



Esempio di piastra di isolamento

*Paolo Monciardini,  
Linda Cavaletti  
Vicuron  
Pharmaceuticals  
Gerenzano (VA)  
PMonciardini@vicuron.it*

## NUOVE FRONTIERE NELLA SCOPERTA DI PRODOTTI NATURALI

**I microrganismi hanno rappresentato e continuano a rappresentare un'importante sorgente di molecole con attività biologica. Per poter mantenere elevato il tasso di scoperta, è necessario riuscire ad analizzare una "fetta" della biodiversità differente da quella finora sfruttata.**

A questo proposito un importante contributo potrebbe venire da quell'ampia parte della popolazione microbica dimostrata esistere e che è stata fino ad oggi ritenuta "non coltivabile": la presenza in alcuni di questi ceppi di una serie di caratteristiche li indica come potenziali fonti di nuovi metaboliti di interesse industriale.

**U**no dei maggiori progressi compiuti dalla medicina nel ventesimo secolo è costituito dalla scoperta e dalla successiva applicazione clinica degli antibiotici. Dopo la scoperta dei primi antibiotici, prodotti da microrganismi, i metaboliti microbici sono stati oggetto di intense campagne di *screening* volte all'identificazione di sostanze con attività biologica. Oggi una gran parte delle sostanze biologicamente attive impiegate in campo clinico, agricolo o veterinario è costituita da prodotti del metabolismo secondario di microrganismi (o derivati semisintetici di questi metaboli-

ti). Le strutture complesse di molti metaboliti derivano da una serie di reazioni che coinvolgono numerosi enzimi, e non possono essere facilmente riprodotte attraverso sintesi chimiche in laboratorio. La ricerca di nuove molecole prodotte da microrganismi, quindi, continua a rivestire una notevole importanza nonostante il gran numero di metaboliti microbici scoperti. Due fattori principali contribuiscono alla crescente domanda di nuove entità chimiche dotate di attività biologica. Da un lato i progetti di sequenziamento di genomi forniscono informazioni che consentono di individuare nuovi *target* terapeutici, per i quali si ricer-

cano e sviluppano nuovi farmaci. Anche per indicazioni "vecchie", d'altro canto, c'è necessità di nuove molecole. Ad esempio, l'efficacia di molti degli antibiotici attualmente in commercio è continuamente ridotta in seguito alla comparsa ed alla rapida diffusione di ceppi patogeni resistenti ad una o più classi di molecole. Ne consegue che è necessario scoprire, sviluppare ed infine portare sul mercato nuovi antibiotici, possibilmente appartenenti a classi chimiche diverse da quelle attualmente utilizzate in clinica, che non siano sensibili ai meccanismi di resistenza sviluppati dai microrganismi patogeni.

## La biosintesi di metaboliti

La capacità di produrre metaboliti farmacologicamente attivi non è una caratteristica generale dei microrganismi, ma è limitata a pochi gruppi. In particolare i più prolifici produttori di molecole biologicamente attive sono alcuni gruppi di funghi filamentosi e - tra i batteri - gli Attinomiceti, in particolare il genere *Streptomyces*. L'industria farmaceutica ha per anni focalizzato la ricerca di metaboliti microbici proprio su questi gruppi, e si può stimare che diversi milioni di ceppi di *Streptomyces* siano stati sottoposti a *screening*. Anche se ad oggi solo una frazione dei metaboliti prodotti da *Streptomyces* sono stati identificati, la scoperta della frazione ancora non individuata richiederà un impiego di risorse decisamente maggiore rispetto al passato (1). Dato che sono state scoperte già diverse migliaia di prodotti microbici, diventa indispensabile adottare nuove strategie per evitare di identificare nuovamente le stesse molecole (2, 3). Dal momento che le vie biosintetiche che portano ai metaboliti di interesse sono spesso complesse e coinvolgono numerosi enzimi, possono essere sufficienti piccole differenze in uno degli enzimi coinvolti per portare a prodotti diversi. Ci si può attendere che la probabilità di trovare enzimi diversi (o diverse combinazioni di enzimi) aumenti quando si considerano ceppi evolutivamente più lontani. A questo proposito sarebbe quindi auspicabile utilizzare ceppi produttori poco sfruttati in passato. In effetti, l'isolamento e lo *screening* su larga scala di generi di attinomiceti che precedentemente erano stati poco sfruttati è storicamente coinciso con un incremento nella scoperta di nuovi antibiotici (4, 5). Una delle strategie che vengono adottate consiste nell'isolare i ceppi da campioni raccolti in località tra loro molto distanti, oppure da

