



P. nigrella.

Plectasin og andre antimikrobielle peptider som nye antibiotika

Nye behandlingskoncepter, kommercielle incitamenter og nye typer af antibiotika er påkrævet. Antimikrobielle peptider som plectasin er et godt bud på sådanne nye typer af antibiotika.

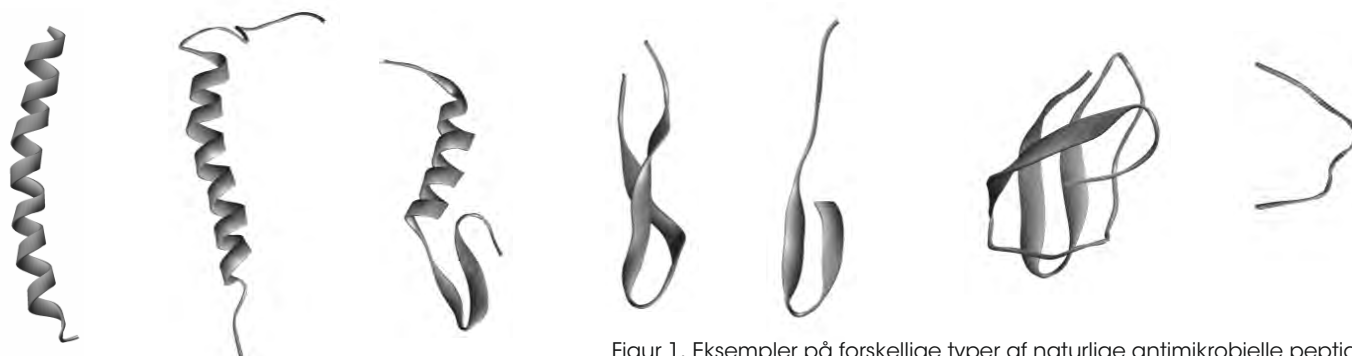
Af Hans-Henrik Kristensen, ph.d., Innovation Office, Novozymes A/S

Antibiotika, der først blev identificeret og udviklet i 1940-1950'erne, har siden reduceret den generelle dødelighed, reddet mio. af menneskeliv og tilladt komplekse medicinske procedurer som organtransplantation og aggressiv kræftbehandling. Kombinationen af misbrug/overforbrug, en decimeret antibiotika-pipeline og et mere komplekst regulatorisk og finansielt klima er måske ved at føre til enden på den antibiotiske

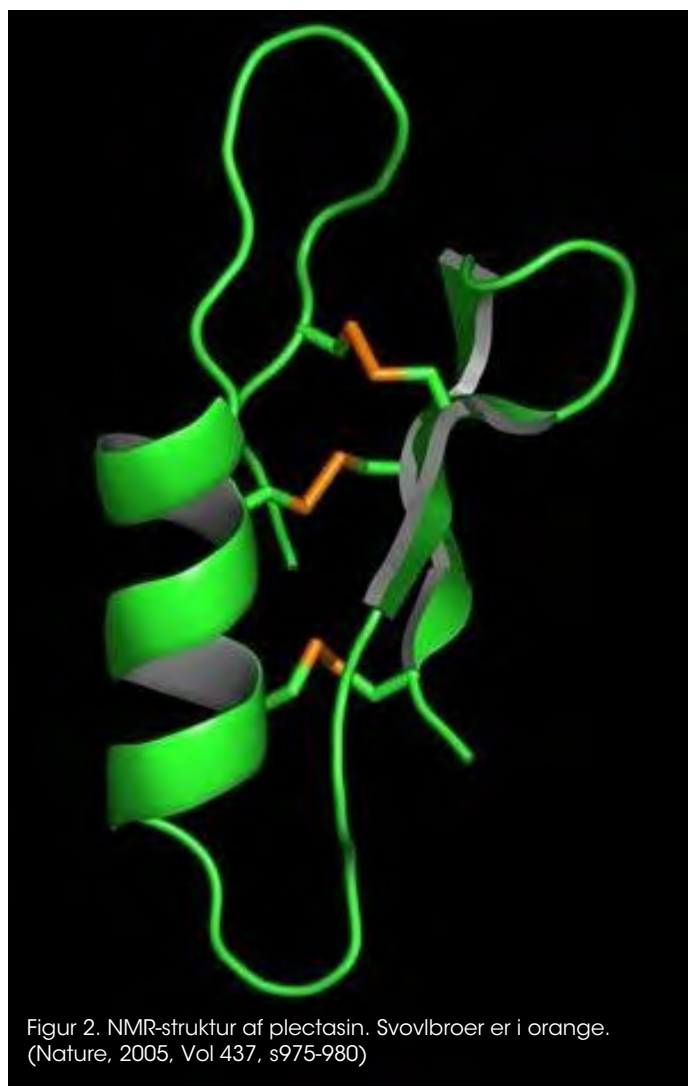
æra. Antimikrobielle peptider er måske et bud på en ny type antibiotika?

