



**Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - Onlus**
fibrosicisticaricerca.it



Progetto FFC#15/2019

Terapie dell'infezione broncopolmonare

**Inibizione farmacologica della resistenza alla
colistina nei patogeni Gram-negativi della
fibrosi cistica**



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Fiorentina Ascenzioni
*Università La Sapienza, Roma,
Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin*

Partner: Francesco Imperi
Università Roma Tre, Dip. Scienze

Bruno Botta
*Università La Sapienza, Roma,
Dip. Chimica e Tecnologia del Farmaco*



Ricercatori coinvolti: 12



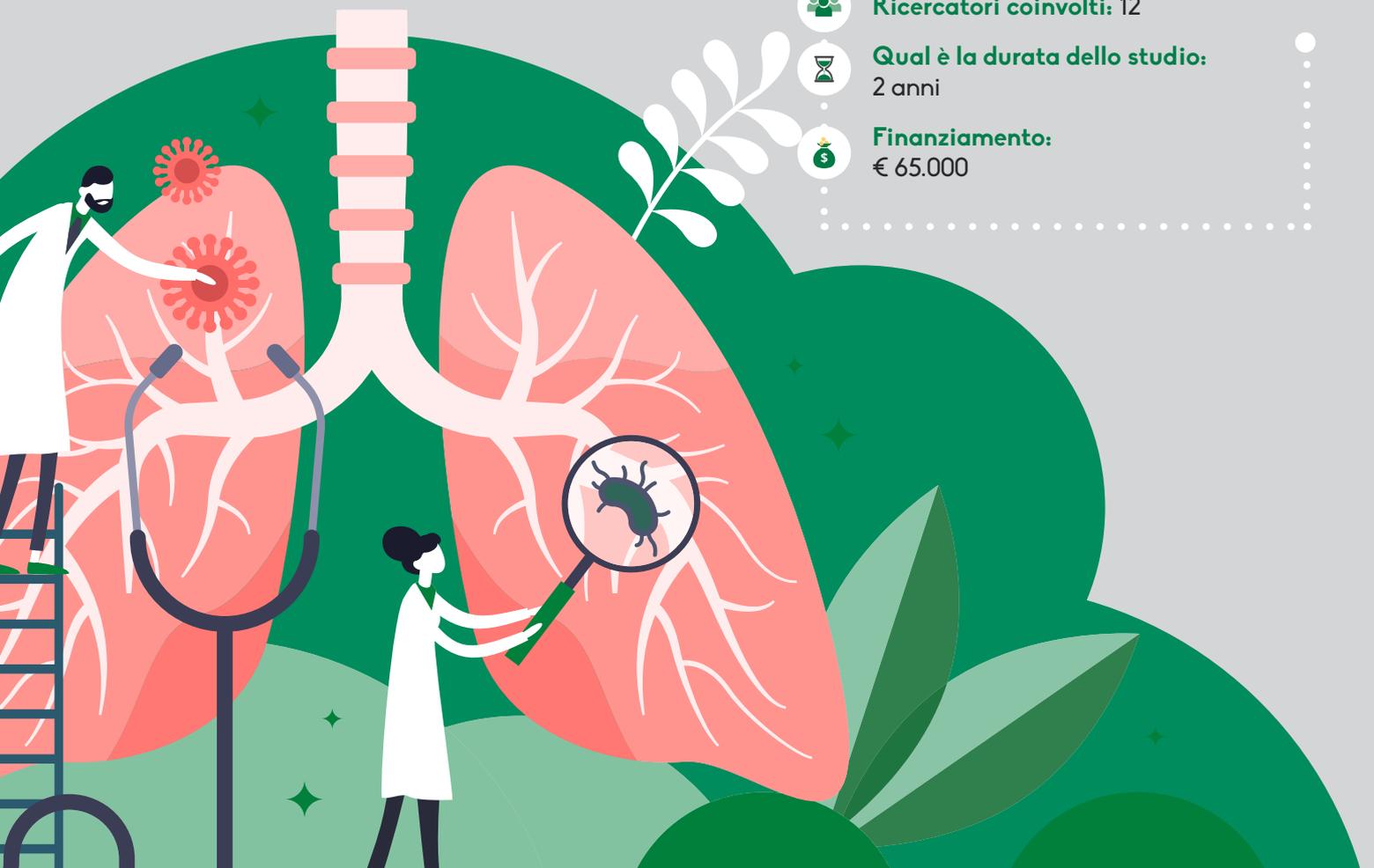
Qual è la durata dello studio:

2 anni



Finanziamento:

€ 65.000





Perché è importante

La resistenza agli antibiotici è un grave problema di sanità pubblica, che assume una particolare rilevanza nel trattamento dell'infezione polmonare in fibrosi cistica (FC). Proprio a causa della resistenza alla maggior parte degli antibiotici disponibili, alcuni batteri comuni in fibrosi cistica sono particolarmente difficili da combattere: tra questi c'è *Pseudomonas aeruginosa*. La ricerca scientifica è molto attiva nell'individuare nuove molecole, efficaci su batteri multiresistenti o capaci di inibire il meccanismo di resistenza.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Un antibiotico largamente usato in fibrosi cistica per il trattamento dell'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) è la colistina. Pa può sviluppare resistenza alla colistina modificando la struttura chimica della sua membrana esterna, rendendola così inattaccabile dall'antibiotico. Bloccando questo meccanismo di resistenza si potrebbe ripristinare l'attività della colistina. Da studi fatti in precedenza, i ricercatori hanno individuato dei composti naturali estratti dalla pianta cilena *Fabiana densa* variante *ramulosa* in grado di impedire ai batteri di modificare la propria membrana cellulare. Si è visto che cellule di *Pseudomonas aeruginosa*, a contatto con questi composti, perdono effettivamente la resistenza alla colistina e l'attività dell'antibiotico viene potenziata.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Attraverso simulazioni al computer e saggi biologici, i ricercatori hanno indagato l'attività di altri composti, derivati da quelli originari, per trovare la molecola più adatta all'uso clinico in grado di ripristinare la sensibilità alla colistina in *Pseudomonas aeruginosa* e altri batteri comuni in FC. I vari composti sono stati testati su cellule batteriche di *Pseudomonas aeruginosa* derivate da pazienti con fibrosi cistica e resistenti alla colistina, e su piccoli modelli animali infettati con gli stessi tipi di batteri.



Che cosa hanno ottenuto

È stato identificato un particolare composto inibitore del meccanismo di resistenza che, aggiunto alla colistina e messo a contatto con batteri colistina-resistenti, rende i batteri incapaci di crescere. Il composto da solo non ha alcun effetto, a dimostrazione che la sua azione è effettivamente quella di rendere nuovamente attiva la colistina contro un batterio altrimenti resistente. Per questo motivo il composto viene definito "adiuvante della colistina".



Che cosa succederà ora

La colistina è attualmente uno dei pochissimi antibiotici disponibili per combattere *P. aeruginosa* multiresistente. I risultati ottenuti sono rilevanti per il mantenimento dell'attività antimicrobica dell'antibiotico. Inoltre, grazie agli studi sulla struttura chimica del composto inibitore, sarà possibile produrre migliori adiuvanti della colistina anche da un punto di vista farmacologico.

Per saperne di più



Obiettivi

Ricerca di un composto per ripristinare l'efficacia dell'antibiotico colistina in ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* divenuti resistenti.

La resistenza agli antibiotici è un grave problema di sanità pubblica, che assume una particolare rilevanza per i pazienti affetti da fibrosi cistica. L'antibiotico colistina è largamente usato in questa malattia per il trattamento dell'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Il batterio può sviluppare resistenza alla colistina modificando la struttura chimica della sua membrana esterna e rendendola inattaccabile dall'antibiotico. L'idea dei ricercatori è che, bloccando questo meccanismo di resistenza, si può ripristinare l'attività della colistina. Hanno perciò selezionato, da una libreria (gruppo) di composti naturali, una molecola che impedisce la modifica della membrana cellulare da parte dei batteri e l'hanno sperimentata in ceppi (tipi) di Pa resistenti alla colistina. È stato visto che i ceppi di Pa perdevano effettivamente la resistenza e l'attività dell'antibiotico veniva potenziata. L'obiettivo del progetto è indagare l'attività di altri composti derivati dalla molecola originale, cercando il composto ottimale attraverso test su vari ceppi di Pa resistenti alla colistina, derivati da pazienti con fibrosi cistica, e su piccoli modelli animali infettati con gli stessi ceppi di Pa. Il fine ultimo è trovare un composto adatto all'uso clinico in grado di ripristinare la sensibilità alla colistina da parte di *Pseudomonas aeruginosa* ed eventualmente anche di altri batteri comuni in FC.



Risultati

Identificato un composto naturale in grado di ripristinare l'attività della colistina: punto di partenza per produrre adiuvanti più efficaci per combattere le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*.