microambienti particolari, contando sull'isolamento geografico e/o ecologico per aumentare la novità dei ceppi isolati. In realtà molti microrganismi possono essere considerati ubiquitari, riducendo quindi l'importanza dell'origine del campione. La probabilità di isolare un ceppo di *Streptomyces* mai sottoposto a *screening* appare oggi decisamente ridotta, dato lo sfruttamento intensivo a cui questi microrganismi sono stati sottoposti. Una fonte di nuove molecole può essere rappresentata proprio da attinomiceti appartenenti a generi isolati con relativamente minor successo rispetto ai produttori più noti (6). L'estremizzazione di questo concetto porta a rivolgersi a generi di microrganismi mai isolati in precedenza. Dati molecolari indicano infatti che solo una frazione minima (1% o meno) della diversità microbica è stata finora isolata e coltivata in laboratorio (7): esiste quindi un potenziale biosintetico enorme, che finora non è stato analizzato e sfruttato, che potrebbe fornirci nuovi metaboliti di interesse industriale. Come detto in precedenza, però, solo una piccola parte dei microrganismi conosciuti è in grado di produrre questo tipo di molecole: gli sforzi devono pertanto essere orientati verso gruppi di microrganismi potenzialmente in grado di operare le necessarie biosintesi.

## Nuovi ceppi attivi

Lo studio dei genomi conferma l'osservazione che solo alcuni gruppi di microrganismi sono buoni produttori di metaboliti secondari. La maggior parte dei genomi sequenziati, infatti, non mostra alcun *cluster* dei geni tipicamente coinvolti nel metabolismo secondario. Al contrario, ciascuno dei genomi di *Streptomyces coelicolor* e *S. avermitilis* contiene oltre 20 di questi *cluster* (8-10). Questa, insieme all'enorme dimensione

del genoma, è una caratteristica comune anche ad altri generi di attinomiceti filamentosi (11) e ai myxobatteri (12), tutti buoni produttori di molecole biologicamente attive. Un'analisi retrospettiva dei batteri produttori di metaboliti secondari indica che la maggior parte delle molecole viene da generi che combinano un ampio potenziale genetico con la facilità di isolamento e coltura. La novità del ceppo non è dunque un criterio sufficiente per valutare l'interesse industriale di un gruppo di microrganismi. I nuovi ceppi devono essere in grado di produrre metaboliti secondari, e questa capacità può essere valutata direttamente con appropriati saggi di attività. In assenza di questi è comunque possibile analizzare la presenza di un repertorio di geni tipici del metabolismo secondario attraverso metodi molecolari. Non bisogna però dimenticare che l'identificazione di nuove molecole è prima di tutto un fatto stocastico, che richiede quindi l'analisi di un numero significativo di campioni. I nuovi gruppi isolati devono pertanto essere relativamente facili da isolare e coltivare, e devono presentare una rilevante diversità genetica. Per quanto nuovi, infatti, non è pensabile che tutti i membri di un nuovo gruppo siano in grado



Un altro esempio di piastra di isolamento

## New Frontiers in the Discovery of Natural Products

*Microrganisms are the source of thousands of bioactive molecules. As the "rediscovery" of known molecules increases, it is important to screen a portion of biodiversity not analysed in the past. We know that most of the microbial diversity has never been cultured. With the application of novel methods, new strains are being isolated which could be important sources of novel metabolites.*

ABSTRACT 



Particolare di un ceppo di attinomicete appartenente ad un gruppo filogenetico recentemente identificato

di produrre solo metaboliti nuovi, come pure il fatto di trovare un metabolita già conosciuto non significa che tutti i metaboliti identificati saranno composti noti.

Riassumendo, un nuovo gruppo microbico di ceppi è quindi potenzialmente interessante per l'industria solo se è relativamente facile disporre in breve tempo di un elevato numero di ceppi, che siano diversi tra loro e che abbiano la potenzialità di produrre (nuovi) metaboliti.

Nel nostro lavoro, volto all'isolamento di produttori di nuovi antibiotici, abbiamo tenuto conto di queste caratteristiche per valutare il potenziale industriale di nuovi ceppi.

