



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

AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare



Progetto FFC#5/2022

Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Laurent Robert Chiarelli
(Laboratorio di Microbiologia molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologia "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia)



Partner: Fiorella Meneghetti (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano), **Sonia Covaceuszach** (Istituto di Cristallografia, CNR, Basovizza, Trieste)



Ricercatori coinvolti: 10



Qual è la durata dello studio: 2 anni

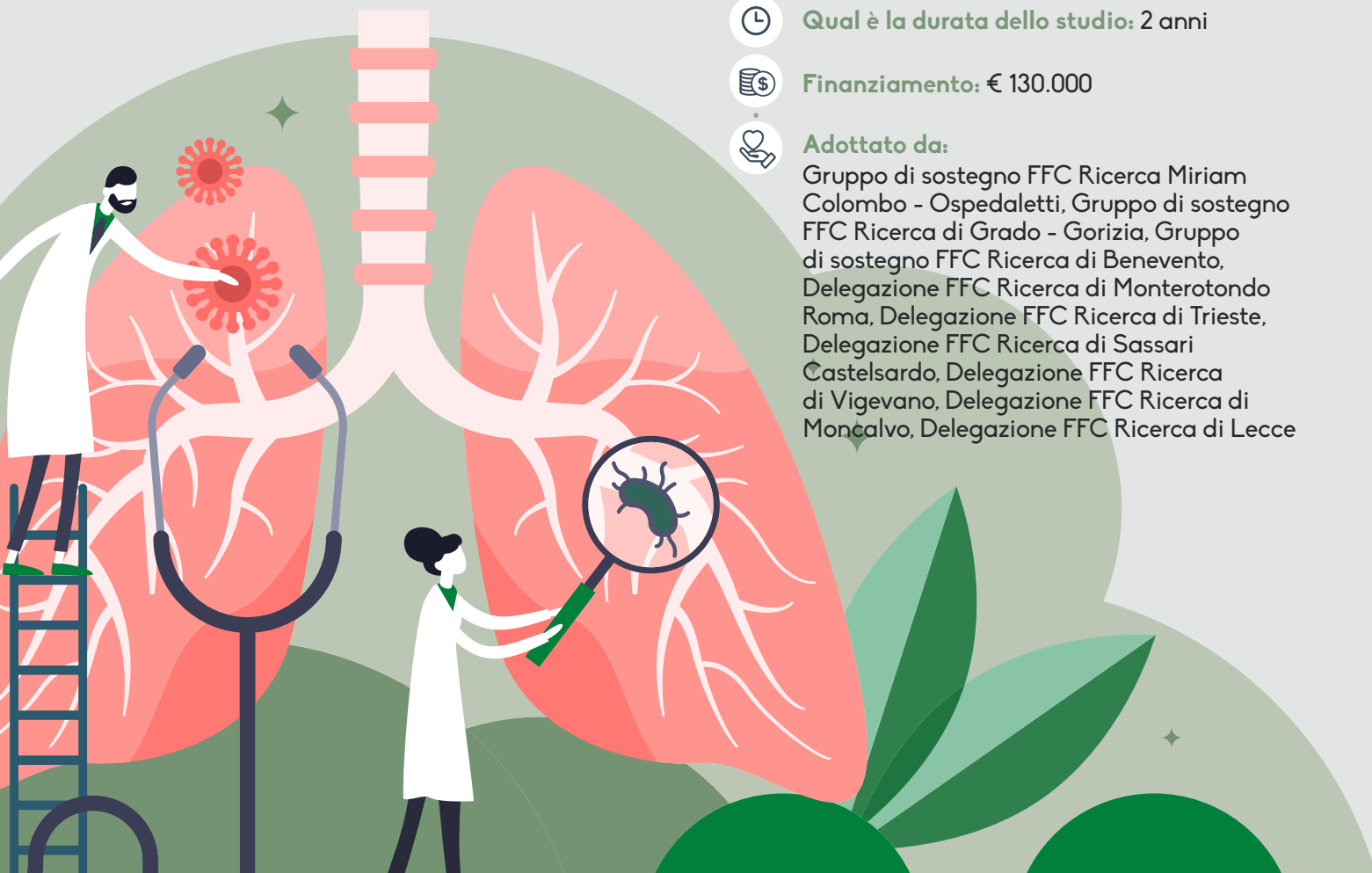


Finanziamento: € 130.000



Adottato da:

Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo - Ospedaletti, Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Grado - Gorizia, Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Benevento, Delegazione FFC Ricerca di Monterotondo Roma, Delegazione FFC Ricerca di Trieste, Delegazione FFC Ricerca di Sassari Castelsardo, Delegazione FFC Ricerca di Vigevano, Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo, Delegazione FFC Ricerca di Lecce





Perché è importante

Mycobacterium abscessus (Mab) può causare gravi infezioni nelle persone con fibrosi cistica ed è resistente a molti farmaci, per cui sono necessarie nuove strategie per contrastarlo. Un approccio promettente è la terapia anti-virulenza, cioè l'uso di composti che non uccidono i patogeni, ma impediscono loro di attaccare l'ospite, riducendo lo sviluppo di resistenza al farmaco.

L'acquisizione del ferro è cruciale per la crescita e la virulenza di Mab: ciò avviene grazie a molecole prodotte dal batterio chiamate siderofori. Il progetto si proponeva di sviluppare inibitori dell'assorbimento del ferro in *Mycobacterium abscessus* aventi come bersaglio proprio i siderofori.



Che cosa hanno usato i ricercatori

I ricercatori hanno individuato come possibile bersaglio l'enzima salicilato sintasi (SaS), contenuto nei batteri e responsabile della prima fase della produzione dei siderofori. Attraverso saggi *in vitro* e metodi di modellizzazione e simulazione al computer (*in silico*) sono state sviluppate molecole in grado di inibire questa via biosintetica.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

I ricercatori hanno studiato la struttura tridimensionale di SaS, grazie alla quale hanno vagliato *in silico* migliaia di molecole, al fine di individuare le strutture chimiche che meglio potessero legarsi all'enzima interferendo con la sua attività.

Hanno quindi sintetizzato le migliori molecole, e valutato la loro attività con metodi biochimici e biofisici. Infine, le molecole più efficaci sono state valutate per la loro capacità di interferire con il metabolismo del ferro nei micobatteri.



Che cosa hanno ottenuto

È stata chiarita la struttura dell'enzima batterico SaS e ciò ha permesso di identificare, con simulazioni virtuali, differenti composti, appartenenti a diverse classi chimiche, capaci di inattivare l'enzima. Alcune tra queste molecole hanno mostrato anche la capacità di interferire con l'approvvigionamento del ferro in colture *in vitro* di micobatteri.



Che cosa succederà ora

Questo progetto ha portato all'identificazione di molecole che interferiscono con i meccanismi di assorbimento del ferro di Mab, ponendo le basi per lo sviluppo di una nuova strategia anti-virulenza. Le migliori saranno ora sottoposte a processi di ottimizzazione per migliorarne l'attività.

Per saperne di più



Obiettivi

Sviluppo e analisi di composti per bloccare la virulenza del batterio *Mycobacterium abscessus* interferendo con il metabolismo del ferro

Il progetto ha l'obiettivo di identificare strategie alternative per combattere le infezioni causate dai micobatteri non tubercolari (MNT), in aumento tra le persone con fibrosi cistica. Fra i micobatteri non tubercolari, quello che si sta maggiormente diffondendo è *Mycobacterium abscessus* (Mab). Mab è resistente a molti farmaci, per cui le cure farmacologiche diventano spesso molto lunghe e non sono sempre efficaci: un eventuale esito negativo è associato a un rapido declino delle funzioni polmonari.

Con questo progetto i ricercatori si propongono di sviluppare molecole con attività anti-virulenza, capaci di bloccare l'infezione senza indurre resistenza nei batteri. Tra i composti anti-virulenza per Mab, particolarmente promettenti sembrano essere quelli che interferiscono con il metabolismo del ferro. Il ferro è un metallo essenziale per l'infezione batterica che viene catturato dall'ambiente grazie a molecole presenti nei batteri chiamate siderofori. Tra gli enzimi coinvolti nella sintesi di questi siderofori c'è la salicilato sintasi (SaS).

