

University of Groningen

Chemical Modification of Peptide Antibiotics

de Vries, Reinder

DOI:
[10.33612/diss.171585325](https://doi.org/10.33612/diss.171585325)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
de Vries, R. (2021). *Chemical Modification of Peptide Antibiotics*. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.171585325>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Chemische Modificatie van peptide Antibiotica

Antibioticaresistentie vormt een prominente bedreiging voor onze moderne gezondheidszorg. De opkomst van multiresistente bacteriën veroorzaakt naar schatting jaarlijks meer dan 10 miljoen sterfgevallen tegen het jaar 2050, en de verwachte indirecte sociaaleconomische gevolgen zijn enorm. Daarom is de vraag naar nieuwe soorten behandelingen die minder vatbaar zijn voor de ontwikkeling van resistentie urgent. In de loop der jaren hebben bacteriën bewezen zelf een rijke bron van natuurlijke producten te zijn die antimicrobiële activiteit vertonen. Hiervan zijn de niet-ribosomale peptiden (non-ribosomal peptides, of NRP's) en ribosomaal gesynthetiseerde en posttranslationeel gemodificeerde peptiden (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, of RiPP's) interessante kandidaten geworden in de zoektocht naar nieuwe antibiotica vanwege hun hoge activiteit en lagere ontwikkeling van resistentie in vergelijking met conventionele antibiotica. Ondanks hun veelbelovende bioactiviteitsprofiel, wordt de klinische toepassing belemmerd door hun slechte farmacologische eigenschappen, zoals lage stabiliteit en oplosbaarheid in water, en omdat een gedetailleerd begrip van hun werkingsmechanisme vaak ontbreekt. De chemische modificatie van deze peptiden, om semi-synthetische structurele analogen met verbeterde eigenschappen te maken, is een veelbelovende benadering om deze obstakels te overwinnen. De ontwikkeling van methoden voor de precieze bewerking van deze complexe natuurproducten blijft echter een enorme uitdaging. Dehydroalanine (Dha)-residuen, die van nature voorkomen in RiPP's, hebben een unieke reactiviteit als elektrofielen vanwege hun α -, β -onverzadiging, en ze zijn daardoor veelzijdige orthogonale handvatten geworden voor de selectieve modificatie van peptiden en eiwitten.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was gericht op de selectieve chemische modificatie van Dha-residuen in peptide antibiotica via eerste-rij transitiemetaalkatalyse. De primaire focus van het onderzoek was het ontwikkelen van geheel nieuwe methoden voor de chemische bewerking van RiPP's via hun reactieve Dha-residuen. Het doel was ook om het potentieel van deze methoden te onderzoeken voor het verbeteren van de farmacologische eigenschappen van RiPP's en hun toepassing bij de conjugatie van deze peptiden. Een ander doel was om nieuw ontdekte NRP's te karakteriseren om te helpen bij de ontwikkeling van een methode voor de systematische ontdekking en isolatie van nieuwe antimicrobiële peptiden uit micro-organismen. De belangrijkste uitkomsten van deze onderzoeken worden in de volgende paragrafen samengevat.

