

DISS. ETH NO. 27505

# **Massively-parallelized discovery and optimization of antimicrobials**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**PHILIPP KOCH**

M.Sc., Technical University of Munich

born March 26<sup>th</sup>, 1990

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sven Panke (ETH Zurich, Switzerland), examiner

Dr. Martin Held (ETH Zurich, Switzerland), co-examiner

Prof. Dr. Urs Jenal (University of Basel, Switzerland), co-examiner

Prof. Dr. Jörn Piel (ETH Zurich, Switzerland), co-examiner

2021

## Abstract

The number of newly approved antimicrobial compounds has been steadily decreasing over the past 50 years emphasizing the need for novel antimicrobial substances. Besides, current antimicrobial therapies become increasingly ineffective due to the rapid spread of drug-resistant pathogens, and even the most potent small-molecule antibiotics may eventually fail to cure infections with highly resistant bacteria. Peptides are a promising class of potential drug substances, as they are still underexplored, offer high structural complexity, and at least partly cover the chemical space left open between biologics and small molecule drugs. Ribosomally produced antimicrobial peptides are of particular interest, as they already act as effective antimicrobials in the defense against invading pathogens of most organisms. Consequently, they are currently being investigated for potential use to fight infectious diseases in humans. The fact that antimicrobial peptides are produced using transcription and translation makes them particularly attractive as they can be produced recombinantly and their modification can be simply achieved by straightforward manipulation of the synthesis template at the DNA level.

In this thesis, we developed a high-throughput method for the discovery of antimicrobial peptides which is based on the principle of self-screening: Different peptides are expressed in a recombinant *Escherichia coli* strain, and their effect on growth rate is recorded. In our case, this is done by next-generation sequencing of expression plasmids in the bacterial culture, enabling the recording of massive numbers of growth curves for single strains in a single flask. We termed this technology massively parallelized growth assays (Me<sup>x</sup>). We applied this method to discover novel candidates for antimicrobial peptides by screening a library of ~12'000 naturally occurring peptides with a length between 5 and 42 amino acids and diverse properties. Analysis of thousands of growth curves allowed us to identify more than 1,000 previously unknown\* antimicrobials. Additionally, by incorporating the kinetics of growth inhibition, we were able to obtain a first indication of the mode of action, with important implications for the ultimate usefulness of the peptide in question. We chemically synthesized the most promising peptides of the screen and determined their activity when applied externally. Notably, the results indicated that 10 out of 15 investigated peptides efficiently eradicated bacteria at a minimal inhibitory concentration in the upper nM / lower μM range. We think that this work represents a step-change in the high-throughput discovery of functionally diverse antimicrobial peptides.

---

\*Not present on the antimicrobial peptide database

Next, we applied a simplified version of Me<sup>x</sup> to optimize a single antimicrobial peptide in high-throughput. As a model peptide, we optimized the 23 amino acid version of the well-researched and highly active antimicrobial peptide Bac7<sub>1-23</sub> using deep mutational scanning, consisting of a first random and then a semi-rational approach. The random library of ~600,000 different Bac7<sub>1-23</sub> variants allowed us to derive a fitness landscape of the peptide and to identify residues that are essential for growth inhibition and residues with potential for activity optimization. A smaller semi-rational library of ~160,000 Bac7<sub>1-23</sub> variants enabled us to extract the most beneficial amino acid combinations, thereby generating an antimicrobial peptide that, if synthesized chemically, is non-toxic and superior to Bac7<sub>1-23</sub> against a large panel of bacterial pathogens. We thus created a new-to-nature peptide lead with a great potential to be further developed in pre-clinical stages.

To our best estimation, these novel methods exceed competing approaches in terms of throughput, hit-rate and sensitivity, while also offering an opportunity for the direct functional characterization of large libraries. These methods will accelerate the discovery and optimization of antimicrobials drastically, and may thus provide a path forward to master one of today's most urgent challenges, the antimicrobial resistance crisis.

## Zusammenfassung

Die Anzahl neu zugelassener antimikrobieller Wirkstoffe ist in den letzten 50 Jahren stetig gesunken, was den Bedarf an neuen antimikrobiellen Substanzen verdeutlicht. Ausserdem werden derzeitige antimikrobielle Therapien immer ineffektiver aufgrund der schnellen Verbreitung antibiotika-resistenter Pathogene und selbst die wirkungsstärksten niedermolekularen Antibiotika könnten schlussendlich nicht mehr in der Lage sein, Infektionen mit hoch-resistenten Bakterien zu heilen. Peptide stellen eine vielversprechende Klasse möglicher Arzneimittelsubstanzen dar, da sie noch unerforscht sind, eine hohe strukturelle Komplexität aufweisen und zumindest teilweise den chemischen Raum zwischen Biologika und niedermolekularen Arzneimitteln ausfüllen. Vom Ribosom hergestellte antimikrobielle Peptide sind dabei von besonderem Interesse, da sie in den meisten Organismen schon zur Abwehr eintretender Pathogene als effektive antimikrobielle Agenzien wirken. Daher werden sie derzeit auf ihren potentiellen Nutzen im Kampf gegen Infektionskrankheiten im Menschen untersucht. Antimikrobielle Peptide gelten als besonders attraktiv da sie via Transkription und Translation hergestellt werden und sie somit rekombinant hergestellt werden und sie unkompliziert auf der Ebene des Synthese Musters, der DNA, modifiziert werden können.

