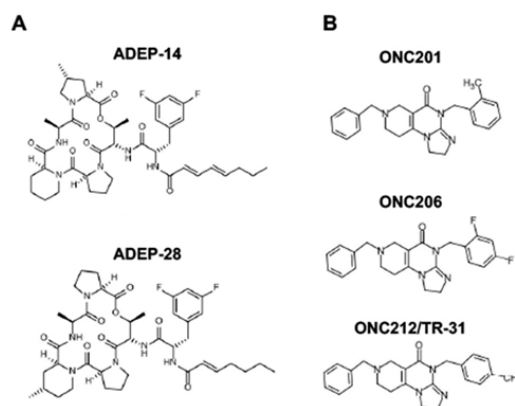


INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Los acildepsipéptidos (ADEP) y las imipridonas (ONC) se ha demostrado que presentan buena actividad in vitro e in vivo contra una amplia variedad de bacterias Gram + y Gram - pero, a pesar de tener valores de MIC interesantes, ninguno ha llegado por ahora a la fase clínica debido a una combinación de problemas de estabilidad, farmacocinética y síntesis deficiente.

Ambos han demostrado que funcionan a través de un nuevo mecanismo de acción basado en la activación de una serin proteasa llamada proteasa caseinolítica P (ClpP).



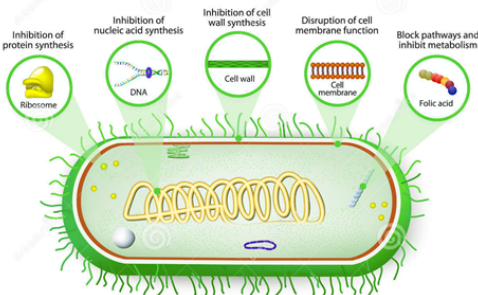
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



La aparición de los antibióticos en el siglo XX contribuyó a controlar las enfermedades infecciosas al disminuir la mortalidad, además, permitió el desarrollo de técnicas complejas como intervenciones quirúrgicas, quimioterapia o trasplantes.

En el año 2020 en España murieron 40000 personas a causa de la resistencia antimicrobiana, siendo un 39% de todas las infecciones bacterianas causadas por bacterias resistentes. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado la resistencia a los antimicrobianos (RAM) como una de las 10 principales amenazas a la salud pública.

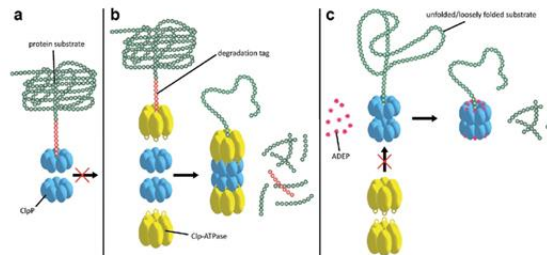
A pesar de que existen más de 100 tipos de antibióticos disponibles, la mayoría de ellos se dirigen a solo 5 o 6 procesos celulares, lo cual evidencia la necesidad de desarrollar mecanismos de acción novedosos para ayudar contra esta crisis.



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



La ClpP está formada por dos anillos heptaméricos apilados que se intercalan con dos anillos de chaperonas hexaméricas (como ClpX, ClpA, ClpC, ClpE o ClpY entre otros) formando un complejo que degrada a las proteínas dañadas o mal plegadas, siendo un papel fundamental para el mantenimiento del proteoma.



La función de la chaperona es unir y desplegar las proteínas no deseadas y guiarlas hacia el sitio catalítico de ClpP para su degradación. Sin la chaperona, que es dependiente de ATP, la ClpP tendría una capacidad de degradación limitada.

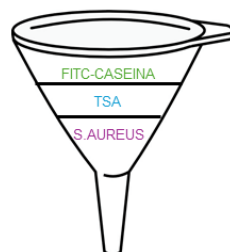
Cuando los ADEP o los ONC se unen a ClpP inducen cambios estructurales en la proteína que provocan la eliminación de las chaperonas, haciendo que se abra el poro central y de lugar a una proteólisis descontrolada que provoca una respuesta de estrés oxidativo en la célula que la conlleva a la muerte.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



El objetivo de FICIC es desarrollar compuestos novedosos que activen a la ClpP de *Staphylococcus aureus* denominada SaClpP. Todos estos compuestos son moléculas pequeñas, escalables sintéticamente, que tienen propiedades fisicoquímicas prominentes.