Metaalvrije Diels-Alder reacties

Hoofdstuk 2 beschrijft hoe Dha als dienofiel kan worden gebruikt bij de modificatie van RiPP's via Diels-Alder reacties. De eerste toetsing van de reactie op een beschermd Dha-monomeer met cyclopentadien toonde aan dat bij kamertemperatuur product kon worden waargenomen onder waterige omstandigheden, terwijl in organisch oplosmiddel geen product werd verkregen. Deze reactieversnelling, waarvan bekend is dat deze optreedt bij Diels-Alder reacties wanneer deze worden uitgevoerd in water in plaats van organische oplosmiddelen, was veelbelovend voor het implementeren van de reactie op peptiden, die milde en waterige omstandigheden vereisen. Toen thiostrepton, een lid van de thiopeptidefamilie van RiPP's, werd onderworpen aan de gevonden reactieomstandigheden, werden matige omzettingen tot enkelvoudig en dubbel gemodificeerd peptide waargenomen. Verdere optimalisatie van de reactiecondities toonde aan dat $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, dat in eerste instantie als katalysator voor de reactie met Dha-monomeer werd gebruikt, schadelijk is voor de algehele stabiliteit van het peptide en dat hogere en schonere omzettingen werden verkregen wanneer de scandiumkatalysator werd weggelaten. Deze metaalvrije reactieomstandigheden werden verder geoptimaliseerd en de omzetting werd significant verhoogd door het mengsel in een magnetron reactor te verhitten. Dit gaf ook hogere conversies dan verwarming op dezelfde temperatuur in een oliebad, hoewel de precieze reden hiervoor onduidelijk blijft. De selectiviteit van de reactie op thiostrepton werd vastgesteld via 2D NMR-spectroscopie op de gezuiverde producten. Er werd aangetoond dat de reactie volledig selectief is voor het staartgebied van thiostrepton, wat zeer wenselijk is aangezien het bekend is dat het modifieren van dit staartgebied over het algemeen een lage impact heeft op de inherente antimicrobiële activiteit van het peptide. Antimicrobiële activiteitstesten van de gezuiverde producten bevestigden dat, hoewel antimicrobiële activiteiten lager waren dan die van niet-gemodificeerd thiostrepton, hoge activiteiten voor alle derivaten inderdaad werden behouden. Het thiopeptide nosiheptide en lanthipeptide nisine werden ook efficiënt gemodificeerd met behulp van de geoptimaliseerde reactieomstandigheden, wat aantoont dat de ontwikkelde methode breed toepasbaar is voor Dha-bevattende RiPP's.

De Diels-Alder reactie van Dha met cyclopentadien resulteert in de chemische installatie van een norborneenfunctionaliteit op de peptiden. Deze bevat

een alkeen dat onder ringspanning staat en daardoor kan deelnemen aan de snelle en bio-orthogonale Inverse Electron Demand Diels-Alder (IEDDA) klikreactie met tetrazines. De gezuiverde Diels-Alder adducten van thiostrepton werden met succes gelabeld met behulp van een verscheidenheid aan tetrazines die waren gefunctionaliseerd met biologisch relevante groepen. Dit toont aan dat de selectieve installatie van een norborneen via de Diels-Alder modificatie van Dha-residuen, gevolgd door de snelle en bio-orthogonale IEDDA reactie met tetrazines, een krachtige methode is voor het labelen en de conjugatie van RiPP's.

Thiostrepton heeft een hoge activiteit tegen Gram-positieve bacteriën vanwege zijn vermogen om ribosomale eiwitsynthese te blokkeren door te binden aan het ribosoom. Ondanks dat dit ribosomale doelwit ook aanwezig is in Gram-negatieve bacteriën, vertoont thiostrepton geen activiteit tegen deze bacteriën omdat het het buitenmembraan van dergelijke stammen niet kan passeren. Sideroforen, die door bacteriën worden gebruikt voor de opname van ijzer, zijn nuttige groepen om aan antibiotica te conjugeren, omdat ze actief via receptoren in de cellen worden getransporteerd. Daarom is de synthese van antibiotica-siderofoor hybriden een populaire "Trojaans paard"-strategie geworden voor het selectief bestrijden van bacteriën.

In hoofdstuk 3 werd de tweestapsconjugatiemethode beschreven in hoofdstuk 2 toegepast in de semi-synthese van thiostrepton-siderofoor hybriden voor het bestrijden van Gram-negatieve bacteriën. Twee niet-natuurlijke siderofoor-analogen met reactieve tetrazine-groepen werden gesynthetiseerd. Om de bestaande synthese compatibel te maken met de tetrazine-eenheden, werd een nieuwe *para*-methoxybenzyl beschermgroep strategie ontwikkeld voor de ijzerbindende catecholaatgroepen, die complementair is aan de benzyl beschermgroep chemie die vaak in de literatuur wordt gebruikt. Uiteindelijk werd een convergente syntheseroute ontwikkeld die leidde tot de isolatie van de twee tetrazine-siderofoor constructen. De norborneenfunctionaliteit werd chemisch geïnstalleerd op thiostrepton via de methode beschreven in hoofdstuk 2 en de thiostrepton-siderofoor hybriden werden succesvol gevormd in de IEDDA klikreactie met de tetrazine-sideroforen. De hybriden werden geïsoleerd en getest tegen Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën, maar ze vertoonden geen activiteit tegen de geteste stammen. De afwezigheid van activiteit, zelfs tegen Gram-positieve

