

University of Groningen

Fighting infections with light

Alves Fernandes Bispo, Mafalda

DOI:
[10.33612/diss.194098277](https://doi.org/10.33612/diss.194098277)

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):

Alves Fernandes Bispo, M. (2021). *Fighting infections with light: targeted antimicrobial photodynamic therapy*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.194098277>

Copyright

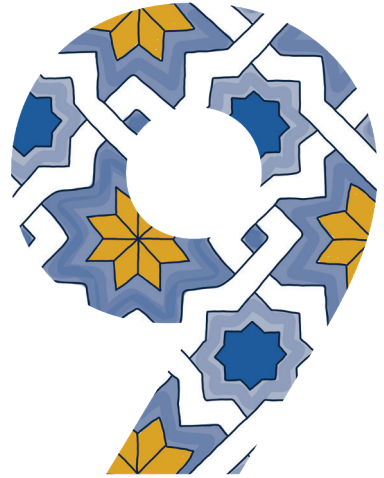
Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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.



**Nederlandse samenvatting,
discussie en conclusie
Sumário e discussão
List of publications
Biography
Acknowledgements -
Agradecimentos**

Samenvatting en discussie

Photodynamische therapie (PDT) is gebaseerd op het gebruik van een lichtgevoelig molecuul dat reactieve zuurstofsoorten (ROS) produceert na activering met licht van een specifieke golflengte.¹ PDT wordt momenteel toegepast in de behandeling van verschillende oncologische en niet-oncologische ziektes. De behandeling van oncologische ziektes met behulp van PDT is mogelijk, doordat een aantal foto-actieveerbare moleculen is goedgekeurd door de Amerikaanse Food and Drug Administration voor de bestrijding van onder meer slokdarm-, blaas-, baarmoederhals-, long-, hoofd-hals-, prostaat- en gastro-intestinale tumoren. Verbindingen zoals protoporphyrine IX (PpIX), Photofrin, Foscan en Lutex vertegenwoordigen eerste- en tweede-generatie foto-actieveerbare moleculen die voor PDT gebruikt kunnen worden. Niet-oncologische ziektes, zoals de oogheelkundige aandoeningen leeftijdsgebonden maculaire degeneratie en myope chorioretinale neovascularisatie worden ook succesvol behandeld met PDT als eerstelijns therapie, waarbij het voor klinische toepassing goedgekeurde foto-actieveerbare geneesmiddel Visudyne wordt gebruikt.² Bij tandheelkundige aandoeningen wordt een voorloper van PpIX, het 5-aminolaevulinezuur (5-ALA), gebruikt om onderscheid te maken tussen kwaadaardige en niet-kwaadaardige laesies. Hierbij wordt 5-ALA topisch aangebracht op een mogelijk kwaadaardige laesie. In het geval van een kwaadaardige laesie zal de accumulatie van intracellulaire porfyrienes de weefselfluorescentie verhogen na bestraling, waardoor een dergelijke laesie goed zichtbaar wordt.³ Behalve tumoren doen zich ook potentieel gevaarlijke bacteriële-, virale- en schimmelinfecties voor in de mond. Omdat conventionele behandelingen niet kunnen voorkomen dat sommige van deze infecties opnieuw de kop op steken wordt antimicrobiële PDT (aPDT) klinisch toegepast bij de behandeling van orale candidiasis, herpes labialis en chronische parodontitis.⁴ Tenslotte wordt aPDT ook klinisch toegepast bij de behandeling van acne vulgaris, Leishmaniasis en andere microbiële huidinfecties.⁵ Dergelijke toepassingen zijn zeer effectief en vormden daarom de basis voor het onderhavige promotieonderzoek, dat gericht was op een mogelijk veel bredere inzet van aPDT in de strijd tegen infectieziektes. Een bijkomstig voordeel van deze aanpak is dat veel van de therapeutische moleculen die voor aPDT gebruikt worden fluorescent zijn, wat de mogelijkheid biedt om ze niet alleen te gebruiken voor therapeutische interventies, maar ook voor de diagnose van infectieziektes. Derhalve was de detectie van infecties met behulp van fluorescente tracers een tweede belangrijke doelstelling voor het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven.

Infectieziektes vormen nog steeds één van de grootste bedreigingen voor de gezondheid van de mens.⁶ Met name bacteriële infecties waren tot voor kort betrekkelijk eenvoudig te behandelen door de beschikbaarheid van krachtige antibiotica. De opkomst van bacteriële resistentie tegen antibiotica stelt de gezondheidszorg echter voor steeds grotere problemen. Met name het wereldwijd overmatige en onnodige, of te langdurige gebruik van antibiotica ondermijnt de werkzaamheid van deze geneesmiddelen.^{7,8} Spontane mutaties in bacteriële genomen en horizontale overdracht van resistentiegenen tussen verschillende bacteriesoorten zijn de belangrijkste oorzaken van de

opkomst van meervoudige antimicrobiële resistenties in ziekteverwekkende micro-organismen.^{7,8} Bovendien zijn de krachtigste antibiotica vaak werkzaam tegen een breed spectrum aan micro-organismen en hierdoor kan de toediening ervan ook andere, mogelijk nuttige, bacteriën in het lichaam van de mens negatief beïnvloeden.⁹ Daarnaast maken de kostbare en relatief trage traditionele diagnostische technieken, die worden ingezet om infecties op te sporen, het noodzakelijk om een empirische behandeling met breed spectrum antibiotica toe te passen. Helaas kan dit vervolgens aanleiding geven tot de opkomst van multiresistente bacteriën.¹⁰ Dit probleem wordt bovendien verergerd door een ander probleem dat zich voordoet bij de huidige routinematig gebruikte microbiologisch-diagnostische technieken, namelijk dat een infectie niet eenvoudig kan worden onderscheiden van een steriele ontsteking. Al met al kan geconcludeerd worden dat er dringend behoefte is aan de ontwikkeling van nieuwe antimicrobiële middelen met een verhoogde specificiteit voor ziekteverwekkers op de plaats van infectie, met minder bijwerkingen en met een lagere kans op resistentie. Bovendien is er behoefte aan snellere diagnostische methodieken die infectie van steriele ontsteking kunnen onderscheiden.

Zoals hierboven al genoemd is aPDT een klinisch toepasbare antimicrobiële therapie die tot nu toe nog niet heeft geleid tot resistentie. Aangezien de ROS die bij aPDT geproduceerd worden schadelijk kunnen zijn voor alle levende cellen, waaronder cellen van de mens, moet een foto-actievebaar molecuul bij voorkeur gekoppeld worden aan een molecuul dat specifiek bindt aan ziekteverwekkers, zodat een selectieve therapie mogelijk wordt. Deze zogeheten 'targeting'-moleculen zijn meestal monoklonale antistoffen (mAbs), antibiotica, peptides, bacteriofagen of nanodeeltjes die specifiek binden aan bacteriën of andere micro-organismen.¹¹ Een bijkomstig voordeel is dat deze moleculen met een hoge affiniteit voor een specifieke ziekteverwekker, of voor een klasse van verschillende ziekteverwekkers, ook zeer geschikt kunnen zijn voor de diagnose van infectieziektes wanneer ze gekoppeld worden aan fluorescerende moleculen (zogeheten fluoroforen).⁷

De verschillende uitdagingen voor de diagnose en behandeling van bacteriële infecties zijn in detail beschreven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift. Daarnaast wordt in dit hoofdstuk uitgelegd hoe bepaalde targeting-moleculen in combinatie met geschikte fluoroforen kunnen worden toegepast om deze uitdagingen in de nabije toekomst aan te gaan.

Optische beeldvorming van microbiële infecties, gebaseerd op de detectie van bacterie-gerichte fluorescerende moleculen, kan met hoge gevoeligheid en resolutie bereikt worden door de recente ontwikkeling van relatief eenvoudige en draagbare apparatuur.¹² Fluoroforen die in het nabij-infrarode (NIR) spectrum fluoresceren, zoals de IRDye 800CW die is gebruikt voor de studies die in dit proefschrift worden beschreven, zijn ideaal voor de bacterie-gerichte beeldvorming van infecties. Dit komt doordat NIR licht minimaal wordt geabsorbeerd door menselijke weefsels en dientengevolge de beeldvorming van onderhuidse locaties in het lichaam mogelijk maakt.¹³⁻¹⁵

Hoofdstuk 2 beschrijft een eenvoudige strategie voor de koppeling van de fluoroforen IRDye 800CW en IRDye 700DX aan het glycopeptideantibioticum vancomycine, dat specifiek bindt aan Gram-positieve bacteriën. De resulterende conjugaten Vanco-800CW en Vanco-700DX werden

specifiek ontwikkeld als 'tracers' om bacteriële infecties te visualiseren met behulp van optische beeldvorming. Bovendien kan Vanco-700DX toegepast worden voor aPDT, omdat de IRDye 700DX een zeer krachtig foto-activeerbaar molecuul is. De beschreven synthese-strategie laat zien hoe het gebruik van de juiste reagentia kan leiden tot hoge opbrengsten (meer dan 50%) in de reactie van vancomycine met zogenaamde IRDye-NHS-esters en hoe de resulterende verbindingen snel en doeltreffend gezuiverd kunnen worden. Een interessante waarneming was dat Vanco-800CW zeer selectief is voor Gram-positieve bacteriën, maar dat de antimicrobiële activiteit van deze tracer vele malen lager is dan die van het ongelabelde vancomycine. Vanuit microbiologisch oogpunt is dit gunstig, aangezien het hierdoor minder waarschijnlijk is dat herhaalde toediening van Vanco-800CW resistentie tegen vancomycine zal opwekken. Zoals bij de synthese voorzien heeft de Vanco-700DX tracer vanwege zijn NIR fluorescentie en het vermogen om ROS te genereren bij activatie met rood licht als bijkomstig voordeel dat hiermee ziekteverwekkers heel specifiek bestreden kunnen worden. Dergelijke geneesmiddelen, die zowel voor de diagnose als de behandeling van een infectie inzetbaar zijn, worden ook wel 'theragnostische' geneesmiddelen genoemd.

De toepasbaarheid van Vanco-700DX als middel voor aPDT van infecties veroorzaakt door Gram-positieve bacteriën werd uitgebreid geëvalueerd in de studies die beschreven zijn in **hoofdstuk 3**. Hieruit blijkt dat Vanco-700DX specifiek bindt aan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* en zelfs aan vancomycine-resistente varianten van *Enterococcus faecium*. Hierdoor kunnen deze bacteriën specifiek gedood worden bij activering van de gebonden Vanco-700DX tracer met rood licht. Bovendien fungeert rood-licht-geactiveerd Vanco-700DX als een 'biofilm-breker', waarmee de beschermende laag van een biofilm als het ware gekraakt wordt en verschillende antibiotica diep in de biofilm kunnen doordringen om de aldaar aanwezige bacteriën te doden. Met behulp van een biofilm-model op schijfjes van kobalt-chroom, een legering die ook voor medische implantaten wordt gebruikt, kon aangetoond worden dat aPDT met Vanco-700DX zelfs de biofilms van methicilline-resistente *S. aureus* (MRSA) kan kraken. Daarnaast werd Vanco-700DX effectief opgenomen door macrofagen. Hierdoor bleek het mogelijk om MRSA bacteriën die verscholen zaten in deze immuuncellen met behulp van NIR activatie te doden, zelfs zonder dat deze belangrijke immuuncellen waarneembaar beschadigd werden. aPDT met het theragnostische molecuul Vanco-700DX kan daarom wellicht een waardevol hulpmiddel worden voor verbeterde behandeling van infecties die veroorzaakt worden door Gram-positieve bacteriële ziekteverwekkers, waaronder hardnekkige biofilm-geassocieerde infecties en MRSA infecties.