Il gruppo di ricerca ha già sviluppato dei composti in grado di inibire la salicilato sintasi di un micobatterio simile a Mab, chiamato *Mycobacterium tuberculosis*. Sulla base dei risultati ottenuti, e considerando le analogie tra *M. abscessus* e *M. tuberculosis*, i ricercatori intendono sviluppare molecole capaci di inibire la SaS di Mab. L'efficacia dei composti sarà testata su un enzima SaS appositamente prodotto e usato come modello sperimentale. Le molecole che mostreranno un'azione di inibizione dell'enzima verranno studiate per approfondire l'interazione tra composto e SaS e ottenere informazioni strutturali utili per la loro ottimizzazione. I composti più promettenti verranno sottoposti a una serie di analisi biochimiche, biofisiche, microbiologiche e tossicologiche necessarie all'ottenimento di nuovi potenziali farmaci.



Risultati

Individuata la struttura chimica di inibitori dell'enzima salicilato sintasi di *Mycobacterium abscessus*, per ridurre la virulenza del batterio

Mycobacterium abscessus (Mab) può causare gravi infezioni nelle persone con fibrosi cistica ed è resistente a molti farmaci, per cui sono necessarie nuove strategie per contrastarlo. Un approccio promettente è la terapia anti-virulenza, cioè l'uso di composti che non uccidono i patogeni, ma impediscono loro di attaccare l'ospite, riducendo lo sviluppo di resistenza al farmaco. L'acquisizione del ferro è cruciale per la crescita e la virulenza di Mab: ciò avviene grazie a molecole prodotte dal batterio chiamate siderofori. Il progetto si proponeva di sviluppare inibitori dell'assorbimento del ferro in *Mycobacterium abscessus* aventi come bersaglio proprio i siderofori.

I ricercatori hanno prodotto l'enzima di Mab salicilato sintasi (SaS), responsabile della prima fase della produzione dei siderofori, per vagliare e sviluppare molecole in grado di inibire la produzione dei siderofori attraverso saggi *in vitro* e metodi di modellizzazione e simulazione al computer (*in silico*).

Per prima cosa è stata studiata la struttura tridimensionale di SaS, grazie alla quale sono state vagliate *in silico* migliaia di molecole, al fine di individuare le strutture chimiche che meglio potessero legarsi all'enzima interferendo con la sua attività.

È stata chiarita la struttura dell'enzima batterico SaS e ciò ha permesso di identificare, con simulazioni virtuali, differenti composti, appartenenti a diverse classi chimiche, capaci di inattivare l'enzima.

I ricercatori hanno quindi sintetizzato le migliori molecole, e valutato la loro attività con metodi biochimici e biofisici, e le molecole più efficaci sono state valutate per la loro capacità di interferire con il metabolismo del ferro nei micobatteri. Alcune tra queste molecole hanno mostrato anche la capacità di interferire con l'approvvigionamento del ferro in colture *in vitro* di micobatteri.

Questo progetto ha portato all'identificazione di molecole che interferiscono con i meccanismi di assorbimento del ferro di Mab, ponendo le basi per lo sviluppo di una nuova strategia anti-virulenza. Le migliori saranno ora sottoposte a processi di ottimizzazione per migliorarne l'attività.

Pubblicazioni



Structural Basis for Specific Inhibition of Salicylate Synthase from *Mycobacterium abscessus* European Journal of Medicinal Chemistry, 2024

European Journal of Medicinal Chemistry 265 (2024) 116073



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech



Research paper

Structural basis for specific inhibition of salicylate synthase from *Mycobacterium abscessus*



Matteo Mori^{a,1}, Mario Cocorullo^{b,1}, Andrea Tresoldi^a, Giulia Cazzaniga^a, Arianna Gelain^a,
Giovanni Stelitano^b, Laurent R. Chiarelli^b, Martina Tomaiuolo^c, Pietro Delre^d, Giuseppe
F. Mangiatordi^d, Mariangela Garofalo^e, Alberto Cassetta^c, Sonia Covaceuszach^{c,*},
Stefania Villa^{a,*}, Fiorella Meneghetti^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via L. Mangiagalli 25, 20133, Milano, Italy

^b Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Via A. Ferrata 9, 27100, Pavia, Italy

^c Institute of Crystallography, National Research Council, Trieste Outstation, Area Science Park - Basovizza, S.S.14 - Km. 163.5, 34149, Trieste, Italy