In dieser Arbeit entwickelten wir eine Hochdurchsatzmethode für die Entdeckung von antimikrobiellen Peptiden, die auf dem Prinzip des „Selbst-Screenings“ basiert: verschiedene Peptide werden in einem rekombinanten *Escherichia coli* Stamm exprimiert und ihr Effekt auf die Wachstumsrate wird aufgezeichnet. In unserem Fall wurde diese Aufzeichnung mittels 'Next-Generation Sequencing' der Expressionsplasmide in der bakteriellen Kultur durchgeführt, was es ermöglicht, eine grosse Anzahl an Wachstumskurven einzelner Stämme in einer einzelnen Kulturflasche aufzuzeichnen. Wir nennen diese Technologie „massively parallelized growth assays“ (Me<sup>x</sup>). Wir verwendeten diese Methode um eine Bibliothek von ~12'000 natürlich vorkommenden Peptiden mit einer Länge zwischen 5 und 42 Aminosäuren und vielfältigen Eigenschaften zu screenen um neue Kandidaten für antimikrobielle Peptide zu entdecken. Die Analyse tausender Wachstumskurven erlaubte es uns, mehr als 1,000 bisher unbekannt<sup>†</sup> antimikrobielle Peptide zu identifizieren. Wenn wir zusätzlich die Kinetiken der individuellen Wachstumshemmung miteinbezogen, konnten wir zudem einen ersten Hinweis auf den jeweiligen Wirkmechanismus ableiten, was wichtige Implikationen für die endgültige Nutzbarkeit des jeweiligen Peptides beinhaltet. Wir synthetisierten die vielversprechendsten Peptide aus dem Screen chemisch und bestimmten ihre Aktivität bei

---

<sup>†</sup> Nicht vorhanden in der Datenbank 'antimicrobial peptide database'

Zugabe zu Bakterien von aussen. Bemerkenswerterweise deuteten unsere Ergebnisse darauf hin, dass 10 von 15 getesteten Peptiden Bakterien mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration im oberen nM / unterem  $\mu$ M Bereich abtöteten. Wir glauben, dass diese Arbeit einen Sprung in der Hochdurchsatzentwicklung von funktionell vielfältigen antimikrobiellen Peptiden darstellt.

Als nächstes verwendeten wir eine vereinfachte Variante von  $Me^x$ , um ein einzelnes antimikrobielles Peptid im Hochdurchsatz zu optimieren. Als ein Modell-Peptide optimierten wir die 23 Aminosäuren lange Version des stark beforschten und hochaktiven antimikrobiellen Peptids Bac7<sub>1-23</sub> zunächst mittels eines zufälligen und dann mittels eines halb-rationalen Ansatzes des „deep mutational scannings“. Die zufällig erzeugte Bibliothek aus ~600,000 verschiedenen Bac7<sub>1-23</sub> Varianten erlaubte es uns, eine Fitness-Landschaft des Peptides zu generieren und dabei einerseits Aminosäurereste zu identifizieren, die essential für die Wachstumsinhibition sind und andererseits Reste zu finden, die das Potential für eine Optimierung der Aktivität des Peptides haben. Eine kleinere, halb-rational designte Bibliothek von ~160,000 Bac7<sub>1-23</sub> Varianten ermöglichte es uns, die für die Aktivität des Peptides vorteilhaftesten Aminosäurekombinationen zu identifizieren und somit ein antimikrobielles Peptid zu generieren, das nach chemischer Synthese nicht toxisch gegenüber eukaryotischen Zellen ist und dem ursprünglichen Bac7<sub>1-23</sub> in der Abtötung einer grosse Liste an bakteriellen Pathogenen überlegen ist. Somit generierten wir eine bisher nicht in der Natur auftretende Peptid-Leitstruktur mit einem hohen Potential für eine Weiterentwicklung in präklinischen Phasen.

Unserer Einschätzung nach übertrumpfen diese neuartigen Methoden konkurrierende Ansätze im Hinblick auf Durchsatz, Treffer-Rate und Sensitivität und bieten zudem die Möglichkeit für eine direkte funktionelle Charakterisierung grosser Peptid-Bibliotheken. Diese Methoden werden die Entdeckung und Optimierung von antimikrobiellen Agenzien drastisch beschleunigen und können somit den Weg ebnen, um eine der dringlichsten Herausforderungen der heutigen Zeit, die Krise der antimikrobiellen Resistenz, zu bewältigen.