De wereldwijde verspreiding van MRSA heeft pijnlijk duidelijk laten zien dat de Gram-positieve bacterie *S. aureus* snel resistent kan worden tegen nieuwe antibiotica. Het was daarom van belang om meerdere verschillende mogelijkheden te ontwikkelen om deze ziekteverwekker met behulp van aPDT te bestrijden, te meer daar MRSA verantwoordelijk is voor een aantal zeer ernstige infectieziekten, zoals longontsteking, bot- en gewrichtsinfecties, endocarditis en sepsis. Hier komt nog bij dat MRSA tegenwoordig niet alleen ziekenhuisinfecties veroorzaakt, maar ook een bedreiging is voor gezonde mensen buiten het ziekenhuis. **Hoofdstuk 4** beschrijft de koppeling van

IRDye 700DX aan een humaan mAb, genaamd 1D9. Het resulterende immunoconjugaat 1D9-700DX bindt heel specifiek aan het 'immunodominante stafylokokken-antigeen A' (IsaA) van *S. aureus*, een eiwit dat van nature aan het celoppervlak van deze bacterie gebonden is.¹⁶⁻¹⁸ De resultaten van experimenten met 1D9-700DX laten zien dat dit immunoconjugaat in principe zowel voor aPDT als voor niet-invasieve diagnostiek van *S. aureus* infecties benut kan worden. Daarnaast is de toepassing van 1D9-700DX bij beeldgeleide chirurgische verwijdering van geïnfecteerde weefsels of implantaten denkbaar.^{15,19-21} De gerichte aPDT met 1D9-700DX bleek *S. aureus* bacteriën zeer effectief te doden en richtte grote schade aan in biofilms van deze bacterie. Het onderzoek liet echter ook een verminderde werkzaamheid van 1D9-700DX tegen MRSA zien wanneer de experimenten in humaan plasma uitgevoerd werden. Vervolgonderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** liet zien dat dit waarschijnlijk een gevolg is van de aanwezigheid van sterke antioxidanten, met name het serumalbumine, die de geproduceerde ROS wegvangen en inactiveren. Om de antioxidante werking van serumalbumine bij aPDT met 1D9-700DX te onderdrukken werd gebruik gemaakt van het niet-toxische middel kaliumjodide (KI). KI kan namelijk reageren met één van de ROS die bij aPDT geproduceerd worden, het zogenaamde singletzuurstof (1O_2), wat resulteert in de vorming van bacteriedodend vrij jodium. Dit bleek een buitengewoon effectieve aanpak om MRSA bacteriën in humaan plasma via aPDT met 1D9-700DX te bestrijden. Een bijkomstig voordeel van deze aanpak is dat er tot op heden geen microbiële resistentie tegen jodium is waargenomen. Het onderzoek liet tevens zien dat de gerichte aPDT met 1D9-700DX de MRSA bacteriën heel specifiek doodde, zonder aantoonbare nevenschade aan menselijke cellen of andere bacteriën waaraan het 1D9-700DX niet kan binden. Bovendien volstonden door de toevoeging van KI lagere concentraties 1D9-700DX en kortere bestralingstijden om MRSA door middel van aPDT volledig te elimineren.

S. aureus is één van de meest 'succesvolle' bacteriële ziekteverwekkers door zijn opmerkelijke vermogen om te ontsnappen aan de aangeboren en verworven afweer van de mens.²² Het immunoglobuline (Ig)-bindende stafylokokkeneiwit A (Spa) speelt hierbij een sleutelrol.²³⁻²⁵ **Hoofdstuk 6** beschrijft het humane mAb 7G2, dat heel specifiek aan Spa bindt en dat zeer geschikt lijkt voor de ontwikkeling van theragnostische geneesmiddelen. In de eerste plaats werd aangetoond dat 7G2 kan dienen als een effectief targeting-molecuul voor de ontwikkeling van fluorescente tracers om specifiek MRSA te detecteren. Aangezien Spa in principe alle menselijke IgG1-moleculen kan binden, ongeacht hun specificiteit, was het belangrijk om na te gaan of de binding van 7G2 beïnvloed wordt door de aspecifieke binding van andere IgG's aan Spa. Derhalve werden competitie-experimenten uitgevoerd met het mAb 1D9 dat, net als 7G2, tot de IgG1 klasse behoort en beschreven is in de **hoofdstukken 4** en **5**. De resultaten lieten zien dat 7G2 niet wordt weggeconcurrereerd door 1D9, wat te maken heeft met het feit dat deze mAbs op verschillende plekken aan het Spa-eiwit binden. Aangezien Spa een belangrijke virulentiefactor van *S. aureus* is, werd onderzocht of 7G2 ook benut kan worden om Spa te neutraliseren, zodat deze bacterie niet langer beschermd is tegen het aangeboren immuunsysteem van de mens. Dit bleek inderdaad het geval te zijn, aangezien 7G2 de associatie van *S. aureus* met specifieke immuuncellen, de zogenaamde neutrofielen, versterkte en

de zogenaamde complement-gemedieerde doding van de bacteriën stimuleerde. Ten slotte werd de mogelijke toepasbaarheid van 7G2 in theragnostische geneesmiddelen getest door conjugatie met IRDye 700DX. Het resulterend 7G2-700DX immunoconjugaat bleek uitstekend te binden aan *S. aureus* biofilms en na foto-activatie werden alle MRSA bacteriën in de biofilm volledig gedood. Alles tezamen beschouwd laten de resultaten, beschreven in de **hoofdstukken 4, 5 en 6**, zien dat gerichte aPDT met bacterie-specifieke foto-actieveerbare immunoconjugaten een veelbelovende mogelijkheid is voor het bestrijden van infecties die veroorzaakt worden door multiresistente bacteriën.

Een derde mogelijkheid voor de gerichte aPDT van bacteriële infecties wordt gepresenteerd in **hoofdstuk 7**. In dit geval werd een cel-bindend domein (CBD3), afkomstig van het autolysine van een *S. aureus* bacteriofaag, geconjugerd met IRDye 700DX. Endolysines worden geproduceerd tijdens de lytische cyclus van bacteriofagen om de celwand van de bacteriële gastheer te doorbreken en nieuwgevormde bacteriofagen de kans te geven andere bacteriën te infecteren.²⁶ Het opmerkelijke is dat deze enzymen de bacteriële celwand ook binden en afbreken als ze van buitenaf aan de bacteriën worden toegediend. Door hun werkingsmechanisme is de kans op resistentie tegen endolysines bovendien zeer gering.²⁷⁻²⁹ Endolysines hebben een modulaire structuur met katalytische domeinen voor de enzymatische activiteit en een CBD dat verantwoordelijk is voor binding aan bacteriën. De affiniteit van dergelijke CBDs voor bacteriën is veelal hoger dan die van antilichamen, waardoor de CBD-binding aan bacteriën vrijwel niet beïnvloed wordt door veranderende condities. Dit maakt CBDs interessante kandidaten voor de targeting van geconjugeerde foto-actieveerbare moleculen naar bacteriële ziekteverwekkers.^{30,31} In de onderhavige studie werd CBD3 geconjugerd met IRDye 700DX. Het alzo verkregen CBD3-700DX bleek na foto-activatie zeer effectief in het doden van *S. aureus* en *S. epidermidis*. Dit bleek tevens het geval te zijn als deze stafylokokken biofilms hadden gevormd. In principe kan aPDT met CBD3-700DX daarom ingezet worden om diepere lagen van biofilms beter toegankelijk te maken voor antibiotica of het humane immuunsysteem.³² Een andere belangrijke vinding die beschreven is in **hoofdstuk 7** betreft het vermogen van CBD3-700DX om effectief door humane cellen opgenomen te worden. Binnen deze cellen kan CBD3-700DX bijvoorbeeld binden aan geïnternaliseerde *S. aureus* bacteriën en deze doden na foto-activatie. Hoewel dit enigszins toxisch is voor de desbetreffende cellen, kan de waargenomen nevenschade ook als voordeel gezien worden, omdat die de mogelijkheid biedt om persistente intracellulaire bacteriën blootstelt aan het immuunsysteem van de gastheer en aan eventueel toegediende antibiotica. De studie beschreven in **hoofdstuk 7** laat daarom duidelijk zien dat CBDs wellicht in de toekomst toegepast kunnen worden als effectieve targeting-moleculen voor aPDT om ziekteverwekkende bacteriën, die zich in biofilms en cellen van de gastheer verstoppen, alsnog te elimineren.

Toekomstperspectieven

Diagnose van infecties

De diagnose en de behandeling van infecties zijn nauw met elkaar verweven, aangezien een snelle en nauwkeurige diagnose nodig is om een patiënt de meest effectieve behandeling te kunnen geven. Bacterie-specifieke fluorescente beeldvorming kan hierbij wellicht nuttig zijn^{14,15}, maar er zijn nog veel uitdagingen waarvoor een oplossing gevonden moet worden. Met name de weefselpenetratie van licht, zelfs die van NIR licht, is beperkt tot ongeveer één centimeter, hetgeen de detectie van diep-gelegen infecties belemmert. Opto-akoestische beeldvorming kan deze beperking tot op zekere hoogte overwinnen, omdat hiermee een diepere weefselpenetratie tot enkele centimeters mogelijk is.³³ Deze techniek berust op de absorptie van licht door chromoforen, gevolgd door een afgifte van energie aan de omgeving in de vorm van warmte. Deze plaatselijke verhitting leidt tot een zogenaamde thermo-elastische expansie, waarbij detecteerbare ultrasone golven uitgezonden worden.³⁴ Om infecties in het gehele lichaam van de mens in beeld te brengen kan gerichte positron-emissietomografie (PET) worden toegepast.²⁰ Bijkomende voordelen van PET zijn dat de respectievelijke tracers in lage doses kunnen worden toegediend en dat de benodigde radionucliden zeer kortlevend zijn en binnen enkele uren vervallen. Hierdoor is de stralingsbelasting voor de patiënt betrekkelijk gering.

