPG). De interactie van anopline (10) met DOPC/DOPG-vesicles resulteerde in ongeveer 35% lyse en een duidelijk hogere lyse werd waargenomen bij anoplinderivaten 11-13 (48-52%), zoals geïllustreerd in figuur 9B. Net zoals bij de DOPC-GUV's induceerde het N-gedecanoyleerde anopline 14 ook bij de DOPC/DOPG-vesicles de hoogste lyse (nagenoeg 100%). Deze vesicles

Figuur 9 Lyse van grote unilamellaire vesicles geïnduceerd door anopline en de lipofiele analog



A) Neutrale DOPC-vesicles; B) negatief geladen DOPC/DOPG-vesicles. De lyse is gemeten bij een peptideconcentratie van 50 mg/L, uitgedrukt in het percentage van de totaal mogelijke lyse. DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholine; DOPG: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol.

cle-lyse-experimenten bevestigen dat de lipofiele anopline-peptiden 11-13 een specifieke interactie hebben, met een verhoogde activiteit voor anionische membranen, terwijl N-acylering zorgt voor een verhoogde membraanaffiniteit die echter ten koste gaat van de selectiviteit.

Conclusie

Er is een efficiënte synthese van Fmoc-Lad-OH (9) uit L-glutaminezuur ontworpen en uitgevoerd in vijf stappen (figuur 2) en deze is toegepast als bouwsteen in vastefase-peptidesynthese. Het inbouwen van dit lipofiele amino-zuur in een antimicrobieel peptide verhoogde de affiniteit van dit peptide voor bacteriële celmembranen, werkend als een soort membraananker (figuur 2), terwijl de antimicrobiële specificiteit behouden bleef. Deze resultaten suggereren dat het inbouwen van lipofiele residuen een algemene methode kan zijn om de membraaninteractie van medicinale antimicrobiële peptiden te verbeteren.

Dit onderzoek is mede mogelijk gemaakt door NWO ECHO-Grant 700.57.014.

Literatuur

- The antibiotic alarm. *Nature*. 2013 mrt 14;495(7440):141.
- Zaslhoff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 jan 24;415(6870):389-95.
- Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. *Clin Infect Dis*. 2003 jun 1;36(11):1445-57.
- Kirkpatrick P, Raja A, LaBonte J, Lebbos J. Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 dec;2(12):943-4.
- Counter FT, Allen NE, Fukuda DS, et al. A54145 a new lipopeptide antibiotic complex: microbiological evaluation. *J Antibiot (Tokyo)*. 1990 jun;43(6):616-22.
- Taft CS, Selitrennikoff CP. Cilofungin inhibition of (1-3)-beta-glucan synthase: the lipophilic side chain is essential for inhibition of enzyme activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1990 apr;43(4):433-7.
- Chu-Kung AF, Bozzelli KN, Lockwood NA, Haseman JR, Mayo KH, Tirrell MV. Promotion of peptide antimicrobial activity by fatty acid conjugation. *Bioconjug Chem*. 2004 mei-jun;15(3):530-5.
- Malina A, Shai Y. Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*. 2005 sep 15;390(Pt 3):695-702.
- Majerle A, Kidric J, Jerata R. Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J Antimicrob Chemother*. 2003 mei;51(5):1159-65.
- Zweytick D, Pabst G, Abuja PM, et al. Influence of N-acylation of a peptide derived from human lactoferricin on membrane selectivity. *Biochim Biophys Acta*. 2006 sep;1758(9):1426-35.
- Mak P, Pohl J, Dubin A, et al. The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 jan;21(1):13-9.
- Avrahami D, Shai Y. A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J Biol Chem*. 2004 mrt 26;279(13):12277-85.
- Ziora ZM, Blaskovich MA, Toth I, Cooper MA. Lipoamino acids as major components of absorption promoters in drug delivery. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(14):1562-80.
- Gmeiner P, Kärtner A, Junge D. Practical EPC synthesis of 1,2- and 1,3-amino alcohols. *Tetrahedron Lett*. 1993 jul 2;34(27):4325-6.
- Kokotos G, Padrón JM, Martín T, Gibbons WA, Martín VS. A general approach to the asymmetric synthesis of unsaturated lipidic alpha-amino acids. The first synthesis of alpha-aminoarachidonic acid. *J Org Chem*. 1998 mei 8;63 (11):3741-4.
- Ifrah D, Doisy X, Ryge TS, Hansen PR. Structure-activity relationship study of anoplin. *J Pept Sci*. 2005 feb;11(2):113-21.
- Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J Biol Chem*. 2005 apr 1;280(13):12316-29.
- Breukink E, van Kraaij C, Demel RA, Siezen RJ, Kuipers OP, de Kruijff B. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*. 1997 jun 10;36(23):6968-76.