^d Institute of Crystallography, National Research Council, Via G. Amendola 122/o, 70126, Bari, Italy

^e Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, via F. Marzolo 5, 35131, Padova, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Non-tuberculous mycobacteria
Mycobacterium abscessus
Siderophores
Chorismate
Salicylate synthase
Inhibition
Crystal structure
Cystic fibrosis

ABSTRACT

Blocking iron uptake and metabolism has been emerging as a promising therapeutic strategy for the development of novel antimicrobial compounds. Like all mycobacteria, *M. abscessus* (*Mab*) has evolved several countermeasures to scavenge iron from host carrier proteins, including the production of siderophores, which play a crucial role in these processes. In this study, we solved, for the first time, the crystal structure of *Mab*-SaS, the first enzyme involved in the biosynthesis of siderophores. Moreover, we screened a small, focused library and identified a compound exhibiting a potent inhibitory effect against *Mab*-SaS ($IC_{50} \approx 2 \mu M$). Its binding mode was investigated by means of Induced Fit Docking simulations, performed on the crystal structure presented herein. Furthermore, cytotoxicity data and pharmacokinetic predictions revealed the safety and drug-likeness of this class of compounds. Finally, the crystallographic data were used to optimize the model for future virtual screening campaigns. Taken together, the findings of our study pave the way for the identification of potent *Mab*-SaS inhibitors, based on both established and unexplored chemotypes.

Publicazioni



Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria Pharmaceutics, 2023



pharmaceutics



Article

Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria

Matteo Mori ^{1,†}, Giovanni Stelitano ^{2,†}, Giulia Cazzaniga ¹, Arianna Gelain ¹, Andrea Tresoldi ¹, Mario Cocorullo ², Martina Roversi ², Laurent R. Chiarelli ², Martina Tomaiuolo ³, Pietro Delre ⁴, Giuseppe F. Mangiatordi ⁴, Anna Griego ^{1,5}, Loris Rizzello ^{1,5}, Alberto Cassetta ³, Sonia Covaceuszach ^{3,*}, Stefania Villa ^{1,*} and Fiorella Meneghetti ¹

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via L. Mangiagalli 25, 20133 Milano, Italy

² Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Via A. Ferrata 9, 27100 Pavia, Italy

³ Institute of Crystallography, National Research Council, Trieste Outstation, Area Science Park-Basovizza, S.S.14-Km. 163.5, 34149 Trieste, Italy

⁴ Institute of Crystallography, National Research Council, Via G. Amendola 122/o, 70126 Bari, Italy

⁵ National Institute of Molecular Genetics (INGM), Via F. Sforza 35, 20122 Milano, Italy

* Correspondence: sonia.covaceuszach@ic.cnr.it (S.C.); stefania.villa@unimi.it (S.V.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Targeting pathogenic mechanisms, rather than essential processes, represents a very attractive approach for the development of new antimycobacterial drugs. In this context, iron acquisition routes have recently emerged as potentially druggable pathways. However, the importance of siderophore biosynthesis in the virulence and pathogenicity of *M. abscessus* (*Mab*) is still poorly understood. In this study, we investigated the Salicylate Synthase (SaS) of *Mab* as an innovative molecular target for the development of inhibitors of siderophore production. Notably, *Mab*-SaS does not have any counterpart in human cells, making it an interesting candidate for drug discovery. Starting from the analysis of the binding of a series of furan-based derivatives, previously identified by our group as inhibitors of MbtI from *M. tuberculosis* (*Mtb*), we successfully selected the lead compound **1**, exhibiting a strong activity against *Mab*-SaS (IC₅₀ ≈ 5 μM). Computational studies characterized the key interactions between **1** and the enzyme, highlighting the important roles of Y387, G421, and K207, the latter being one of the residues involved in the first step of the catalytic reaction. These results support the hypothesis that 5-phenylfuran-2-carboxylic acids are also a promising class of *Mab*-SaS inhibitors, paving the way for the optimization and rational design of more potent derivatives.