De meeste tracers die momenteel worden onderzocht op mogelijke toepassing voor de optische beeldvorming van infecties binden slechts aan één specifiek micro-organisme of aan één bepaalde klasse van micro-organismen. Bijgevolg zou de toepassing van cocktails, samengesteld uit verschillende tracers die specifiek zijn voor verschillende micro-organismen, meer gedetailleerde inzichten kunnen verschaffen in de veroorzaker(s) van een infectie. De **hoofdstukken 2** tot en met **5** van dit proefschrift beschrijven tracers die gebaseerd zijn op twee verschillende targeting moleculen, namelijk het antibioticum vancomycine en het mAb 1D9. Deze targeting-moleculen binden, respectievelijk, aan alle Gram-positieve bacteriën of alleen aan *S. aureus*. Een combinatie van deze twee targeting-moleculen, elk gelabeld met een specifieke fluorofoor, zou het mogelijk maken te bepalen of een infectie wordt veroorzaakt door Gram-positieve bacteriën en, zo ja, of *S. aureus* aanwezig is. Deze vraag zou eveneens beantwoord kunnen worden door vancomycine en het in **hoofdstuk 6** beschreven mAb 7G2 met verschillende fluoroforen te labelen, of door het in **hoofdstuk 7** beschreven CBD3 en de mAbs 1D9 of 7G2 met verschillende fluoroforen te labelen. Een andere innovatieve diagnostische benadering zou gebaseerd kunnen zijn op het gebruik van multimodale beeldvormingstracers, die bijvoorbeeld niet alleen een fluorescent signaal afgeven, maar ook een radioactief signaal. Dit concept is mooi geïllustreerd in een recente studie van Zoller *et al*, waarbij multimodale niet-invasieve PET-CT en fluorescentiebeeldvorming met veelbelovend resultaat werden gecombineerd om een *S. aureus* implantaatinfectie *in vivo* te diagnosticeren. In dit geval was het mAb 1D9 dubbel gelabeld met de fluorofoor NIR680 en het radionuclide Zirkonium-89.²⁰ Deze studie liet tevens zien dat de fluorescentie van de gebruikte multimodale

tracer richting kan geven aan intra-operatieve beeld-gestuurde chirurgische verwijdering van geïnfecteerde implantaten en weefsels. De studie van Zoller *et al.* onderstreept daarom de veelbelovende mogelijkheden voor de nauwkeurige en snelle diagnose van bacteriële infecties met behulp van zeer gevoelige PET-tracers en fluorescente kleurstoffen die beide gekoppeld kunnen worden aan specifieke bacterie-gerichte moleculen, zoals mAbs.

Behandeling van infecties

Om PDT in de kliniek te kunnen toepassen zijn foto-actieveerbare moleculen nodig die voor medische toepassingen zijn goedgekeurd. Inmiddels zijn er twee generaties van dergelijke moleculen bekend. Wegens hun gebrek aan specificiteit voor kankerweefsel en de lage golflengte-absorptiebanden van de eerste generatie foto-actieveerbare moleculen, is de aandacht tegenwoordig verschoven naar de tweede generatie van dergelijke moleculen, die een hoge absorptie van rood/NIR licht vertonen en die het daardoor mogelijk maken om tumoren dieper in het lichaam te detecteren. Bovendien heeft deze klasse van foto-actieveerbare moleculen betere farmacokinetische eigenschappen, zijn ze minder toxisch en leveren ze een hogere $^1\text{O}_2$ -productie op. De tweede generatie foto-actieveerbare moleculen vertoont echter ook een aantal gebreken, zoals een slechte oplosbaarheid in water, een lange retentietijd in het lichaam en gevoeligheid voor foto-inactivatie.² Om deze nadelen te ondervangen is een derde generatie van foto-actieveerbare moleculen ontwikkeld. Deze verbindingen zijn over het algemeen gebaseerd op foto-actieveerbare moleculen van de tweede generatie die geconjugeerd zijn met biologische of semi-synthetische moleculen die specifiek aan een doelwit binden, met name antibiotica, monosachariden, polymere nanodeeltjes, monoklonale antilichamen of niet-antilichaam-gebaseerde eiwitdragers³⁵ (**hoofdstukken 2-7**). De potentiële meerwaarde van deze benadering wordt onderstreept door het gegeven dat NIR foto-immunotherapie met het silicium-ftalocyanine IRDye 700DX geconjugeerd aan een mAb dat specifiek is voor de epidermale groeifactor receptor (d.w.z. ASP-1929) momenteel wordt geëvalueerd in een fase III klinische studie voor de behandeling van patiënten met inoperabele hoofd- en halskankers.³⁶ In Japan werd ASP-1929 reeds in 2020 goedgekeurd voor klinische toepassing.³⁷ Het gebruik van IRDye 700DX gekoppeld aan antilichamen wordt momenteel ook pre-klinisch onderzocht voor de PDT van andere ziekten, zoals prostaatkanker³⁸ en bacteriële infecties (**hoofdstukken 4-6**).³⁹ Terwijl oppervlakkige microbiële infecties waarschijnlijk goed behandeld kunnen worden door topische toediening van een foto-actievebaar molecuul, zal de aPDT van dieper in het lichaam voorkomende infecties een systemische toediening vereisen via intraveneuze of orale routes. Hierbij is de toediening van een micro-organisme-gericht foto-actievebaar molecuul wenselijk om accumulatie op de plaats van een infectie te garanderen. Bovendien verminderen aPDT-benaderingen, waarbij foto-actieveerbare moleculen specifiek gestuurd worden naar een plaats van infectie, de mogelijke bijwerkingen op gezonde niet-geïnfecteerde weefsels aanzienlijk (**hoofdstukken 3, 4, 5 en 7**).³⁹ Verder is het essentieel om te beschikken over een geschikte lichtbron om maximale blootstelling van het aPDT-agens in geïnfecteerde weefsels te bewerkstelligen. Aan deze voorwaarde kan ook worden voldaan

met behulp van optische vezels die zijn gekoppeld aan een bronchoscoop of endoscoop, zodat pulmonale of gastro-intestinale infecties ook met aPDT behandeld kunnen worden. Hiertoe is het verder van belang dat, bij gebruik van IRDye 700DX-gebaseerde agentia voor aPDT, de optische vezels rood of NIR licht kunnen geleiden om optimale weefselpenetratie en foto-activatie te garanderen.⁴⁰

Ongeveer 80% van alle bacteriële en schimmelinfecties bij de mens wordt geassocieerd met biofilms.⁴¹ De biofilm-matrix beschermt micro-organismen tegen aanvallen van de menselijke afweer en antimicrobiële therapie. Bovendien vormt de viskeuze biofilmmatrix een barrière die niet alleen de verspreiding van geneesmiddelen beperkt, maar ook die van voedingsstoffen en zuurstof.⁴² Hierdoor zullen bacteriën die in de diepere lagen van een biofilm zitten, hun fysiologie aanpassen en in een 'slaapstand' geraken, waardoor ze veel resistenter worden tegen antibiotica.⁴³ Het is daarom niet zo verwonderlijk dat aPDT ook minder effectief is in de bestrijding van micro-organismen die in biofilms groeien en dat na een behandeling vaak binnen 24 uur hernieuwde microbiële groei waargenomen kan worden. Dit doet vermoeden dat een effectieve bestrijding van biofilms het beste gebaseerd kan worden op combinatietherapieën, waarbij aPDT gecombineerd wordt met een klassieke antimicrobiële therapie (**hoofdstuk 3**). Moeilijk uit te roeien biofilms worden vaak aangetroffen op geïmplanteerde medische hulpmiddelen. Eén van de ernstigste ziekenhuisinfecties, die in verband wordt gebracht met biofilmvorming, is ventilatie-geassocieerde pneumonie (VAP) bij geïntubeerde patiënten. VAP wordt geassocieerd met een hoog sterftecijfer (~50%) en kan zijn oorsprong vinden in microbiële biofilms aan de binnenzijde van de gebruikte endotracheale buizen. Het is denkbaar dat dit risico vermeden kan worden door aPDT, waarbij de endotracheale buis voorzien wordt van foto-activeerbare moleculen en een optische vezel waarmee foto-activatie bewerkstelligd kan worden.⁴⁴ Implantaten worden ook vaak gebruikt in de orthopedische chirurgie om gewrichten te vervangen, of om gebroken botten te fixeren. Hierbij bestaat een groot risico voor microbiële infecties, vooral in het geval van open botbreuken. Periprothetische gewrichtsinfecties (PJIs) komen relatief weinig voor, maar ze leiden wel tot een hoge morbiditeit en hun behandeling is erg kostbaar. De meest toegepaste behandeling van PJIs bestaat uit verwijdering van het implantaat, langdurige antimicrobiële therapie en het hernieuwd plaatsen van een implantaat.⁴⁵ PJI is veelal geassocieerd met de vorming van biofilms op het implantaatoppervlak, wat leidt tot het falen van reguliere antimicrobiële behandelingen. aPDT kan, wellicht in combinatie met andere antimicrobiële therapieën, tijdens de operatie worden toegepast om de op het implantaat gevormde biofilm te verstoren en de omringende zachte weefsels en het bot te desinfecteren (**hoofdstuk 3**). Hierdoor zal de noodzaak om geïnfecteerde weefsels te verwijderen en de kans op herinfectie beperkt worden. Een andere met biofilm-vorming geassocieerde ziekte is infectieuze endocarditis (IE). In het geval van IE ontwikkelen biofilms zich op hartkleppen of geïmplanteerde hulpmiddelen.⁴⁶ IE is tegenwoordig één van de ernstigste infectieuze aandoeningen, waarbij de patiënt een hoge kans heeft om te overlijden.⁴⁷ Het is daarom van cruciaal belang om de diagnose- en behandelingsstrategieën voor IE verder te verbeteren. Mogelijk kan aPDT hierin een rol spelen,

bijvoorbeeld door intraveneuze toediening van een foto-actieveerbaar molecuul en daaropvolgende lokale foto-activatie met behulp van een optische vezel. Dit zou wellicht de "decontaminatie" van hartkleppen mogelijk maken, waarmee het resultaat van een standaard antimicrobiële therapie verbeterd kan worden.