Para determinar cuáles de nuestros compuestos activan SaClpP, hemos realizado una serie de ensayos en cascada con dicha proteína que nos permitieron ir filtrando poco a poco nuestros compuestos para obtener aquellos con propiedades más alentadoras.



MATERIAL Y MÉTODOS FLUORESCENCIA



En primer lugar hemos desarrollado e implementado un sistema de cribado basado en ensayos de fluorescencia, lo cual nos ha permitido detectar rápidamente aquellos compuestos cuya actividad radica en la unión con SaClpP y nos permite descartar que sea por otra vía.

La FITC-caseína es un complejo formado por la unión de la caseína a muchas unidades FITC fluorescentes pero, debido a su proximidad, hacen que se genere un efecto quenching y que la señal que emita sea débilmente fluorescente.

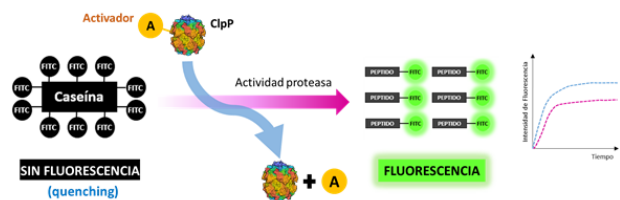
Sin embargo, cuando la SaClpP es activada es capaz de degradar la proteína caseína, por lo que al estar en su presencia hace que la señal aumente enormemente.

Ventajas

Tiene un alto rendimiento, bajo costo, es reproducible, fácil, rápido y no requiere equipo especializado.

Desventajas

Necesita proteína recombinante.



MATERIAL Y MÉTODOS TSA



Una vez pasado este primer filtro, hemos continuado realizando ensayos TSA con el que hemos podido validar los resultados obtenidos en los de fluorescencia y, además, nos han permitido saber cuáles de estos compuestos son los que se unen con mayor afinidad a SaClpP.

La SaClpP tiene una temperatura determinada de desnaturalización, pero al unirse a un hit aumenta, por lo que podremos conocer qué compuestos son los que mejor interactúan con ella.

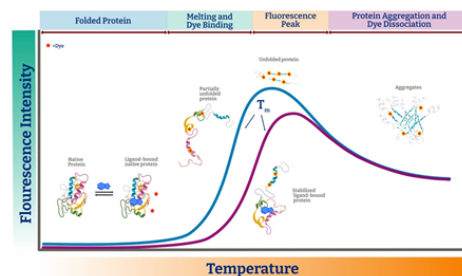
Se utiliza un colorante que tiene afinidad por regiones hidrofóbicas, de manera que cuando la proteína se desnaturaliza y su núcleo hidrofóbico queda expuesto, el tinte interactúa con él produciendo un aumento de la fluorescencia.

Ventajas

Es fácil, rápido, reproducible, con alto rendimiento, económico, consume cantidades muy pequeñas de muestra y no necesita un equipo especializado.

Desventajas

Necesita proteína recombinante.



MATERIAL Y MÉTODOS ENSAYO ANTIBACTERIANO



Ahora vamos a pasar a probar nuestros hits in vitro con la cepa de *S.aureus* sensible a la meticilina (MSSA) y la cepa resistente a la vancomicina (VISA) para ver si son capaces de atravesar las barreras físicas de la célula y conseguir llegar a su diana sin ningún problema, permitiéndonos así conocer su MIC y poder compararlo con los controles.