Keywords: antimicrobial resistance; cystic fibrosis; drug design; grating-coupled interferometry (GCI); homology model; siderophores



Citation: Mori, M.; Stelitano, G.; Cazzaniga, G.; Gelain, A.; Tresoldi, A.; Cocorullo, M.; Roversi, M.; Chiarelli, L.R.; Tomaiuolo, M.; Delre, P.; et al. Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria. *Pharmaceutics* 2023, 15, 502. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020502>

Academic Editor: Sandra N. Pinto

Publicazioni



Iron Acquisition and Metabolism as a Promising Target for Antimicrobials (Bottlenecks and Opportunities): Where Do We Stand? *International Journal of Molecular Sciences*, 2023



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Iron Acquisition and Metabolism as a Promising Target for Antimicrobials (Bottlenecks and Opportunities): Where Do We Stand?

Giovanni Stelitano ^{1,†}, Mario Cocorullo ^{1,†}, Matteo Mori ², Stefania Villa ², Fiorella Meneghetti ² and Laurent Roberto Chiarelli ^{1,*}

¹ Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Via A. Ferrata 9, 27100 Pavia, Italy

² Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via L. Mangiagalli 25, 20133 Milano, Italy

* Correspondence: laurent.chiarelli@unipv.it

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The emergence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) infections is one of the most crucial challenges currently faced by the scientific community. Developments in the fundamental understanding of their underlying mechanisms may open new perspectives in drug discovery. In this review, we conducted a systematic literature search in PubMed, Web of Science, and Scopus, to collect information on innovative strategies to hinder iron acquisition in bacteria. In detail, we discussed the most interesting targets from iron uptake and metabolism pathways, and examined the main chemical entities that exhibit anti-infective activities by interfering with their function. The mechanism of action of each drug candidate was also reviewed, together with its pharmacodynamic, pharmacokinetic, and toxicological properties. The comprehensive knowledge of such an impactful area of research will hopefully reflect in the discovery of newer antibiotics able to effectively tackle the antimicrobial resistance issue.

Keywords: antimicrobial resistance; virulence factors; metallostasis; immunity; siderophores



Citation: Stelitano, G.; Cocorullo, M.; Mori, M.; Villa, S.; Meneghetti, F.; Chiarelli, L.R. Iron Acquisition and Metabolism as a Promising Target for Antimicrobials (Bottlenecks and Opportunities): Where Do We Stand? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6181. <https://doi.org/10.3390/ijms24076181>

1. Introduction

The evolution and spread of antimicrobial resistance (AMR) have become major issues for global health and healthcare systems, causing almost 700,000 deaths/year. This number is expected to rise to 10 million by 2050, with an estimated cost for the global economy of 100 trillion dollars if no action is taken [1–21]. Furthermore, although several efforts have

Pubblicazioni



Phage Therapy: An Alternative Approach to Combating Multidrug-Resistant Bacterial Infections in Cystic Fibrosis

International Journal of Molecular Sciences, 2024



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Phage Therapy: An Alternative Approach to Combating Multidrug-Resistant Bacterial Infections in Cystic Fibrosis

Mario Cocorullo [†] , Giovanni Stelitano [†]  and Laurent Robert Chiarelli ^{*} 

Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Via A. Ferrata 9, 27100 Pavia, Italy; mario.cocorullo01@universitadipavia.it (M.C.); giovanni.stelitano@unipv.it (G.S.)

^{*} Correspondence: laurent.chiarelli@unipv.it

[†] These authors equally contributed to the work.

Abstract: Patients with cystic fibrosis (CF) are prone to developing life-threatening lung infections with a variety of pathogens that are difficult to eradicate, such as *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), *Hemophilus influenzae*, *Mycobacterium abscessus* (Mab), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. These infections still remain an important issue, despite the therapy for CF having considerably improved in recent years. Moreover, prolonged exposure to antibiotics in combination favors the development and spread of multi-resistant bacteria; thus, the development of alternative strategies is crucial to counter antimicrobial resistance. In this context, phage therapy, i.e., the use of phages, viruses that specifically infect bacteria, has become a promising strategy. In this review, we aim to address the current status of phage therapy in the management of multidrug-resistant infections, from compassionate use cases to ongoing clinical trials, as well as the challenges this approach presents in the particular context of CF patients.