Tenslotte heeft niet-gerichte aPDT veelbelovende resultaten laten zien bij de inactivering van virussen, waaronder coronavirussen.⁴⁸ Dit impliceert dat aPDT wellicht ook kan worden toegepast bij antivirale desinfectie of therapeutische benaderingen. Zo kunnen foto-actieveerbare moleculen bijvoorbeeld vrij eenvoudig geïmmobiliseerd worden op vaste materialen⁴⁹, wat suggereert dat de resulterende materialen misschien gebruikt kunnen worden om virussen in afvalwater te inactiveren of om textiel met antivirale eigenschappen te produceren. Dit zou zeer relevant zijn in de context van de huidige COVID-19 pandemie, die veroorzaakt wordt door het zeer besmettelijke SARS-CoV-2 virus. Materialen die virale inactivatie mogelijk maken op basis van de principes van aPDT zouden also kunnen helpen om de verspreiding van het SARS-CoV-2 virus van persoon tot persoon te verminderen, of om infecties veroorzaakt door contact met besmette voorwerpen en oppervlakken te voorkomen.⁵⁰ Ook is het SARS-CoV-2 virus ontdekt in het afvalwater van plaatsen met hoge besmettingscijfers. Het is denkbaar dat aPDT mogelijk kan helpen om de SARS-CoV-2 belasting van besmet afvalwater te minimaliseren en dat hiermee het ontstaan van de toxische bijproducten van de huidige desinfectiemethodes met chloor en ozon vermeden kan worden.⁵¹

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en het testen van verschillende benaderingen die ons mogelijk kunnen helpen om de strijd tegen antimicrobiële resistentie te winnen. Deze benaderingen zijn gebaseerd op een portfolio van nieuwe conjugaten voor gerichte aPDT. De beschreven resultaten laten zien dat bacterie-gerichte aPDT een aantal grote voordelen biedt. In de eerste plaats is aPDT zeer effectief in het doden van micro-organismen met een minimale kans op de ontwikkeling van resistentie. Ten tweede heeft aPDT minimale neveneffecten op gastheerweefsels en andere micro-organismen, waaraan de foto-actieveerbare moleculen die nodig zijn voor het genereren van ROS niet kunnen binden. Ten derde zijn de nieuwe, op bacteriën gerichte conjugaten voor aPDT die in dit proefschrift worden beschreven, in staat biofilms en intracellulaire bacteriën te vernietigen. Bovendien kunnen al deze moleculen niet alleen worden toegepast voor antimicrobiële therapie, maar ook voor de diagnose van infecties voorafgaand aan een behandeling. Daarom moeten ze worden beschouwd als theragnostische middelen, die ook wel beschouwd worden als geneesmiddelen van de toekomst. Het gebruik van dergelijke theragnostica zal de tijd tussen diagnose en behandeling van ziektes enorm verkorten, wat tot betere klinische resultaten zal leiden. De klinische toepasbaarheid van bacteriegerichte fluorescente theragnostica, zoals beschreven in dit proefschrift, kan wellicht nog vergroot worden door ze te combineren

met kortlevende radionuclides die met PET gedetecteerd kunnen worden. Dit zal de opsporing en behandeling van infecties diep in het lichaam van de mens sterk verbeteren en, indien nodig, de chirurgische verwijdering van geïnfecteerde implantaten en weefsels vereenvoudigen. De belangrijkste uitdaging voor vervolgonderzoek op dit gebied zal zijn om de ontwikkelde moleculen en benaderingen voor bacterie-gerichte aPDT te vertalen naar klinische toepassingen en te bepalen welke combinaties van targeting-moleculen en foto-activeerbare moleculen het meest geschikt zijn voor de preventie en behandeling van infectieziekten.

References

1. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg*. 1991;61(5):340–8.
2. Baskaran R, Lee J, Yang S. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018;22:25.
3. Sharwani A, Jerjes W, Salih V, MacRobert AJ, El-Maaytah M, Khalil HS, *et al*. Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83(1):27–33.
4. Stájer A, Kajári S, Gajdács M, Musah-Eroje A, Baráth Z. Utility of photodynamic therapy in dentistry: Current concepts. *Dent J*. 2020;8(2):43.
5. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):755–67.
6. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, *et al*. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–88.
7. Subramaniam G, Girish M. Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections. *Indian J Pediatr*. 2020;87(11):937–44.
8. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Br Med Bull*. 2015;116:105–13.
9. Escudeiro P, Pothier J, Dionisio F, Nogueira T. Antibiotic Resistance Gene Diversity and Virulence Gene Diversity Are Correlated in Human Gut and Environmental Microbiomes. *mSphere*. 2019;4(3):298190.
10. van Oosten M, Hahn M, Crane LMA, Pleijhuis RG, Francis KP, van Dijk JM, *et al*. Targeted imaging of bacterial infections: Advances, hurdles and hopes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(6):892–916.
11. Klausen M, Ucuncu M, Bradley M, Barattucci A, Bonaccorsi P. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 2020;25:5239.
12. Heuker M, Gomes A, van Dijk JM, van Dam GM, Friedrich AW, Sinha B, *et al*. Preclinical studies and prospective clinical applications for bacteria-targeted imaging: the future is bright. *Clin Transl Imaging*. 2016;4(4):253–64.
13. van Oosten M, Schäfer T, Gazendam JAC, Ohlsen K, Tsompanidou E, De Goffau MC, *et al*. Real-time *in vivo* imaging of invasive- and biomaterial-associated bacterial infections using fluorescently labelled vancomycin. *Nat Commun*. 2013;4:2584.
14. Schoenmakers JWA, Heuker M, López-Álvarez M, Nagengast WB, van Dam GM, van Dijk JM, *et al*. Image-guided *in situ* detection of bacterial biofilms in a human prosthetic knee infection model: a feasibility study for clinical diagnosis of prosthetic joint infections. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48:757–67.
15. Park HY, Zoller SD, Hegde V, Sheppard W, Burke Z, Blumstein G, *et al*. Comparison of two fluorescent probes in preclinical non-invasive imaging and image-guided debridement surgery of Staphylococcal biofilm implant infections. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–13.
16. Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJM, *et al*. Mapping the

- Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(3):755–88.
17. Ziebandt AK, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJJB, Arends JP, *et al.* Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics.* 2010;10(8):1634–44.
 18. Dreisbach A, Wang M, van der Kooi-Pol MM, Reilman E, Koedijk DGAM, Mars RAT, *et al.* Tryptic Shaving of *Staphylococcus aureus* Unveils Immunodominant Epitopes on the Bacterial Cell Surface. *J Proteome Res.* 2020;19(8):2997–3010.
 19. Romero Pastrana F, Thompson JM, Heuker M, Hoekstra H, Dillen CA, Ortines R V., *et al.* Noninvasive optical and nuclear imaging of *Staphylococcus*-specific infection with a human monoclonal antibody-based probe. *Virulence.* 2018;9(1):262–72.
 20. Zoller SD, Park HY, Olafsen T, Zamilpa C, Burke ZDC, Blumstein G, *et al.* Multimodal imaging guides surgical management in a preclinical spinal implant infection model. *JCI Insight.* 2019;4(3):e124813.
 21. Sheppard WL, Mosich GM, Smith RA, Hamad CD, Park HY, Zoller SD, *et al.* Novel *in vivo* mouse model of shoulder implant infection. *J Shoulder Elb Surg.* 2020;29(7):1412–24.
 22. Raineri EJM, Yedavally H, Salvati A, van Dijk JM. Time-resolved analysis of *Staphylococcus aureus* invading the endothelial barrier. *Virulence.* 2020;11(1):1623–39.
 23. Forsgren A, Quie PG. Effects of Staphylococcal Protein a on Heat Labile Opsonins. *J Immunol.* 2020;112(3):1177–80.
 24. Cruz AR, den Boer MA, Strasser J, Zwarthoff SA, Beurskens FJ, de Haas CJ, *et al.* Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(7):e2016772118.
 25. Kobayashi SD, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio.* 2013;4(5):4–6.
 26. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021;13(4):680.
 27. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, *et al.* Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1237–47.
 28. Cha Y, Son B, Ryu S. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. *Food Microbiol.* 2019;84:103245.
 29. Nakonieczna A, Cooper CJ, Gryko R. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(3):620–31.
 30. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins - Current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(4):480–7.
 31. Schmelcher M, Shen Y, Nelson DC, Eugster MR, Eichenseher F, Hanke DC, *et al.* Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(5):1453–65.
 32. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(1):73–98.

33. Wang Y, Thompson JM, Ashbaugh AG, Khodakivskyi P, Budin G, Sinisi R, *et al.* Preclinical evaluation of photoacoustic imaging as a novel noninvasive approach to detect an orthopaedic implant infection. *J Am Acad Orthop Surg.* 2017;25 Suppl 1(Suppl 1):S7-S12.
34. Ntziachristos V, Razansky D. Molecular Imaging by Means of Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT). *Chem Rev.* 2010;110(5):2783–94.
35. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:1098–107.
36. Rakuten Medical. ASP-1929 Photoimmunotherapy (PIT) Study in Recurrent Head/Neck Cancer for Patients Who Have Failed at Least Two Lines of Therapy. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03769506>. 2018.
37. Kato T, Wakiyama H, Furusawa A, Choyke PL, Kobayashi H. Near Infrared Photoimmunotherapy; A Review of Targets for Cancer Therapy. *Cancers.* 2021;13(11):2535.
38. Nagaya T, Nakamura Y, Okuyama S, Ogata F, Maruoka Y, Choyke P, *et al.* Near-Infrared Photoimmunotherapy Targeting Prostate Cancer with Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Antibody. *Mol Cancer Res.* 2017;15(9):1153–62.
39. Bispo M, Anaya-Sanchez A, Suhani S, Raineri EJM, López-Álvarez M, Heuker M, *et al.* Fighting *Staphylococcus aureus* infections with light and photoimmunoconjugates. *JCI Insight.* 2020;5(22):e139512.
40. Oliveira CS, Turchiello R, Kowaltowski AJ, Indig GL, Baptista MS. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(4):824–33.
41. Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–32.
42. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2659.
43. Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front Microbiol.* 2018;9:1299.
44. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Wedell E, Loebel N, *et al.* Reduction of Endotracheal Tube Biofilms Using Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):586–90.
45. Briggs T, Blunn G, Hislop S, Ramalhete R, Bagley C, Mckenna D, *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections. *Lasers Med Sci.* 2018;33(3):523–32.
46. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet.* 2004;363(9403):139–49.
47. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG, Bayer AS, *et al.* Clinical Presentation, Etiology, and Outcome of Infective Endocarditis in the 21st Century: The International Collaboration on Endocarditis—Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2009;169(5):463–73.
48. Costa L, Tomé J, Neves M, Tomé A, Cavaleiro J, Faustino M, *et al.* Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT.

- Antiviral Res.* 2011;91(3):278–82.
49. Carvalho CMB, Alves E, Costa L, Tomé JPC, Faustino MAF, Neves MGPMS, *et al.* Functional Cationic Nanomagnet–Porphyrin Hybrids for the Photoinactivation of Microorganisms. *ACS Nano.* 2010;4(12):7133–40.
 50. ZD G, ZY W, SF Z, X L, L L, C L, *et al.* Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1586–91.
 51. Carvalho CMB, Gomes ATPC, Fernandes SCD, Prata ACB, Almeida MA, Cunha MA, *et al.* Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;88(2–3):112–8.