Resistensproblemet

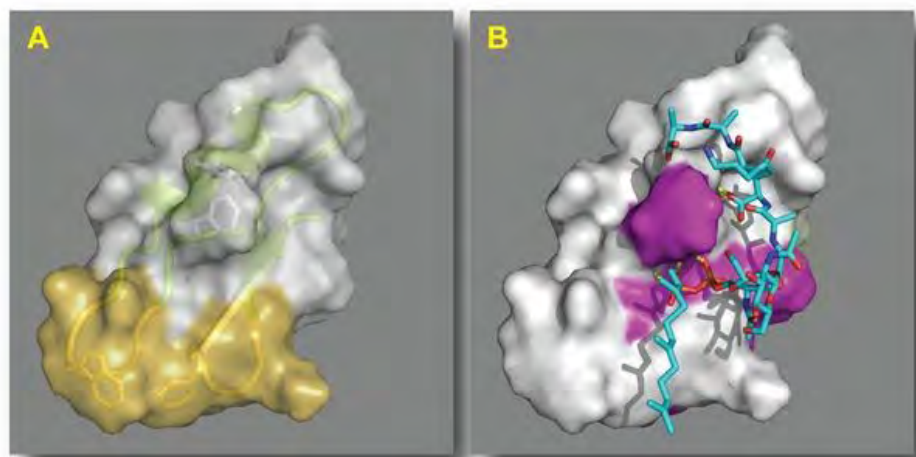
Fra 1940'erne og frem til i dag er mere end 100 forskellige antibiotika blevet udviklet og brugt til at bekæmpe infektioner i både mennesker og dyr. Hver enkelt af disse antibiotika hæmmer eller dræber bestemte typer af de sygdomsfremkaldende bakterier, som eksempelvis stafylokokker, streptokokker, colibakterier eller salmonella, men ikke alle typer af bakterier.



Figur 1. Eksempler på forskellige typer af naturlige antimikrobielle peptider.



Nogle bakterier er fra naturens hånd allerede resistente, mens andre bliver det gennem suboptimal brug af antibiotika. De resistente bakterier er et stort og voksende problem, og truer vores sundhed, da en del af selv simple infektioner ikke længere kan behandles. Et effektivt forsvar mod de sygdomsfremkaldende bakterier er en forudsætning for andre mere komplekse behandlinger.



Figur 3. NMR-baseret model af plectasin og plectasin-lipidIII kompleks (A) Aminosyrer (gule) der er foreslået at binde til bakteriemembranen. (B) Aminosyrer (lyseblå) der er foreslået at binde LipidIII (lyseblå). (Science, 2010, Vol 328, s. 1168-1172).

Behov for nye antibiotika

Nye antibiotika skal ideelt set have andre kemiske strukturer og virkningsmekanismer end de eksisterende antibiotika, da det vil tillade behandling af infektioner med resistente bakterier. Desværre er mange af de nyere klinisk benyttede antibiotika blot en svagt modificeret version af et eksisterende antibiotika, og de har derfor næsten samme egenskaber og virkningsmekanismer som de oprindelige. Bakterierne udvikler derfor hurtigt resistens mod de nyudviklede antibiotika.

Det bliver sværere og sværere at finde helt nye klasser af antibiotika med nye virkningsmekanismer. De antimikrobielle peptider (AMP'er), repræsenterer dog netop en sådan ny klasse af potentielle antibiotika.

Antimikrobielle peptider

De antimikrobielle peptider består som navnet antyder af en kort kæde af aminosyrer (typisk 10-80). De kan inddeles i forskellige klasser på baggrund af deres struktur og aminosyresammensætning.