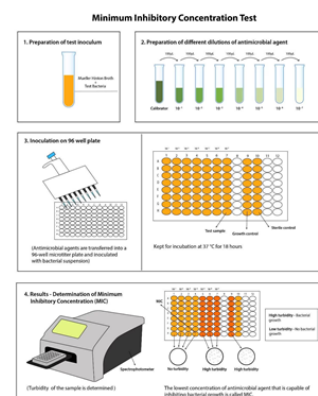
La bacteria se cultiva en presencia del hit durante 18h y, posteriormente, se lee la densidad óptica de la muestra en comparación con la de un control negativo (medio con bacteria) y un control positivo (antimicrobiano conocido). De este modo, si la turbidez es menor indicaría que ha reducido su crecimiento.

Ventajas

Fácil, barato, no necesita de equipo especializado.

Desventajas

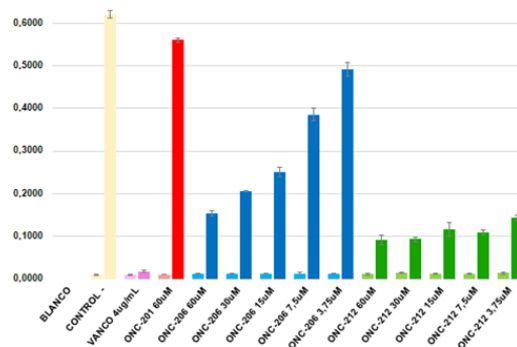
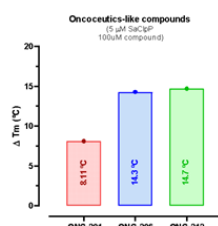
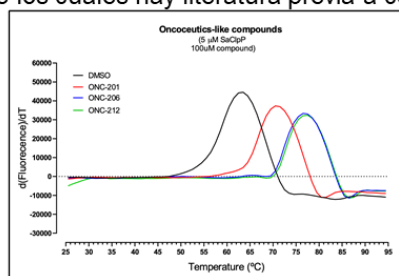
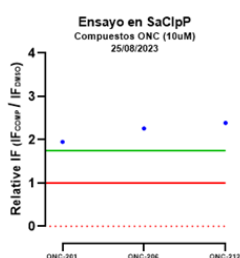
No es un mecanismo específico.



RESULTADOS VALIDACIÓN ONC



Todos los ensayos que hemos llevado a cabo han sido previamente validados con los compuestos ONC-201, ONC-206 y ONC-212, de los cuales hay literatura previa a cerca de su actividad sobre la proteasa SaClpP.

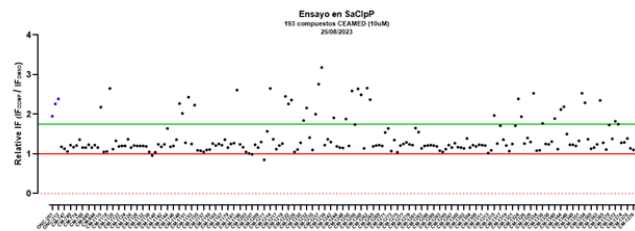
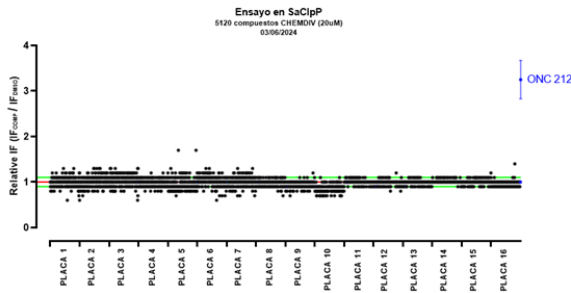


RESULTADOS FLUORESCENCIA



El ensayo de fluorescencia nos ha permitido analizar más de 10.000 compuestos de varias bibliotecas donde se identificaron 2 hits capaces de activar SaClpP.