Resumo e discussão

A Terapia Fotodinâmica (PDT) baseia-se no uso de fármacos denominados de fotossensibilizadores que, após a ativação com luz de um comprimento de onda específico, são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas ROS serão depois responsáveis pela morte celular.¹ A PDT é atualmente aplicada em diferentes doenças oncológicas e não oncológicas. É importante realçar que vários fotossensibilizadores já foram aprovados pela “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA para o tratamento de vários cancros, incluindo cancros esofágicos, da bexiga, da cervical, do pulmão, da cabeça e pescoço, da próstata e cancros gastrointestinais. As doenças não oncológicas, tais como a degeneração macular relacionada com a idade e a neovascularização coroideia associada à miopia, dependem também da PDT como terapia de primeira linha com o fotossensibilizador, clinicamente aprovado, Visudyne.² Nas doenças orais, o precursor do PpIX-5-aminolaevulinic ácido (5-ALA) - foi também implementado como uma ferramenta de diagnóstico para distinguir lesões malignas das não malignas. Nestes casos, o 5-ALA é aplicado topicamente na lesão suspeita e a acumulação intracelular da porfirina aumenta a fluorescência do tecido, após irradiação.³ As infeções bacterianas, virais e fúngicas representam outra grande preocupação entre as patologias orais. Como os tratamentos convencionais não impedem que algumas destas infeções ocorram, a PDT antimicrobiana (aPDT) começou a ser clinicamente implementada no tratamento da candidíase oral, herpes labiais e periodontite crónica.⁴ Por último, a aPDT é também clinicamente aplicada para o tratamento de acne vulgaris, leishmaniose e outras infeções microbianas da pele.⁵ Todas estas aplicações são muito eficazes e, conseqüentemente, incentivaram a presente investigação doutoral a pesquisar uma aplicação muito mais ampla da aPDT na luta contra as doenças infecciosas. É importante salientar que muitos dos compostos utilizados na aPDT são fluorescentes, o que abre a possibilidade de os utilizar não só para intervenções terapêuticas, mas também para o diagnóstico de doenças infecciosas, facto que originou o segundo grande objetivo da investigação doutoral descrita nesta tese.

As doenças infecciosas são uma das maiores ameaças à saúde humana, tanto em termos de morbilidade como de mortalidade.⁶ As infeções bacterianas são geralmente mais fáceis de tratar do que as infeções virais ou parasitárias, devido à extensa disponibilidade de agentes antimicrobianos eficazes. No entanto, o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos está a tornar-se um problema crescente no nosso dia-a-dia. O desnecessário uso excessivo e prolongado dos antibióticos a nível mundial está a afetar a eficácia da maioria dos medicamentos terapêuticos atualmente disponíveis.^{7,8} Mutações espontâneas em genomas bacterianos e a transferência horizontal de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas são as principais causas do aparecimento de múltiplas resistências antimicrobianas em microrganismos patogénicos.^{7,8} Além disso, a maioria dos antibióticos atinge um amplo espectro de microrganismos e, por conseguinte, a sua administração pode afetar outras comunidades bacterianas não patogénicas no corpo humano.⁹ Também as modalidades de diagnóstico tradicionais utilizadas para detetar infeções são

dispendiosas e relativamente lentas, o que torna necessário implementar uma gestão de infeção empírica com antibióticos de largo espectro. Por sua vez, isto provoca o aparecimento de bactérias multirresistentes a fármacos.¹⁰ Este problema é exacerbado por outra desvantagem das atuais técnicas de diagnóstico microbiológico, nomeadamente o facto de não poderem diferenciar entre infeção e inflamação estéril. De um modo geral, pode concluir-se que é urgente o desenvolvimento de novos antimicrobianos com maior especificidade para os agentes patogénicos no local da infeção, com menos efeitos colaterais e com uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistência. Aliás, é necessário desenvolver modalidades de diagnóstico mais rápidas que possam distinguir entre infeção e inflamação estéril.

Como descrito acima, a aPDT é uma terapia antimicrobiana alternativa e clinicamente estabelecida, sem qualquer resistência até agora reportada. Idealmente, uma vez que as ROS produzidas pelo fotossensibilizador após irradiação podem ser tóxicas para todas as células vivas, o fotossensibilizador deve ser acoplado a um agente específico para obter uma terapia seletiva. Estes agentes específicos são geralmente anticorpos monoclonais (mAb), antibióticos, peptídeos, bacteriófagos ou nanopartículas.¹¹ É importante realçar que quando estas moléculas, com elevada afinidade de ligação para microrganismos patogénicos específicos ou classes de agentes patogénicos, são conjugadas com fluoróforos, também podem ser adequadas para o diagnóstico de doenças infecciosas.

O **Capítulo 1** desta tese apresenta uma introdução geral aos desafios atuais no diagnóstico e no tratamento de infeções bacterianas. Este capítulo explica ainda como podem ser utilizados determinados agentes específicos, combinados com fluoróforos adequados, para fazer face a estes desafios.¹² Os fluoróforos próximos do infravermelho, como o IRDye 800CW utilizado para estudos descritos nesta tese, são ideais para a deteção específica de infeções, uma vez que a luz próxima do infravermelho é minimamente absorvida pelos tecidos humanos e permite a deteção de locais-alvo mais profundos no corpo.¹³⁻¹⁵

O **Capítulo 2** apresenta uma estratégia simples para a conjugação dos fluoróforos IRDye 800CW e IRDye 700DX com o antibiótico glicopeptídico vancomicina, que é específico para as bactérias Gram-positivas. Os conjugados obtidos (Vanco-800CW e Vanco-700DX) foram, assim, concebidos para lidar com infeções bacterianas através da deteção ótica. Para além disso, a Vanco-700DX pode ser aplicada para aPDT, porque o IRDye 700DX é um fotossensibilizador potente. A estratégia sintética utilizada descreve como a utilização dos agentes corretos de acoplamento conduz a elevados rendimentos (mais de 50%) na reação entre a amina secundária da vancomicina e os ésteres da N-hidroxissuccinimida dos IRDyes. É ainda demonstrada como a precipitação dos compostos resultantes pode ser explorada como um conveniente passo inicial de purificação para remover o excesso de vancomicina não conjugada, uma vez terminada a reação. O conjugado Vanco-800CW demonstrou elevada seletividade para os biofilmes causados por espécies de estafilococos. Embora a afinidade da vancomicina para as bactérias Gram-positivas não seja comprometida pela conjugação com os compostos próximos do infravermelho, a atividade antimicrobiana deste

antibiótico é significativamente reduzida. De um ponto de vista microbiológico, isto é benéfico porque torna menos provável que o uso repetido dos diferentes conjugados provoque resistência à vancomicina. O conjugado Vanco-700DX pode ser usado como "agente teranóstico" devido à sua fluorescência próxima do infravermelho e à sua capacidade de produzir ROS, após irradiação com luz vermelha.

A aplicabilidade da Vanco-700DX como agente da aPDT de infecções bacterianas Gram-positivas foi amplamente avaliada no **Capítulo 3**. Como foi demonstrado, a Vanco-700DX é específica para a *Staphylococcus aureus*, a *Staphylococcus epidermidis* e a *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, o que permite matar estas bactérias após a foto-ativação com luz vermelha. Além disso, a Vanco-700DX ativada por luz vermelha atua como uma "caçadora de biofilmes", que representam comunidades bacterianas com um elevado grau de organização, que conferem um escudo de proteção contra a ação antimicrobiana e do sistema imune. A Vanco-700DX quebra esta camada protetora dos biofilmes, permitindo assim uma penetração mais profunda de diferentes antibióticos e, conseqüentemente, a erradicação quase completa das bactérias residentes. Utilizando um modelo de biofilme formado num disco de cobalto-cromado, foi demonstrado que a aPDT com a Vanco-700DX provoca danos nos biofilmes causados por *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) e elimina as bactérias residentes no biofilme. Foi também demonstrado que a Vanco-700DX é eficientemente internalizada pelas células imunitárias denominadas de macrófagos, independentemente de estar previamente ligado às bactérias ou não. Isto permitiu a morte das MRSA internalizadas por macrófagos após a ativação com luz vermelha, sem prejudicar estas importantes células imunitárias. Posto isto, a aPDT juntamente com a pequena molécula Vanco-700DX pode, assim, tornar-se uma ferramenta valiosa para o tratamento de infecções causadas por agentes bacterianos Gram-positivos multirresistentes a fármacos, incluindo as muito temidas infecções associadas aos biofilmes e às MRSA.

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* resiste eficazmente à terapia antimicrobiana através da adaptação, da mutação, da aquisição de genes de resistência de outras bactérias e da formação de biofilmes. As linhagens resultantes de *S. aureus* multirresistentes a fármacos, especialmente MRSA, são responsáveis por doenças graves, tais como a pneumonia, as infecções ósseas e articulares, a endocardite e a sépsis. Tais linhagens resistentes podem ser encontradas não só em hospitais, mas também entre indivíduos saudáveis na comunidade. Por conseguinte, é imperativo explorar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras, como a aPDT, contra este agente patogénico que sejam menos propensas ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana. O **Capítulo 4** apresenta a conjugação de um mAb totalmente humano (designado 1D9) com o IRDye 700DX. É importante realçar que o mAb 1D9 é específico para o antigénio estafilococal imunodominante A (IsaA), expresso invariavelmente, que está exposto na superfície da parede bacteriana.¹⁶⁻¹⁸ A potencial aplicação de um conjugado fluorescente composto pelo 1D9, como uma ferramenta de diagnóstico não invasiva para cirurgia guiada e no desbridamento seletivo de tecido infetado, foi recentemente demonstrada em modelos de infeção de ratinhos.^{15,19-21} Da mesma

forma, o imunocjugado 1D9-700DX foi caracterizado bioquimicamente e em modelos de infecção pré-clínicos. A aPDT com o 1D9-700DX mostrou-se altamente eficaz na destruição de elevadas cargas bacterianas e na destruição da superfície dos biofilmes de *S. aureus*. Além disso, este imunocjugado melhora significativamente a sobrevivência da larva *Galleria Mellonella* infetada com MRSA, após irradiação com luz vermelha. Num modelo de infecção *post-mortem* verificou-se que a pele humana não limita a penetração da luz vermelha no local da infecção. No entanto, a eficácia da aPDT no corpo humano pode ser diminuída por poderosos antioxidantes presentes no sangue e nos tecidos. Por exemplo, os estudos apresentados neste capítulo mostram que a eficácia da aPDT com o 1D9-700DX no combate das MRSA é reduzida no plasma humano. Para superar a atividade destes antioxidantes, a aPDT com o 1D9-700DX foi combinada com o agente não tóxico iodeto de potássio (KI). Neste caso, KI reage com o oxigénio singlete (1O_2) produzido após a aPDT, resultando na formação de iodo livre que é tóxico para as bactérias. Uma vantagem adicional da utilização de KI em combinação com a aPDT é que, até à data, não foi reportada qualquer resistência microbiana contra o iodo.

A constatação de que o plasma pode antagonizar os efeitos bactericidas da aPDT levou a novas experiências para explicar a atividade antioxidante do plasma humano e explorar a potencial aplicação do agente potenciador KI. O **Capítulo 5** relata que o efeito antagónico do plasma humano pode ser atribuído em grande parte, se não completamente, à albumina do soro humano (HSA). Esta constatação é apoiada pelo facto da HSA representar o maior conjunto de tióis livres no plasma responsáveis pela desintoxicação de ROS. O bloqueio destes tióis livres com agentes alquilantes restaurou a eficácia da aPDT com 1D9-700DX. Ao adicionar KI à equação da aPDT, a formação de iodo aumentou significativamente a erradicação da MRSA (redução superior a 6 unidades logarítmicas), sem afetar negativamente outras espécies bacterianas ou células humanas nas proximidades. Além disso, a adição de KI permite uma redução drástica tanto da concentração do imunocjugado 1D9-700DX, como do tempo de irradiação necessário para a eliminação efetiva das MRSA pela aPDT, na presença de HSA.