De almindeligste klasser er defensiner (cystein-rige), alpha-helikale peptider og beta-sheet peptider (figur 1). AMP'erne er amfipatiske molekyler, dvs. at de indeholder både hydrofobe og hydrofile overflader. Pga. en overrepræsentation af aminosyrer som lysiner og argininer er de antimikrobielle peptider positivt ladede. Det muliggør binding til den negativt ladede bakteriemembran. Forskellige AMP'er kan have forskellige virkningsmekanismer – nogle laver huller i bakteriemembranerne, andre bruger membranen og cellevæggen som forankring til at hæmme cellulære reaktioner, mens andre igen transporteres gennem membranen for at udøve den antimikrobielle effekt i cellens cytoplasma.

Udfordringer

På trods af mange års forskning og udvikling på både universiteter, biotek-firmaer og store etablerede farmaceutiske virksomheder er antimikrobielle peptider ikke godkendt til brug som antibiotika i mennesker. Det skyldes, at mange af de antimikrobielle peptider kollektivt har en række ulemper:

- Mange af AMP'erne er for toksiske for både celler og hele organismer.
- Deres amfipatiske og stærkt positivt ladede egenskaber gør dem klæbende og kun lokalt aktive.
- Mange er uden struktur og bliver hurtigt nedbrudt i biologiske matricer, som f.eks. serum, og har en meget kort halveringstid i mennesker.

- De hæmmes af fysiologiske salt-koncentrationer (kationer som Na^+ , K^+ og især Mg^{2+} og Ca^{2+}).
- De er svære at producere syntetisk eller rekombinant til kommercielt relevante omkostninger.

SKANLAB

Retsch
Solutions in Milling & Sieving

www.retsch.dk
birte@skanlab.com

Bakteriestamme	Vancomycin MIC (mg/L)	Plectasin MIC (mg/L)	Plectasin NZ2114 MIC (mg/L)
MRSA (klinisk isolat)	1	32	1
MRSA (klinisk isolat)	1	16	1
MRSA (klinisk isolat)	1	16	1
MSSA (ATCC 29737)	0,5	8	1
MSSA (klinisk isolat)	0,5	1	0,5
VRSA (klinisk isolat)	>64	16	2
<i>S. pneumoniae</i> (ATCC700671)	0,25	0,25	0,06
<i>S. pyogenes</i> (ATCC12344)	0,38	0,06	0,12

Tabel 1. Antimikrobiel aktivitet af plectasin, NZ2114 og vancomycin mod en række forskellige Gram-positive isolater. MIC, minimal inhibitory concentration; MRSA, methicillin-resistent *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-sensitiv *Staphylococcus aureus*; VRSA, vancomycin-resistent *Staphylococcus aureus*.

Fund af plectasin

Det er dog ikke alle antimikrobielle peptider, der har ovennævnte begrænsninger, og et nyligt beskrevet eksempel er plectasin: et peptid af defensin-klassen. Det blev for første gang beskrevet af forskere fra Novozymes (NZ) i 2005.

Plectasin blev fundet nærmest ved et tilfælde, da NZ i sortbægersvampen (*Pseudoplectania nigrella*) ledte efter gener, der koder for specielle enzymer til brug i papir- og tekstilindustrien. Et af de fundne gener lignede overraskende nok et defensin-peptid, man tidligere havde isoleret fra insekter, edderkopper og skaldyr. Dels var det spændende at finde det første defensin i en svamp (siden hen har både NZ og andre forskere fundet en lang række af defensiner i svampe), og dels var det tankevækkende, at den seneste fælles stamfader mellem svampe, planter og insekter er mere end en mia. år gammel. Defensinerne er altså formodentlig evolutionært meget gamle molekyler, der stadig er bioaktive.

Plectasin

Plectasin består af 40 aminosyrer og er kun svagt positivt ladet ved neutral pH. Det indeholder 6 cysteiner, der tilsammen danner 3 svovlbroer. Den 3-dimensionelle struktur af plectasin er blevet løst med NMR, og peptidet folder op i en cystein-stabiliseret α -helix- β -sheet (CS $\alpha\beta$)-fold (figur 2).

Plectasin kan produceres i en række forskellige mikroorganismer, hvor det både processeres og folder op i den korrekte og naturlige struktur. Endvidere kan plectasin produceres i niveauer og til en pris, der er kommercielt relevant i Novozymes produktionsorganismer.