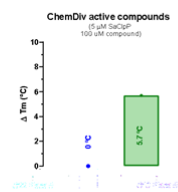
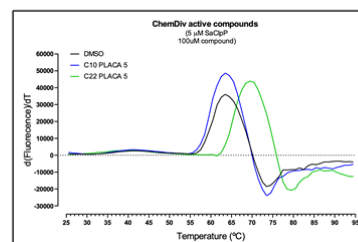
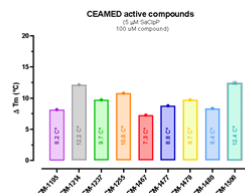
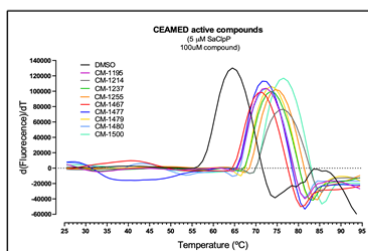
En paralelo, estudiamos una colección interna de activadores de HsClpP que reveló que muchos también pueden activar la variante SaClpP.



RESULTADOS TSA



Por otro lado, los ensayos de TSA nos han permitido corroborar los hits encontrados y seleccionar aquellos que presentan mayor afinidad por SaClpP, pudiendo destacar el CM-1195, CM-1214, CM-1237, CM-1255, CM-1467, CM-1477, CM-1479 y CM-1500 de nuestra biblioteca y el hit C22 de la biblioteca externa.

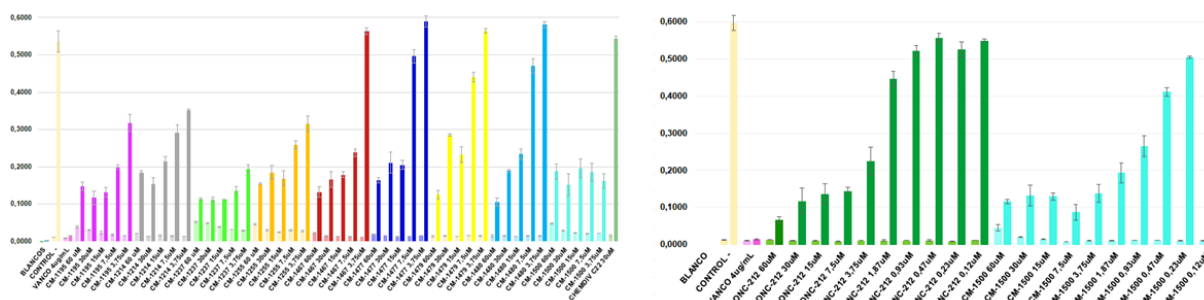


RESULTADOS ENSAYO ANTIBACTERIANO



Los hits seleccionados a través de los ensayos de fluorescencia y TSA son capaces de atravesar las barreras físicas de la célula y presentan un MIC igual o incluso más bajo que los de los compuestos ONC.

Un claro ejemplo de ello es el CM-1500 que ha sido analizado junto con el ONC-212 en un rango de concentraciones más amplio para poder ver mejor el efecto.



CONCLUSION



Hemos desarrollado un método interno rápido y robusto para identificar compuestos que activan SaClpP, donde cada uno de los ensayos que lo componen (fluorimetría, TSA y actividad en *Staphylococcus aureus*) presenta buena correlación con el resto. Cabe destacar que estos compuestos están siendo actualmente analizados en otras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes como la VISA.

Como plan de futuro nos gustaría analizar otras colecciones de compuestos para aumentar las posibilidades de identificar compuestos con actividades y perfiles farmacocinéticos clínicamente relevantes, además, queremos realizar modificaciones químicas de compuestos de FICIC que presenten algo de actividad para aumentar su potencia/selectividad y, también nos parecería interesante utilizar otras proteínas ClpP bacterianas (p. ej., SpClpP, AbClpP, EcClpP) para identificar activadores específicos de otras bacterias de importancia clínica.

AGRADECIMIENTOS



Este trabajo ha sido financiado en parte con subvenciones del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, nº. PLE2022-009507) y la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI; nº. SD-22/17). MACC y>NNL agradecen la subvención del Servicio Canario de Empleo que ha financiado el Programa Investigo, lo que ha permitido sus contrataciones a FICIC y CEAMED SA respectivamente (SCE nº. 38/2022-0201083143 y 60/1/2023-0207084648). HMES desea agradecer a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI; nº. IPI2021010038) que ha permitido su contratación en CEAMED SA.