A *S. aureus* tornou-se um dos mais bem-sucedidos agentes patogénicos bacterianos devido à sua incrível capacidade de escapar das defesas imunes inatas e adaptáveis dos mamíferos.²² A proteína A (Spa) é uma proteína que pode ser encontrada na parede celular da bactéria *S. aureus*. É uma proteína de ligação a imunoglobulinas (Ig) e desempenha um papel importante na subversão das defesas imunitárias humanas contra a *S. aureus*, devido à sua interferência com a destruição bacteriana por complementos ativados e fagócitos profissionais.²³⁻²⁵

O **Capítulo 6** apresenta o mAb totalmente humano 7G2, pertencente à classe de IgG1 que se liga especificamente a Spa. Os resultados mostram que este mAb tem um grande potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Em primeiro lugar, demonstrou-se que o 7G2 pode servir como um agente de diagnóstico eficaz na fluorescência de imagem ótica para detetar especificamente MRSA. Também a eficiência do 7G2 como detetor de infecções de *S. aureus* foi avaliada num modelo de miosite em ratinhos *in vivo*, em que a infecção foi causada por uma estirpe

bioluminescente geneticamente modificada de *S. aureus* (Xen29). O 7G2 foi conjugado com um composto fluorescente próximo do infravermelho, administrado por via intravenosa (IV) e, após 4 dias, foi capaz de detectar especificamente o local da infecção causada pela *S. aureus*. Uma vez que moléculas IgG1 humanas irão ligar-se a Spa, independentemente da sua especificidade, era importante verificar se a ligação do 7G2 a esta proteína poderia ser afetada pela ligação regular de outros Ig's. Assim, foram realizadas experiências de competição entre o 7G2 e outro mAb da classe IgG1, nomeadamente o 1D9 descrito nos **Capítulos 4 e 5**. Foi demonstrado que o 7G2 não é superado pelo 1D9 na ligação a Spa. Uma vez que Spa é um importante fator de virulência da *S. aureus*, foi investigada a capacidade do 7G2 para neutralizar Spa e quebrar a proteção conferida a *S. aureus* da ação do sistema imunitário humano. Por último, a aplicabilidade do 7G2 como agente teranóstico foi validada através da sua conjugação com o IRDye 700DX. O imunoconjugado 7G2-700DX foto-ativado erradica completamente *S. aureus* incorporada num biofilme. Ao todo, os **Capítulos 4, 5 e 6** mostram que a aPDT com imunoconjugados foto-ativados específicos para determinadas bactérias, representa uma solução aliciante para a terapia antimicrobiana de infeções causadas por bactérias multirresistentes a fármacos.

Para complementar o portfólio de conjugados adequados para a aPDT de infeções bacterianas, tal como apresentado nesta tese, o **Capítulo 7** descreve um domínio de ligação celular (CBD), derivado de uma endolisina de fagos da *S. aureus*, que foi conjugado com o IRDye 700DX (CBD3-700DX). As endolisinas de fagos são produzidas durante o ciclo lítico de um fago para quebrar a proteção osmótica providenciada pelo peptidoglicano na parede celular bacteriana e, assim, destruir a célula bacteriana.²⁶ Notavelmente, estas hidrolases também podem ser aplicadas exogenamente como antimicrobianos com uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistência, quando comparadas com os bacteriófagos completos.²⁷⁻²⁹ As endolisinas estafilocócicas apresentam geralmente dois domínios catalíticos para a atividade enzimática e um CBD responsável pela elevada especificidade das respetivas espécies estafilocócicas.^{30,31} Mesmo em concentrações baixas, o conjugado CBD3-700DX deteta e destrói cargas elevadas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, após a foto-ativação. Uma vez que a *S. epidermidis* é uma das causas mais comuns de infeção de implantes médicos, devido à sua forte capacidade de formar biofilmes e colonizar biomateriais³², a capacidade do CBD3-700DX de destruir biofilmes formados por este agente patogénico foi avaliada. Na verdade, o CBD3-700DX após irradiação com luz vermelha destrói as camadas superiores de um biofilme composto por *S. epidermidis* e, por conseguinte, expõe o biofilme às terapias antibióticas e ao sistema imunológico do hospedeiro. Uma descoberta importante apresentada no **Capítulo 7** foi a capacidade do CBD3-700DX ser internalizado por células de mamíferos, capturar a bactéria *S. aureus* e destruí-la dentro das células hospedeiras após a foto-ativação. Embora se tenha observado alguma toxicidade para com as células HeLa infetadas, após o tratamento, este dano colateral pode ser vantajoso para erradicar totalmente as bactérias intracelulares persistentes, uma vez que estas ficarão expostas às defesas imunes inatas e adaptáveis do hospedeiro, assim como a quaisquer antibióticos coadministrados. Desta forma, os estudos relatados no **Capítulo 7** suportam que os

CBDs podem ser aplicados na construção de agentes específicos e eficazes para a aPDT para a eliminação dos agentes bacterianos multirresistentes a fármacos incorporados num biofilme e a nível intracelular.

Conclusão

Em suma, esta tese descreve o desenvolvimento e a testagem de diferentes abordagens que nos permitem aproximar, vários passos, da vitória da luta contra a resistência antimicrobiana. Estas abordagens giram em torno de um portfólio de novos conjugados para a aPDT. Os resultados mostram que a aPDT oferece várias vantagens. Em primeiro lugar, é altamente eficaz na morte de microrganismos particulares com uma baixa probabilidade de provocar resistência. Em segundo lugar, tem efeitos secundários mínimos para os tecidos hospedeiros e outros microrganismos não-alvo. Em terceiro lugar, os novos conjugados para a aPDT descritos nesta tese de doutoramento são capazes de destruir biofilmes e bactérias a nível intracelular. Além disso, todas estas moléculas podem não só ser aplicadas como agentes terapêuticos, mas também para diagnosticar infeções antes do tratamento. Por conseguinte, devem ser considerados agentes teranósticos, que são os fármacos do futuro. O uso de teranósticos irá reduzir, tremendamente, o tempo entre o diagnóstico e o tratamento de doenças, conduzindo a melhores resultados clínicos.

O próximo desafio desta investigação será introduzir estas moléculas desenvolvidas, assim como abordagens da aPDT, em contextos clínicos adequados e, especialmente, definir quais as combinações de moléculas-alvo e fotossensibilizadores que serão mais adequadas para a prevenção e tratamento de determinadas doenças infecciosas.

References

1. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg*. 1991;61(5):340–8.
2. Baskaran R, Lee J, Yang S. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater Res*. 2018;22:25.
3. Sharwani A, Jerjes W, Salih V, MacRobert AJ, El-Maaytah M, Khalil HS, *et al*. Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83(1):27–33.
4. Stájer A, Kajári S, Gajdács M, Musah-Eroje A, Baráth Z. Utility of photodynamic therapy in dentistry: Current concepts. *Dent J*. 2020;8(2):43.
5. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):755–67.
6. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, *et al*. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736–88.
7. Subramaniam G, Girish M. Antibiotic Resistance — A Cause for Reemergence of Infections. *Indian J Pediatr*. 2020;87(11):937–44.
8. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Br Med Bull*. 2015;116:105–13.
9. Escudeiro P, Pothier J, Dionisio F, Nogueira T. Antibiotic Resistance Gene Diversity and Virulence Gene Diversity Are Correlated in Human Gut and Environmental Microbiomes. *mSphere*. 2019;4(3):298190.
10. van Oosten M, Hahn M, Crane LMA, Pleijhuis RG, Francis KP, van Dijl JM, *et al*. Targeted imaging of bacterial infections: Advances, hurdles and hopes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(6):892–916.
11. Klausen M, Ucuncu M, Bradley M, Barattucci A, Bonaccorsi P. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 2020;25:5239.
12. Heuker M, Gomes A, van Dijl JM, van Dam GM, Friedrich AW, Sinha B, *et al*. Preclinical studies and prospective clinical applications for bacteria-targeted imaging: the future is bright. *Clin Transl Imaging*. 2016;4(4):253–64.
13. van Oosten M, Schäfer T, Gazendam JAC, Ohlsen K, Tsompanidou E, De Goffau MC, *et al*. Real-time *in vivo* imaging of invasive- and biomaterial-associated bacterial infections using fluorescently labelled vancomycin. *Nat Commun*. 2013;4:2584.
14. Schoenmakers JWA, Heuker M, López-Álvarez M, Nagengast WB, van Dam GM, van Dijl JM, *et al*. Image-guided *in situ* detection of bacterial biofilms in a human prosthetic knee infection model: a feasibility study for clinical diagnosis of prosthetic joint infections. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48:757–67.
15. Park HY, Zoller SD, Hegde V, Sheppard W, Burke Z, Blumstein G, *et al*. Comparison of two fluorescent probes in preclinical non-invasive imaging and image-guided debridement surgery of Staphylococcal biofilm implant infections. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–13.
16. Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJM, *et al*. Mapping the

- Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(3):755–88.
17. Ziebandt AK, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJJB, Arends JP, *et al.* Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics.* 2010;10(8):1634–44.
 18. Dreisbach A, Wang M, van der Kooi-Pol MM, Reilman E, Koedijk DGAM, Mars RAT, *et al.* Tryptic Shaving of *Staphylococcus aureus* Unveils Immunodominant Epitopes on the Bacterial Cell Surface. *J Proteome Res.* 2020;19(8):2997–3010.
 19. Romero Pastrana F, Thompson JM, Heuker M, Hoekstra H, Dillen CA, Ortines R V., *et al.* Noninvasive optical and nuclear imaging of *Staphylococcus*-specific infection with a human monoclonal antibody-based probe. *Virulence.* 2018;9(1):262–72.
 20. Zoller SD, Park HY, Olafsen T, Zamilpa C, Burke ZDC, Blumstein G, *et al.* Multimodal imaging guides surgical management in a preclinical spinal implant infection model. *JCI Insight.* 2019;4(3):e124813.
 21. Sheppard WL, Mosich GM, Smith RA, Hamad CD, Park HY, Zoller SD, *et al.* Novel *in vivo* mouse model of shoulder implant infection. *J Shoulder Elb Surg.* 2020;29(7):1412–24.
 22. Raineri EJM, Yedavally H, Salvati A, van Dijk JM. Time-resolved analysis of *Staphylococcus aureus* invading the endothelial barrier. *Virulence.* 2020;11(1):1623–39.
 23. Forsgren A, Quie PG. Effects of Staphylococcal Protein a on Heat Labile Opsonins. *J Immunol.* 2020;112(3):1177–80.
 24. Cruz AR, den Boer MA, Strasser J, Zwarthoff SA, Beurskens FJ, de Haas CJC, *et al.* Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(7):e2016772118.
 25. Kobayashi SD, DeLeo FR. *Staphylococcus aureus* protein A promotes immune suppression. *MBio.* 2013;4(5):4–6.
 26. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021;13(4):680.
 27. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, *et al.* Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage ϕ MR11. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1237–47.
 28. Cha Y, Son B, Ryu S. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. *Food Microbiol.* 2019;84:103245.
 29. Nakonieczna A, Cooper CJ, Gryko R. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(3):620–31.
 30. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins - Current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(4):480–7.
 31. Schmelcher M, Shen Y, Nelson DC, Eugster MR, Eichenseher F, Hanke DC, *et al.* Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. *J Antimicrob Chemother.* 2014;70(5):1453–65.
 32. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(1):73–98.