bacteriën die normaal zeer gevoelig zijn voor thiostrepton, suggereert dat de covalente aanhechting van de siderofooren schadelijk is voor de inherente activiteit van thiostrepton. Hoewel de gewenste activiteiten niet werden waargenomen, toont deze studie wel duidelijk het potentieel aan van deze methode voor de synthese van antibiotica hybriden. Daarom moet verder onderzoek naar de synthese van thiostrepton-siderofoor hybriden via deze methode worden voortgezet, maar met behulp van een linker die ervoor zorgt dat het antibioticum kan worden 'losgeknipt' van het siderofoor zodra het de cel is binnengedrongen.

Cu(II)-gekatalyseerde β -boryleringen en β -silyleringen

De focus van de modificatie van Dha in RiPP's ligt voornamelijk op de vorming van C-C-bindingen. De vorming van C-N en C-S-bindingen is ook gerapporteerd, maar efficiënte methoden voor de directe chemische installatie van niet-natuurlijke bindingen op Dha in RiPP's ontbreken. De introductie van dergelijke niet-biologische functionaliteiten, zoals boorzuren en silylgroepen, zijn effectieve manieren gebleken om de activiteit, stabiliteit en oplosbaarheid van farmaceutische verbindingen te verbeteren. Daarom zijn dergelijke groepen interessant voor de modificatie van RiPP's om hun farmacologische eigenschappen verbeteren. Omdat boor en silicium zelden in biomoleculen worden aangetroffen, maakt de introductie ervan in natuurlijke producten zoals RiPP's ook de verkenning mogelijk van nieuwe soorten chemische reactiviteit die kunnen worden gebruikt voor de conjugatie van deze peptiden.

In hoofdstuk 4 wordt de β -borylering van Dha in RiPPs via Cu(II)-katalyse beschreven. Het was bekend dat de β -borylering van α,β -onverzadigde carbonylsubstraten efficiënt verloopt met $B_2(OH)_4$ als bron van boor en $CuSO_4$ als katalysator onder milde en waterige omstandigheden, wat een uitstekend uitgangspunt vormt voor de modificatie van Dha in RiPP's. Eerst werd de β -borylering van een beschermd Dha-monomeer onderzocht met behulp van eerder gerapporteerde omstandigheden. Volledige omzetting werd bereikt binnen 1 uur reactietijd bij kamertemperatuur, wat aantoont dat Dha inderdaad een goed substraat is voor deze reactie. De reactie werd vervolgens getest op thiostrepton, en na optimalisatie van de reactieomstandigheden werd een complete omzetting van het uitgangspeptide bereikt binnen 1 uur bij kamertemperatuur. Er werd volledige conversie naar een enkel hoofdproduct waargenomen, dat het dubbel geboryleerde

peptide bleek te zijn. Dit impliceerde dat de reactie zowel snel als zeer selectief is, vooral vanuit het perspectief van het modificeren van een dergelijk complex natuurproduct. NMR studies met het gezuiverde product toonden een dubbele β -borylering van de twee terminale Dha-residuen in het staartgebied van thiostrepton, wat de hoge chemo- en regioselectiviteit van de methode bevestigt. De aanpak toonde een brede toepasbaarheid, aangezien het thiopeptide nosiheptide, het lanthipeptide nisine Z en het eiwit Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) met een dehydroalanine residu allemaal efficiënt konden worden gemodificeerd.