Den antimikrobielle aktivitet af plectasin er blevet testet mod en række relevante Gram-positive og Gram-negative bakterier. Plectasin virker kun mod de Gram-positive bakterier og har ingen effekt mod andre bakterier eller svampe. Ydermere er aktiviteten kun virkelig god mod streptokokker, og der skal høje doser til at slå f.eks. stafylokokker ihjel. Plectasin har altså et meget snævert antimikrobielt spektrum. Det kan på den ene side være positivt, da plectasin så ikke fører til resistens i andre typer af bakterier i eller på patienter, men på den anden side stiller det større krav til præcist at vide, hvilken type af bakterier der er skyld i infektionen.

Fra et firma-synspunkt er et bredere spektrum ofte ønskeligt,

da det betyder et højere antal patienter og dermed højere indtjening og dækning af de store udgifter forbundet med udvikling af lægemidlet.

Modsat mange andre antimikrobielle peptider bibeholder plectasin den antibiotiske aktivitet under fysiologiske betingelser. Det er selvfølgelig en nødvendighed, hvis peptidet skal bruges til behandling af systemiske infektioner i mennesker. Denne salttolerance kan formodentlig forklares med plectasins mere neutrale ladning samt dens specifikke virkningsmekanisme.

Novozymes har stor indsigt i at ændre egenskaberne af peptider, proteiner og enzymer ved at udskifte specifikke aminosyrer og dermed opnå molekyler med forbedrede egenskaber. For at forbedre den antimikrobielle aktivitet af plectasin mod især stafylokokker har virksomheden konstrueret og testet mere end 660.000 forskellige varianter af plectasin. Den antimikrobielle aktivitet af hver enkelt variant er testet, og de få bedste varianter med antimikrobiel aktivitet mod både stafylokokker og streptokokker udvalgt. De udvalgte varianter er efterfølgende blevet grundigt testet på en lang række parametre, såsom

antimikrobiel aktivitet, stabilitet, evnen til at kunne produceres rekombinant, toksicitet, resistensudvikling etc., og den samlede set bedste kandidat udvalgt. Det resulterede i en forbedret variant af plectasin kaldet NZ2114, der nu har høj aktivitet mod både stafylokokker og streptokokker (tabel 1).

Udfordringer omkring plectasin

En bekymring omkring antimikrobielle peptider er deres forholdsvis høje toksicitet. De fleste AMP'er virker på eller i cellemembraner, og alle celletyper og organismer har membraner, og kan derfor i princippet påvirkes af AMP'erne. Til stor overraskelse var plectasin (eller NZ2114) hverken hæmolytisk eller cytotoxisk i selv høje koncentrationer. Det skyldes, at plectasin modsat mange andre antimikrobielle peptider ikke har membranen som det primære mål. Derimod binder plectasin lipid II, en essentiel byggesten i bakteriernes cellevæg, og membran-bindingen benyttes formodentlig fortrinsvis til forankring (figur 3).

De førnævnte svovlbroer gør plectasin meget kompakt og modstandsdygtigt over for eksempelvis proteaser i serum, og er med til at give en fornuftig halveringstid i de dyr, hvori det er afprøvet (f.eks. mus). Er halveringstiden for kort kan plectasin ikke nå at udøve den antimikrobielle effekt og vil være uden virkning. Plectasin/NZ2114 er testet på en række forskellige infektionsmodeller som f.eks. blodforgiftning, lungebetændelse, hjerteklapsbetændelse og meningitis. I disse modeller kurerede NZ2114 infektionen, og oftest lige så godt eller bedre end de positive kontrol-antibiotika. Det gælder både streptokokker og stafylokokker.

Novozymes er verdensførende indenfor industrielle enzymer og mikroorganismer, men udvikler ikke lægemidler. Derfor har forretningsmodellen hele tiden været at finde en passende farmaceutisk partner til at varetage de kliniske fase I-, II- og III-studier. I 2008 blev plectasin/NZ2114 ud-licenseret til Sanofi, der arbejdede på projektet et par år, før et strategiskifte annullerede aftalen. Novozymes leder stadig efter en mulig partner til plectasin-projektet.

E-mail
Hans-Henrik Kristensen: hahk@novozymes.com