List of publications

Pereira PM, Silva S, **Bispo M**, Zuzarte M, Gomes C, Girão H, Cavaleiro JA, Ribeiro CA, Tomé JP, Fernandes R. Mitochondria-Targeted Photodynamic Therapy with a Galactodendritic Chlorin to Enhance Cell Death in Resistant Bladder Cancer Cells. *Bioconj Chem*. 2016; 27(11):2762-2769.

Bispo M, Pereira PMR, Setaro F, Rodríguez-Morgade MS, Fernandes R, Torres T, Tomé JPC. A Galactose Dendritic Silicon (IV) Phthalocyanine as a Photosensitizing Agent in Cancer Photodynamic Therapy. *Chempluschem*. 2018; 83(9):855-860.

Zoller SD, Park HY, Olafsen T, Zamilpa C, Burke ZD, Blumstein G, Sheppard WL, Hamad CD, Hori KR, Tseng JC, Czupryna J, McMannus C, Lee JT, **Bispo M**, Romero Pastrana F, Raineri EJ, Miller JF, Miller LS, van Dijl JM, Francis KP, Bernthal NM. Multimodal imaging guides surgical management in a preclinical spinal implant infection model. *JCI Insight*. 2019;4(3):e124813.

Reeßing F, **Bispo M**, López-Álvarez M, van Oosten M, Feringa BL, van Dijl JM, Szymański W. A Facile and Reproducible Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Conjugates with Small Targeting Molecules for Microbial Infection Imaging. *ACS Omega*. 2020;5(35):22071-22080. (**Chapter 2**)

Bispo M, Anaya-Sanchez A, Suhani S, Raineri EJM, López-Álvarez M, Heuker M, Szymański W, Romero Pastrana F, Buist G, Horswill AR, Francis KP, van Dam GM, van Oosten M, van Dijl JM. Fighting *Staphylococcus aureus* infections with light and photoimmunoconjugates. *JCI Insight*. 2020;5(22):e139512. (**Chapter 4**)

Park HY, Zoller SD, Hegde V, Sheppard W, Burke Z, Blumstein G, Hamad C, Sprague M, Hoang J, Smith R, Romero Pastrana F, Czupryna J, Miller LS, López-Álvarez M, **Bispo M**, van Oosten M, van Dijl JM, Francis KP, Bernthal NM. Comparison of two fluorescent probes in preclinical non-invasive imaging and image-guided debridement surgery of Staphylococcal biofilm implant infections. *Sci Rep*. 2021;11(1):1622.

Bispo M, Suhani S, van Dijl JM. Empowering antimicrobial photodynamic therapy of *Staphylococcus aureus* infections with potassium iodide. *J. Photochem. Photobiol*. 2021;225:112334. (**Chapter 5**)

Bispo M, van Dijl JM, Szymański W. Molecular photoswitches in antimicrobial photopharmacology. In: *Molecular Photoswitches – Chemistry, Properties, and Applications* by Pianowski ZL. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH. In press for 2022. ISBN-13: 978-3527347681. (**Chapter 1**)

Bispo M, Santos SB, Melo LDR, Azeredo J, van Dijl JM. Targeted antimicrobial photodynamic therapy of biofilm-embedded and intracellular staphylococci with a phage endolysin's cell binding domain. *Submitted for publication.* (**Chapter 7**)

López-Álvarez M, Streit E, **Bispo M**, du Teil Espina M, van Sorge NM, Romero Pastrana F, Bonarius HPJ, Elsinga GS, Kooi N, Groen H, Hertlein T, Ohlsen K, Buist G, van Dijl JM. *Staphylococcus aureus* exposure and elimination with a fully human Protein A-specific monoclonal antibody. *Submitted for publication.* (**Chapter 6**)

Bispo M, López-Álvarez M*, Reeßing F*, da Silva Ferreira AR, Feringa BL, van Dam GM, Buist G, van Oosten M, Szymański W, van Dijl JM. Targeted antimicrobial therapy of resistant Gram-positive bacteria with a photo-activatable vancomycin-phthalocyanine conjugate. *To be submitted for publication.* (**Chapter 3**)

Mekonnen SA, Tsompanidou E, de Jong A, Anaya-Sanchez A, Berentsen L, Raineri EJM, **Bispo M**, Palma Medina LM, Prajsnar TK, Meijer AH, Larsen AR, Westh H, Reder A, Mäder U, Friedrich AW, Völker U and van Dijl JM. Prolonged intra-neutrophil survival as an adaptive strategy of *Staphylococcus aureus* USA300 in the hospital environment. *To be submitted for publication.*

da Silva Ferreira AR, Simpson HL, **Bispo M**, Tissing WJE, Harmsen HJM, Wardill HR. *Blautia luti* supports the gastrointestinal microenvironment during chemotherapy by regulating the risk of mucosal injury and gastrointestinal symptoms. *To be submitted for publication.*

Biografia

Mafalda Bispo nasceu a 19 de agosto de 1992, em Matosinhos, cidade do norte de Portugal. Licenciou-se em Bioquímica na Universidade de Aveiro e especializou-se em Bioquímica Clínica, durante o mestrado. No último ano da sua licenciatura, teve o seu primeiro contacto com a terapia fotodinâmica (PDT) numa experiência de 3 meses de trabalho em laboratório para o desenvolvimento da sua monografia de final de curso, sob a supervisão do Prof. João Tomé. No mestrado, foi estudante do projeto Erasmus, na Universidade Autónoma de Madrid, em Espanha, durante 4 meses, no grupo de Nanociência e Materiais Moleculares do Prof. Tomás Torres, onde desenvolveu várias técnicas



em química orgânica na produção de compostos para a PDT. Depois de concluir o mestrado, em 2015, foi premiada com uma bolsa Marie Skłodowska-Curie por um ano no Instituto Federal de Investigação e Teste de Materiais em Berlim, na Alemanha, na divisão de Análise Ambiental, no grupo de investigação do Dr. Rudolf Schneider. Em colaboração com a Universidade de Aveiro e com a Associação para a Inovação e Investigação Biomédica sobre Luz e Imagem em Coimbra, Portugal, iniciou a sua experiência na produção e caracterização de anticorpos monoclonais e fármacos conjugados a anticorpos. Em 2017, iniciou a sua investigação doutoral, no âmbito do projeto Marie Skłodowska-Curie chamado Pronkjewail, no grupo de Bacteriologia Molecular do Prof. Jan Maarten van Dijl, no Centro Médico Universitário de Groningen, Países Baixos, que resultou na presente tese.

Biography

Mafalda Bispo was born on the 19th of August 1992 in Matosinhos, in the north of Portugal. She studied Biochemistry at the University of Aveiro and specialized in Clinical Biochemistry during her master's. In the last year of her bachelor's, she was introduced to photodynamic therapy (PDT) in her 3 months internship, under the supervision of Prof. João Tomé. During her master's, she was an Erasmus student at the Autonomous University of Madrid, Spain, for 4 months, in the Nanoscience and Molecular Materials group of Prof. Tomás Torres. During this time, she developed several skills in organic chemistry in the reduction of compounds for PDT. After graduating in 2015, she was



awarded with a Marie Skłodowska-Curie fellowship to work for one year at the Federal Institute for Materials Research and Testing in Berlin, Germany, in the Environmental analysis division, in the research group of Dr. Rudolf Schneider. In close collaboration with the University of Aveiro and the Association for Innovation and Biomedical Research on Light and Image in Coimbra, Portugal, she gained her experience with monoclonal antibodies and antibody drug conjugates production and characterization. In 2017, she started her PhD research, under the Marie Skłodowska-Curie co-funded project called Pronkjewail, in the Molecular Bacteriology group of Prof. Jan Maarten van Dijk, at the University Medical Center of Groningen, which resulted in the present thesis.

Aknowledgements - Agradecimentos

The present thesis was only possible to be achieved within these last almost 5 years, with the help and presence of several amazing people in my life. Either in an academic or in a personal way, these people played an important role in my life, and I will do my best to acknowledge them, the way they deserve.

I will start with my 1st promotor: **Jan Maarten**, I will never forget that second interview call with Go, in which I was running like crazy in my previous institute in Berlin to get the call in my office. During that call you two surprised me with such quick positive feedback on the position, and then explained that “well, this is the Dutch way of doing things”. I was so thankful to be given the opportunity of continuing working on Photodynamic therapy, even though I knew that starting microbiology would be a challenge for me. But you always helped me understanding the wonders of Microbiology with all the excitement that you always expressed when you talked about new projects. Moreover, I think jumping from a plane after you, during our skydiving lab outing in my first year, made me confident that I have chosen the right lab and supervisor. You involved me in lots of different projects, some that we couldn't finish, but others with surprisingly good outcomes, which resulted in this thesis. Doing all this different scientific research was sometimes overwhelming but nevertheless with always a lot of fun involved. I will also never forget all the fun we had in Nepal, also with **Rita**, which I am also very thankful for always being such a kind person and for hosting so many lab dinners in your home.

My 2nd promotor and co-promotor: **Go** and **Girbe**, thank you for the supervision and fruitful scientific discussions. **Go**, I am very thankful that you, together with Jan Maarten, believed in me and gave me the opportunity of doing this PhD at UMCG. Thank you also for the great BBQ that you and your wife hosted at your place. Many thanks **Girbe** for always sharing the enthusiasm that you shine when you talk about science, and for the great lab dinners that you hosted at your home.

During my second year I got the chance of starting a collaboration in one of the subgroups of **Prof. Ben Feringa**. I am very thankful for that, because it not only improved a lot my organic skills but also put a very good friend in my life, which later became my 3rd promotor. **Wiktor**, when I started in your lab, I have to say I was quite nervous that I couldn't meet the high standards of the group since I was not an expert in organic chemistry. But you were always very kind and patient with me and also taught me a lot. In 2019, we travelled together to a conference in Barcelona and that's when I started realising that I have made a great friend for life. When you became a professor, me and the girls spent a great time rehearsing for our surprise Spice girls performance for your party, and the best part was to see how happy you were afterwards. You are always a very good listener and when I am overthinking stuff, you always make me see the positive side of it and teach me how to put

things into perspective. Thus, thank you for all the great coffees and conversations we had and for all the friendship and guidance you give me.

The reading committee: Thank you very much, **Prof. Arnold Driessen**, **Prof. Yijin Ren** and **Prof. Sanjay Jain**, for taking time to read my thesis and most importantly for approving it, so that I can defend it and celebrate this great milestone in my life.

Most of the acquired knowledge that I applied during this PhD research was also thanks to my previous academic supervisors during my bachelor's and master's in Aveiro (Portugal), my Erasmus in Madrid (Spain), and during my research year at BAM, in Berlin (Germany). Thank you, **Prof. João Tomé**, **Dr. Rosa Fernandes**, **Prof. Tomás Torres** and **Dr. Rudolf Schneider**, for introducing and teaching me a lot about Photodynamic Therapy and for always being so kind to me. Obrigada, **Patrícia**, por me mostrares o que é ser uma boa investigadora e por me transmitires a paixão pela ciência e por criar um impacto nela.