Il razionale alla base del nostro lavoro è semplice: è più facile che combinazioni nuove di enzimi (e quindi nuovi metaboliti) si trovino in ceppi che non sono mai stati analizzati, piuttosto che in ceppi ormai isolati in

grandi numeri. Dato che, però, il potenziale per la biosintesi di metaboliti secondari sembra concentrato in pochi gruppi di batteri, abbiamo rivolto la nostra attenzione agli attinomiceti filamentosi, cercando di individuare nuovi generi all'interno di questo gruppo di prolifici produttori di sostanze di interesse farmaceutico ed industriale. Nonostante l'intenso lavoro svolto nel passato, la maggior parte dei prodotti deriva infat-

ti da pochi generi (in particolare *Streptomyces*), che sono stati sottoposti a screening in modo molto più intensivo rispetto ad altri; numerosi studi molecolari, inoltre, indicano che una parte dei microrganismi che ancora non sono stati coltivati è strettamente "imparentata" con generi di Attinomiceti produttori di sostanze bioattive (13, 14). Introducendo una serie di modifiche alle procedure normalmente utilizzate per l'isolamento, abbiamo recentemente portato in coltura numerosi microrganismi fino a quel momento mai isolati (15). Simili risultati sono stati ottenuti anche da altri gruppi, in modo del tutto indipendente (16-18).

Siccome alcuni dei nuovi attinomiceti filamentosi da noi isolati possono essere mantenuti in coltura facilmente, ci è quindi stato possibile analizzarne un numero sufficiente ad una prima valutazione del loro interesse

industriale. L'analisi attraverso metodi molecolari indica che questi nuovi microrganismi hanno genomi relativamente grandi, paragonabili a quelli di produttori noti, e che contengono diverse classi di geni coinvolti nel metabolismo secondario. Il potenziale genetico è stato, in alcuni casi, confermato nel corso di saggi per valutare la produzione dalla effettiva produzione di attività antimicrobiche, osservate con opportuni saggi. Anche la valutazione di altre caratteristiche ha dato risultati incoraggianti. Alcuni dei nuovi gruppi identificati sono infatti largamente distribuiti nei suoli, anche in aree geograficamente lontane, la loro ubiquità garantirebbe quindi la possibilità di un costante approvvigionamento di nuovi isolati per lo *screening*. Anche la diversità genetica, almeno per alcuni gruppi, sembra essere elevata, lasciando presagire una conseguente diversità metabolica. Solo l'effettivo isolamento di alcune migliaia di ceppi e l'analisi dei loro metaboliti potrà confermare il potenziale di questi ceppi come produttori di nuove molecole.

Le indicazioni raccolte finora stanno confermando le ipotesi alla base del lavoro, ovvero che è possibile portare in coltura gruppi di microrganismi, in possesso del corredo genetico necessario alla produzione di metaboliti secondari, che non sono fino ad ora stati isolati e sottoposti a *screening*. Non possiamo ancora dire se, come nel passato, l'isolamento massivo di nuovi gruppi di microrganismi corrisponderà alla scoperta di nuovi principi attivi. I nuovi gruppi di atti-

## Bibliografia

- (1) M.G. Watve *et al.*, *Arch. Microbiol.*, 2001, **176**, 386.
- (2) G. Lancini *et al.*, *Antibiotics: a Multidisciplinary Approach*, 1995, Plenum Press, New York and London.
- (3) A.T. Bull *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, **64**, 573.
- (4) F. Parenti *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1979, **33**, 389.
- (5) M.J. Weinstein, *SIM News*, 2004, **54**, 56.
- (6) A. Lazzarini *et al.*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **78**, 399.
- (7) R.I. Amann *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**, 143.
- (8) S.D. Bentley *et al.*, *Nature*, 2002, **417**, 141.
- (9) S. Omura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 12215.
- (10) H. Ikeda *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 526.
- (11) M. Sosio *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 2000, **264**, 213.
- (12) K. Gerth *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2003, **106**, 233.
- (13) H.P. Mc Veigh *et al.*, *J. Ind. Microbiol.*, 1996, **17**, 197.
- (14) P. Monciardini *et al.*, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2002, **42**, 419.
- (15) S. Donadio *et al.*, Sources of Polyketides and Nonribosomal Peptides, in *Biocombinatorial Approaches for Drug Finding*, W. Wohlleben *et al.* (Eds.), 2004, Vol. 51, The Ernst Schering Research Foundation, Springer, Berlin, in press.
- (16) T.J. Mincer *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 5005.
- (17) M. Sait *et al.*, *Environ. Microbiol.*, 2002, **4**, 654.
- (18) S.J. Joseph *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 7210.