La colistina è un antibiotico usato per combattere le infezioni da batteri multiresistenti, incluso *Pseudomonas aeruginosa*. Per tale ragione, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) raccomanda un suo uso limitato al fine di contrastare il fenomeno dell'antibiotico resistenza la cui insorgenza sta rapidamente aumentando.

In precedenza, il gruppo di ricerca ha identificato alcuni inibitori del meccanismo molecolare alla base della resistenza antibiotica. Tali inibitori sono capaci di ripristinare l'attività della colistina in ceppi di *P. aeruginosa* colistina-resistenti (in grado di crescere in presenza di colistina). Negli studi sono stati usati opportuni modelli di interazione molecolare in silico (cioè basati sull'uso di simulazioni al computer) e saggi biologici. Tra gli inibitori identificati, c'è in particolare un composto naturale estratto dalla pianta cilena *Fabiana densa* variante *ramulosa*. Il composto è stato testato su un ceppo (tipo) batterico colistina-resistente. È stato osservato che, quando il composto naturale viene aggiunto alla colistina, il ceppo batterico resistente diventa incapace di crescere e quindi muore. È stato anche visto che questo composto da solo non ha alcun effetto, il che dimostra come la sua azione sia effettivamente quella di rendere nuovamente attiva la colistina contro un batterio altrimenti resistente. Per questo motivo il composto viene definito "adiuvante della colistina". Studiando questo composto, i ricercatori hanno identificato una struttura chimica di base che permetterà di produrre migliori adiuvanti della colistina anche da un punto di vista farmacologico. I risultati di questo progetto sono molto rilevanti per il mantenimento dell'attività antimicrobica della colistina che è attualmente uno dei pochissimi antibiotici disponibili per combattere *P. aeruginosa* multiresistente.

Publicazioni



A novel colistin adjuvant identified by virtual screening for ArnT inhibitors, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 75, Issue 9, Settembre 2020

J Antimicrob Chemother 2020; **75**: 2564–2572
doi:10.1093/jac/dkaa200 Advance Access publication 8 June 2020

**Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy**

A novel colistin adjuvant identified by virtual screening for ArnT inhibitors

**Francesca Ghirga^{1,†}, Roberta Stefanelli^{2,3,†}, Luca Cavinato², Alessandra Lo Sciuto³, Silvia Corradi^{1,4},
Deborah Quaglio⁴, Andrea Calcaterra⁴, Bruno Casciaro¹, Maria Rosa Loffredo⁵, Floriana Cappiello⁵,
Patrizia Morelli⁶, Alberto Antonelli^{7,8}, Gian Maria Rossolini^{7,8}, Marialuisa Mangoni⁵, Carmine Mancone⁹,
Bruno Botta⁴, Mattia Mori^{10,‡}, Fiorentina Ascenzioni ^{2,*‡} and Francesco Imperi³**

¹Center for Life Nano Science@Sapienza, Italian Institute of Technology, Rome, Italy; ²Department of Biology and Biotechnology Charles Darwin, Sapienza University of Rome, Laboratory affiliated to Pasteur Italia-Fondazione Cenci Bolognetti, Rome, Italy; ³Department of Sciences, 'Department of Excellence 2018–2022', Roma Tre University, Rome, Italy; ⁴Department of Chemistry and Technology of Drugs, 'Department of Excellence 2018–2022', Sapienza University of Rome, Rome, Italy; ⁵Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Laboratory affiliated to Pasteur Italia-Fondazione Cenci Bolognetti, Rome, Italy; ⁶Microbiology Laboratory, Giannina Gaslini Institute, Genoa, Italy; ⁷Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Florence, Italy; ⁸Clinical Microbiology and Virology Unit, Florence Careggi University Hospital, Florence, Italy; ⁹Department of Molecular Medicine, 'Department of Excellence 2018–2022', Sapienza University of Rome, Rome, Italy; ¹⁰Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, 'Department of Excellence 2018–2022', University of Siena, Siena, Italy

*Corresponding author. E-mail: fiorentina.ascenzioni@uniroma1.it

†These authors equally contributed to the work.

‡These authors contributed equally to the work.

Funding

This work was supported by the Pasteur Institute-Cenci Bolognetti Foundation, by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (grant FFC#15/2019), by the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) PRIN 2017 (prot. 2012WJSX8K), by Sapienza University of Rome (grant RM11916B885E57B66) and by the Excellence Departments grant from MIUR (Art. 1, commi 314–337 Legge 232/2016) to the Department of Science of the Roma Tre University, the Departments of Chemistry and Technology of Drugs and of Molecular Medicine of the Sapienza University of Rome, and the Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy of the University of Siena.