My paranympths, **Rita**, **Lisanne** and **Marjolein**: thank you for organizing this event and for all the help, support and friendship through these years. I can never thank you enough! I am very lucky in having you 3 as my friends. Minha **Ritinha**, já sabes que não sou muito boa com palavras e nunca vou conseguir escrever aqui nem um terço do que tu representas para mim. Apareceste na minha vida há 5 anos atrás e instantaneamente percebi que íamos ser grandes amigas. Sempre foste muito genuína e leal e, acima de tudo, tens sido como uma irmã para mim (“sis from another mother”). E eu sei que aturar-me nem sempre é tarefa fácil, mas tu és das poucas pessoas que eu tenho que de facto me compreendem e me sabem acalmar quando eu preciso. Vivemos juntas, rimos juntas, choramos juntas, fofocamos juntas, dançamos juntas, e muitas mais coisas que me demoraria outra tese a escrever. Foste uma luz brilhante que me foi colocada no caminho e que eu nunca quero perder de vista. Vais levar comigo para a vida toda! **Lisanne**, dank je wel dat je zo’n fijn persoon bent die altijd anderen wilt helpen, zelfs als dat ten koste gaat van de tijd voor jezelf. Je bent enorm getalenteerd, creatief en bovenal erg fijn gezelschap en een goede vriendin. Ik ben enorm gelukkig met de omslag van deze thesis die jij voor mij ontworpen hebt! We hebben een fantastische tijd in Nepal gehad. Ik zal het eerste diner daar nooit vergeten waar jij zo dapper de spicy pepers probeerde, maar 5 seconden later spijt had van je besluit. We hebben ook de meest fantastische tijd in Groningen gehad bij het organiseren van Marjoleins PhD feest en met alle dansfeestjes waar we geweest zijn. Ik kan niet wachten om meer van zulke mooie herinneringen samen met je te maken. **Marjolein**, je bent echt een bright persoon! Je hebt het in je om een hele ruimte op te lichten met je aanwezigheid en ik heb altijd enorm veel lol met je. We hebben de beste diners in zowel jouw als mijn huis gehad, waarbij we altijd van elkaars traditionele Nederlandse of Portugese kookkunsten hebben genoten. Ik zal nooit de toewijding van **Tobias** bij het bereiden van mijn ‘Bacalhau à Brás’ vergeten. Je bent net zoals ik altijd in voor dansen en voor feesten, dus we hebben altijd veel plezier samen! Je organisatie-skills verbazen me elke dag en waren erg waardevol

bij het organiseren van deze thesis en de feestelijkheden rondom. Jij vult me daar absoluut op aan, en ik ben enorm dankbaar dat ik je in mijn leven heb.

My collaborators: **Prof. Knut Ohlsen** and **Tobias Hertlein**, thank you for receiving me in your lab in the University of Würzburg (Germany) to perform the mice infection studies. I learned a lot during that time. **Kevin Francis** and **Dr. Nick Bernthal**, thank you for giving me the opportunity to go for 2 weeks to UCLA to perform also some *in vivo* experiments. It was my first time in the US, and I had a great time there with you. **Kevin**, I am always amazed on how you can bring all your network together and create the most amazing projects out of it. It is truly inspiring. Thank you, **Dr. Nick** for taking me to my first baseball game with the lab group and for the cool Dodgers cap you gave me. **Chad** and **Kellyn**, thank you for always being so welcoming and kind to me during my stay and showing me great restaurants in Los Angeles. **Prof. Joana**, nós só nos vimos pessoalmente uma vez, mas após a sua vinda a Groningen, começou uma colaboração que originou um trabalho fabuloso. É claro que para mim é sempre um prazer colaborar com portugueses e com uma universidade portuguesa. **Friederike**, it was great to work with you and to have achieved one nice publication out of it and another one to come. You are a very sweet person and an amazing researcher. We also had a great time practicing for the Spice girls' performance and you were a beautiful Emma Bunton! **Marleen**, you always inspired me with your passion on infection imaging. Thank you for all the interesting and fruitful discussions during the Imaging meetings, which resulted in two amazing publications together. Thank you also for starting the Super Awesome Imaging Team!

The Molecular bacteriology (Molbac) group: I am really thankful for the nice introduction I got in the lab from **Francisco** and **Dennis** on the wonders of *Staphylococcus aureus*. I was also very happy to be sharing the office all these years with **Sjouke**. You are always willing to help, and you also give good advice. Of course, all the fun I had all these years inside and outside the lab couldn't be possible without the presence of amazing people in the group. Thank you, **Tim**, **Bimal** and **Marines** for taking me to my first night out in Groningen. **Tim**, you are an amazing researcher and a very good friend. We had a great time in Nepal together! **Bimal** and **Pragyi**, thank you for providing me one of the best trips of my life to Nepal. Your wedding was so beautiful and special, and I will always keep very good memories from it. **Marinesita**, mi compañera de bachata y salsa. We always have lots of fun together. We definitely know how to party! Your laugh is very contagious, and I am always in a good mood when I am around you. Our trip to Algarve together was amazing and you are a great travel companion. **Usma**, thank you for all your positivity and for the amazing food you cooked in our dinners. **Francis**, thank you for always being such a fun person to have around in the lab. Either with your singing skills with opera music, or with your way to escape situations by imitating the Zoidberg from Futurama. Also thanks for showing me how a true napolitano is. **Elisa**, thank you for all the nice research with did together in the lab. **Jorrit**, in the last year I got to know you better when we were preparing the cabaret of Marjolein and we had a great time doing it. You seem to be always in a good mood and with a smile in your face. Thank you to all the other **Molbac members**

for all the help in the lab and fun we had in the lab outings and SintaKlaas dinners.

My students: **Andrea, Renske** and **Sabrina**, you were all outstanding students, with which I had a great time teaching and collaborating. I think you are all going to be amazing researchers and I wish you all the success in your life.

Pronkjewail team: thank you for all the nice workshops, the laser tag day, and the nice dinners we had together.

My friends in Groningen: **Federica**, we had a great time living together for 1 year. You taught me how to cook the real Italian carbonara, and I will never forget our first meal in our place on top of cardboards in an unfurnished house. Those and many more, are all memories that I am going to take with me. **Juan Carlos** and **Feline**, you played also a major role in these years during my thesis because starting to dance at your school was exactly what I needed the most. Dancing is part of me and it's probably the only thing that makes me fully disconnect from work. Gracias and dank je wel for being the best professors. Maltinha tuga de Groningen, foi uma agradável surpresa conhecer uma comunidade tão grande de portugueses em Groningen. Obrigada, **Zé**, por seres o pai desta comunidade e proporcionares estes ajuntamentos que acabavam sempre em grandes jantaradas e noitadas. E claro que nunca faltou o nosso pezinho de dança. Nesta comunidade, tive a sorte de ter encontrado pessoas maravilhosas – **Ana, Pedro, Cindy, Cássia e Filipe. Ana e Pedro**, passamos grandes momentos juntos, desde os nossos jantarinhos, passeios pela Holanda, festas de Sinterklaas, de salsa, de Halloween e muitos mais momentos que estão para vir. Obrigada por serem quem são. **Arthur**, o brasuquinha, obrigada por teres aceitado seres o fotógrafo da minha defesa de doutoramento. Sei que o resultado final vai ser maravilhoso. Fazes uma excelente caipirinha e contigo tenho sempre conversas bastante interessantes. Estou desejava de ir ao Brasil conhecer o teu belo país.

My good old friends: **Inês e Margarida**, conheci-vos em Berlim e aí criamos uma amizade que eu vou preservar para toda a vida. Não podia ter tido melhores compinchas para partilhar momentos Berlines. Também tivemos as nossas jantaradas ao som da música pimba e a ver os melhores apanhados da TV portuguesa. Obrigada, meninas, por serem quem são. **Liliana**, a minha priminha pepsodent dos tempos de universidade, por muito que a distância nos separe e que só nos permita ver-nos uma a duas vezes ao ano, a nossa amizade vai sempre prevalecendo e parece sempre que a última vez que nos vimos foi na semana passada. Agora estás ainda mais longe, mas eu sei que nada irá mudar e que estarás sempre bem presente na minha vida. Obrigada, coração. **Johnny**, conhecemo-nos desde o secundário e foste sempre o mais divertido do grupo, mas também bastante companheiro e leal. Sei que tens um futuro promissor no stand-up comedy e espero poder assistir a um stand-up teu aqui na Holanda. **Rúben**, o que dizer do teu melhor amigo de 14 anos?

Obrigada por seres a pessoa única que és e me apoiares sempre que falamos, mesmo estando distantes. Sabes sempre dizer a coisa certa e fico sempre alegre quando falo contigo. Somos muito parecidos e com personalidades difíceis, mas de alguma maneira conseguimos arranjar um ponto de equilíbrio nos dois que combina muito bem. Vais ser sempre um pilar muito importante na minha vida.

Meus **sogrinhos**: Há quase 5 anos atrás, sei que vos “roubei” de certa forma o vosso filho para longe, mas também sei que vocês sabem o quanto felizes nós somos juntos, por isso espero já estar perdoada. Obrigada por todo o apoio que sempre me deram e por me tratarem como uma filha. Vocês são duas pessoas excecionais e eu não podia me sentir mais honrada por quererem vir assistir à minha defesa de doutoramento.

Mãe e pai, desde sempre me apoiaram em todos os meus objetivos e sempre me ajudaram a realizá-los. Obrigada por sempre acreditarem em mim e no meu valor e me darem asas para voar alto. Não podia estar mais grata por vos ter como pais e por todas as oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha vida, que me fizeram ser a pessoa que eu sou hoje. E fico muito feliz por vos poder dar mais este orgulho de concluir um doutoramento. Estar longe de vocês nem sempre é fácil, mas se eu souber que vocês estão felizes, eu fico feliz também. Adoro-vos!

Avó, infelizmente partiste há muito pouco tempo, mas sei que continuarás a cuidar de mim desde um sítio melhor, como sempre cuidaste. Sei também que terias muito orgulho nesta etapa da minha vida, por isso, esta tese é dedicada a ti.

Tiago, foste a pessoa que mais me aturou nestes anos, e que mais me apoiou incondicionalmente. Viemos juntos em 2017 para esta nova aventura na Holanda, e aqui começamos a construir a nossa vida. Adotamos 2 gatinhos, o **Marley** e o **Thor**, que são sempre uma alegria cá em casa. Tens sido um parceiro excepcional que torna os meus dias sempre mais alegres, mesmo quando eu estou com mau feitio. E sei que muitas vezes serviste de "saco de pancada" nas fases menos boas do meu doutoramento, mas foste sempre paciente e companheiro. Obrigada meu amor. Mal posso esperar pela próxima etapa das nossas vidas e por todas as que estão para vir até sermos velhinhos. Amo-te.

Mafalda Bispo