Het effect van de boorzuurmodificatie op de oplosbaarheid van thiostrepton en nosiheptide in water werd ook beoordeeld. De slechte oplosbaarheid van thiopeptiden in water is een van hun grootste beperkingen die hun klinische toepassing belemmeren. Oplosbaarheidstests van de gezuiverde geboryleerde analogen toonden aan dat voor thiostrepton de oplosbaarheid in water inderdaad tot 84 keer was verhoogd in vergelijking met het niet-gemodificeerde peptide. Antimicrobiële activiteitstesten van beide analogen toonden aan dat hoewel de activiteit was verminderd in vergelijking met de uitgangspeptiden, hoge effectiviteit tegen hun doelwitstammen behouden bleef. Gezamenlijk tonen deze resultaten aan dat met deze benadering de slechte oplosbaarheid van RiPP's in water kan worden verbeterd, terwijl antimicrobiële activiteiten behouden blijven die goed vergelijkbaar zijn met conventionele antibiotica.

Boorzuren zijn ook nuttige tussenproducten voor een verscheidenheid aan chemische transformaties, wat een zeer nuttig kenmerk is voor de verdere modificatie van RiPP's via chemische mutagenese. In hoofdstuk 4 werd ook aangetoond dat de boorzuren die op thiostrepton zijn geïnstalleerd efficiënt konden worden geoxideerd tot hydroxylfunctionaliteiten met behulp van NaBO_3 als een mild oxidatiemiddel. Deze borylatie-oxidatie van dehydroalanines biedt een snelle en eenvoudige procedure voor de chemische installatie van serines, wat hoogst zeldzame residuen zijn in RiPP's. Bovendien werd de reversibele vorming van boronaatesters van boorzuren met diolen en triolen aangetoond op het geboryleerde thiostrepton-derivaat. De pH-gecontroleerde vorming van boronaat-triolcomplexen is een efficiënte strategie gebleken voor het omkeerbaar labelen van RiPP's. Deze resultaten onderstrepen de veelzijdigheid van boorzuurmodificatie als platform voor de structurele diversificatie van deze peptiden, hoewel het volledige potentieel ervan nog niet is gerealiseerd.

Boorzuren zijn tussenproducten voor een groot aantal chemische transformaties en koppelingsreacties, en vervolgonderzoek moet zich blijven concentreren op het onderzoeken van dergelijke mogelijkheden voor de chemische mutagenese van RiPP's.

Hoofdstuk 5 beschrijft hoe de Cu(II)-katalyse gepresenteerd in hoofdstuk 4 ook kan worden gebruikt voor de selectieve β -silylering van dehydroalanineresiduen in peptiden en eiwitten. Het was bekend dat wanneer PinBSiMe₂Ph, ook bekend als Suginome's reagens, wordt gebruikt in plaats van een bis-boorreagens, er selectief een β -silylering kan worden uitgevoerd in plaats van een β -borylering. De reactie werd aanvankelijk bestudeerd op thiostrepton met behulp van Suginome's reagens in plaats van B₂(OH)₄, terwijl de rest van de reactieomstandigheden identiek werden gehouden aan die van de β -borylering. Er werd gevonden dat de silylering snel verloopt, waarbij volledige omzetting van thiostrepton naar het dubbel gesilyleerde derivaat binnen 1 uur bij kamertemperatuur kon worden aangetoond. NMR studies bevestigden dat de β -silylering selectief is voor de Dha-residuen in het staartgebied van thiostrepton. Bovendien is de reactie breed toepasbaar, aangezien nosiheptide, nisine Z en SUMO ook efficiënt werden gesilyleerd. De studie toont aan dat deze benadering een krachtige methode is voor de silylering van Dha in RiPP's, maar de effecten van silylering op de eigenschappen en functie van deze natuurlijke producten zijn nog onduidelijk. Bij reversed-phase chromatografie wordt een afname in polariteit waargenomen voor de gesilyleerde producten in vergelijking met de niet-gemodificeerde peptiden, in tegenstelling tot de drastische toename in polariteit die wordt gevonden voor de geboryleerde derivaten. Dit impliceert een lagere oplosbaarheid in water voor de gesilyleerde varianten, hoewel dit nog moet worden gekwantificeerd. Aan de andere kant kan de verhoogde lipofiliciteit gunstig zijn voor het vermogen van peptiden om celmembranen te passeren. Daarom moet verder onderzoek worden gedaan om te onderzoeken hoe deze effecten worden weerspiegeld in de antimicrobiële activiteit van gesilyleerde RiPP's.