Pubblicazioni



ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors, *The Journal of Organic Chemistry*, Volume 85, Issue 16, Agosto 2020


 The Journal of Organic Chemistry



pubs.acs.org/joc

Article

ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors

Deborah Quaglio,[∞] Maria Luisa Mangoni,[∞] Roberta Stefanelli, Silvia Corradi, Bruno Casciari, Valeria Vergine, Federica Lucantoni, Luca Cavinato, Silvia Cammarone, Maria Rosa Loffredo, Floriana Capiello, Andrea Calcaterra, Silvia Erazo, Francesca Ghirga,* Mattia Mori,* Francesco Imperi, Fiorentina Ascenzioni, and Bruno Botta*


 Cite This: *J. Org. Chem.* 2020, 85, 10891–10901


 Read Online

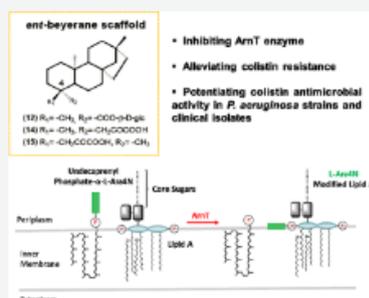
ACCESS |

 Metrics & More

 Article Recommendations

 Supporting Information

ABSTRACT: Colistin is a last-resort antibiotic for the treatment of multidrug resistant Gram-negative bacterial infections. Recently, a natural *ent*-beyerene diterpene was identified as a promising inhibitor of the enzyme responsible for colistin resistance mediated by lipid A aminoarabinylation in Gram-negative bacteria, namely, ArnT (undecaprenyl phosphate- α -4-amino-4-deoxy-L-arabinose arabinosyl transferase). Here, semisynthetic analogues of hit were designed, synthesized, and tested against colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains including clinical isolates to exploit the versatility of the diterpene scaffold. Microbiological assays coupled with molecular modeling indicated that for a more efficient colistin adjuvant activity, likely resulting from inhibition of the ArnT activity by the selected compounds and therefore from their interaction with the catalytic site of ArnT, an *ent*-beyerane scaffold is required along with an oxalate-like group at C-18/C-19 or a sugar residue at C-19 to resemble L-Ara4N. The *ent*-beyerane skeleton is identified for the first time as a privileged scaffold for further cost-effective development of valuable colistin resistance inhibitors.



ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Pasteur Institute-Cenci Bolognetti Foundation, by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (grant FFC#15/2019), and by the Excellence Departments grant from MIUR (Art. 1, commi 314–337 Legge 232/2016) to the Department of Science of the Roma Tre University, the Departments of Chemistry and Technology of Drugs of the Sapienza University of Rome, and the Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy of the University of Siena. This work was also partially supported by PON (Piano Operativo Nazionale) Grant ARS01_00432 PROGEMA, “Processi Green per l’Estrazione di Principi Attivi e la Depurazione di Matrici di Scarto e Non”, 03/2018-09/2020 and PRIN 2017—“Targeting Hedgehog pathway: Virtual screening identification and sustainable synthesis of novel Smo and Gli inhibitors and their pharmacological drug delivery strategies for improved therapeutic effects in tumors” by the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR), and a grant from Sapienza University (RM11816436113D8A). The authors thank the OpenEye Free Academic Licensing Program and the networking contribution by the COST Action CM1407 “Challenging Organic Syntheses Inspired by Nature—From Natural Products Chemistry to Drug Discovery”. The authors thank Dr. Patrizia Morelli (Microbiology Laboratory, Giannina Gaslini Institute, Genoa, Italy) for providing the *P. aeruginosa* clinical isolates.

Rendiconto economico



FFC#15/2019

Terapie dell'infezione broncopolmonare

Inibizione farmacologica della resistenza alla colistina nei patogeni Gram-negativi della fibrosi cistica

 Periodo: 01/09/2019 – 31/08/2021	
 Responsabile: Fiorentina Ascenzioni <i>Università La Sapienza, Roma, Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin</i>	
 Partner: Francesco Imperi <i>Università Roma Tre, Dip. di scienze</i> Bruno Botta <i>Università La Sapienza, Roma, Dip. Chimica e Tecnologia del Farmaco</i>	
 Grant assegnato:	€65.000
 Usato per:	
• Materiale di consumo	€38.575
• Borse di studio	€19.000
• Pubblicazioni scientifiche	€3.123
	€60.698
 Saldo (usato per altri progetti)	€4.302