Keywords: cystic fibrosis; bacterial infection; antimicrobial resistance; alternative strategies; phage therapy

Publicazioni



Improving Protection to Prevent Bacterial Infections: Preliminary Applications of Reverse Vaccinology against the Main Cystic Fibrosis Pathogens Vaccines, 2023



vaccines



Review

Improving Protection to Prevent Bacterial Infections: Preliminary Applications of Reverse Vaccinology against the Main Cystic Fibrosis Pathogens

Mario Cocorullo , Laurent R. Chiarelli  and Giovanni Stelitano * 

Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Via A. Ferrata 9,
27100 Pavia, Italy; mario.cocorullo01@universitadipavia.it (M.C.); laurent.chiarelli@unipv.it (L.R.C.)

* Correspondence: giovanni.stelitano01@universitadipavia.it

Abstract: Reverse vaccinology is a powerful tool that was recently used to develop vaccines starting from a pathogen genome. Some bacterial infections have the necessity to be prevented then treated. For example, individuals with chronic pulmonary diseases, such as Cystic Fibrosis, are prone to develop infections and biofilms in the thick mucus that covers their lungs, mainly caused by *Burkholderia cepacia* complex, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium abscessus* complex, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. These infections are complicated to treat and prevention remains the best strategy. Despite the availability of vaccines against some strains of those pathogens, it is necessary to improve the immunization of people with Cystic Fibrosis against all of them. An effective approach is to develop a broad-spectrum vaccine to utilize proteins that are well conserved across different species. In this context, reverse vaccinology, a method based on computational analysis of the genome of various microorganisms, appears as one of the most promising tools for the identification of putative targets for broad-spectrum vaccine development. This review provides an overview of the vaccines that are under development by reverse vaccinology against the aforementioned pathogens, as well as the progress made so far.



Citation: Cocorullo, M.; Chiarelli,

Keywords: reverse vaccinology; bacterial infection; cystic fibrosis

Publicazioni



Mycobacterium abscessus Infections in Cystic Fibrosis Individuals: A Review on Therapeutic Options

International Journal of Molecular Sciences, 2023



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Mycobacterium abscessus Infections in Cystic Fibrosis Individuals: A Review on Therapeutic Options

Deborah Recchia [†], Giovanni Stelitano [†], Alessandro Stamilla, Damaris L. Gutierrez, Giulia Degiacomi, Laurent R. Chiarelli and Maria Rosalia Pasca ^{*}

Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, 27100 Pavia, Italy

^{*} Correspondence: mariarosalia.pasca@unipv.it; Tel.: +39-0382-985576

[†] These authors equally contributed to the work.

Abstract: *Mycobacterium abscessus* is an opportunistic pathogen that mainly colonizes and infects cystic fibrosis patients' lungs. *M. abscessus* is naturally resistant to many antibiotics such as rifamycin, tetracyclines and β -lactams. The current therapeutic regimens are not very effective and are mostly based on repurposed drugs used against *Mycobacterium tuberculosis* infections. Thus, new approaches and novel strategies are urgently needed. This review aims to provide an overview of the latest ongoing findings to fight *M. abscessus* infections by analyzing emerging and alternative treatments, novel drug delivery strategies, and innovative molecules.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; alternative strategies; nitric oxide; phage therapy; antivirulence compounds; antimicrobial peptides; phytochemicals; drug delivery

Abstract presentati a congressi



- **Targeting iron acquisition in *M. abscessus*: a new strategy for the development of anti-virulence agents for cystic fibrosis patients**
17th European Young Investigator Meeting, Paris, France, 6-8 March 2024
- ***Mycobacterium abscessus* siderophores biosynthesis as target to inhibit the iron uptake mechanism**
SIMGBM 34rd Congress Microbiology 2023, Cagliari, Italy, 21-24 September 2023
- **Ironing out Fe^{3+} acquisition in *M. abscessus*: a new strategy to target virulence factors in non-tuberculous mycobacteria**
Merck Young Chemists "Symposium 2023" (MYCS 2023), Rimini, Italy, 13-15 November 2023

Rendiconto economico



AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare

Progetto FFC #5/2022

Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica



Responsabile:

Laurent Robert Chiarelli

(Laboratorio di Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia)



Periodo:

01/09/22 - 31/08/24



Grant assegnato:

€ 130.000,0



Usato per:

- Materiale di consumo € 84.583,2
- Spese viaggio/convegni € 1.536,1
- Borse di studio € 27.666,0
- Spedizioni € 1.604,0

€ 115.389,4



Saldo (usato per altri progetti):

€ 14.610,6