NMR karakterisatie van nieuw ontdekte NRP's

In hoofdstuk 6 wordt de karakterisatie van nieuwe antimicrobiële NRP's door middel van NMR spectroscopie beschreven. Uit de bodembacterie *Brevibacillus laterosporus* MG64 werden 10 nieuwe peptiden uit 3 verschillende klassen van NRP's geïsoleerd.

Aanvankelijk werden verschillende nieuwe mutanten van de bogorolfamilie van NRP's geïsoleerd. Dit omvatte een aantal analogen die een succinyleringsmodificatie bevatten en daarom werden herkend als een nieuwe klasse van NRP's die de naam succilins kreeg. Bovendien werden 2 relacidines, een nieuwe klasse van cyclische lipopeptiden, geïsoleerd en gekarakteriseerd. De gezuiverde peptiden werden geanalyseerd met ^1H NMR en verschillende 2D NMR technieken. De aminozuursequentie werd geïdentificeerd met behulp van NOESY NMR, terwijl aminozuurzijketens en belangrijke structurele kenmerken zoals mutaties en modificaties werden gekarakteriseerd via NOESY en TOCSY NMR. Uiteindelijk werden de structuren die waren voorspeld met behulp van massaspectrometrie bevestigd voor alle verbindingen. De volledige karakterisering van deze peptiden was een belangrijke bijdrage aan een grotere studie die was gericht op het onderzoeken van het potentieel van deze peptiden als antibiotica en hun producerende organisme als een biocontrolestam. Gedetailleerde kennis van hun chemische structuur is cruciaal geweest voor het verschaffen van een uitgebreid begrip van hun biosynthese en werkingsmechanisme. Gezamenlijk vormt dit onderzoek een solide basis voor de klinische toepassing van deze peptide antibiotica en de ontwikkeling van methodologieën voor de systematische ontdekking van nieuwe antimicrobiële peptiden in de toekomst.

Conclusie

De methodologieën die in dit proefschrift worden gepresenteerd tonen aan dat de eerste-rij transitiemetaal gekatalyseerde modificatie van Dha-residuen een krachtige benadering is voor de chemische bewerking van RiPP's. De methoden zijn waardevolle toevoegingen aan het veld, aangezien de chemische installatie van niet-natuurlijke bindingen en volledig abiologische functionaliteiten de chemische ruimte die kan worden verkend via Dha-modificatie aanzienlijk heeft uitgebreid. De ontwikkelde modificaties maakten de semi-synthese mogelijk van analogen met verbeterde farmacologische eigenschappen. Ook konden conjugaten worden gemaakt die nuttig zijn voor het labelen van RiPP's, via soorten chemische binding die volledig nieuw zijn voor deze natuurlijke producten. Er werden biologisch actieve derivaten verkregen, die sterk verschillen in polariteit en oplosbaarheid in water in vergelijking met de niet-gemodificeerde peptiden. Deze complementariteit biedt een veelbelovend startpunt voor het verfijnen van deze farmacologische eigenschappen, wat cruciaal is

voor de effectiviteit van deze antibioticakandidaten en hun klinische toepassing in de toekomst.

Het hier gepresenteerde onderzoek biedt nieuwe mogelijkheden om verschillende uitdagingen in de chemische modificatie RiPP's via hun dehydroalanineresiduen te overwinnen. De studies tonen aan dat het gebruik van eerste-rij overgangsmetaalkatalysatoren een milde en effectieve benadering is, en de weg vrijmaakt voor nuttige toepassingen in de semi-synthese van klinisch relevante antimicrobiële peptiden.

