

DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS Y AGENTES ANTITUMORALES A PARTIR DE EXTRACTOS MICROBIANOS

FUNDACION CENTRO DE EXCELENCIA EN INVESTIGACION DE MEDICAMENTOS INNOVADORES, MEDINA

1. Resumen de la propuesta.

La presente propuesta pretende dar respuesta a dos de los problemas de salud más acuciantes para la población mundial en la actualidad y actualmente no resueltos: el aumento de resistencias microbianas y la aparición nuevos agentes infecciosos tales como el coronavirus SARS CoV-2, y la cada vez más creciente incidencia de tumores entre la población adulta. La Fundación MEDINA es un referente internacional en la investigación en nuevos fármacos derivados de productos naturales microbianos con una de las mayores colecciones de cepas microbianas del mundo para la investigación en productos naturales. La librería de extractos microbianos generada a partir de estas cepas es el punto de partida de sus programas de descubrimiento de nuevas moléculas con aplicación en biomedicina. El objetivo principal del centro es descubrir nuevas moléculas que sirvan de punto de partida para el desarrollo de nuevos antibióticos, antivirales y fármacos antitumorales integrando aproximaciones en tres áreas científico-técnicas y dirigidas a 1) aumentar la diversidad química de sus librerías mediante la inducción del potencial biosintético de los microorganismos en distintas condiciones de cultivo, 2) aplicar nuestra plataforma de cribado de actividad biológica de alta capacidad (HTS), con modelos de ensayos de vanguardia en las dos áreas objeto de estudio, y 3) aplicar tecnología analítica de última generación para el aislamiento y la caracterización estructural de nuevos compuestos. El análisis bioinformático y molecular del genoma de microorganismos productores de las moléculas obtenidas y la identificación y expresión heteróloga de las rutas de biosíntesis como medio para incrementar la producción de las nuevas moléculas también constituye un objetivo fundamental de la propuesta. Asimismo, se llevará a cabo la caracterización del perfil de seguridad preclínica-ADME de los nuevos compuestos identificados para determinar su potencial como candidatos a fármacos en las áreas propuestas. Esta investigación forma parte del programa de I+D interno de la Fundación MEDINA y la contribución de tres investigadores postdoctorales, cada uno adscrito a una de las tres áreas de la institución, Microbiología, Screening HTS y Química, supondría un incremento notable en las aproximaciones innovadoras a implementar en el campo del descubrimiento de nuevos fármacos, que se vería reflejado no solo en un mayor número y variedad estructural de las moléculas identificadas, sino también en la obtención candidatos a fármacos tempranos para su validación y posible desarrollo preclínico.

2. Descripción y objetivos de la actividad de I+D+i a desarrollar por cada una de las áreas científico-técnicas. Excelencia científica de la propuesta.

Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es el descubrimiento y caracterización de nuevos antibióticos, antivirales y antitumorales con potencial para su desarrollo preclínico. Para ello la propuesta propone una aproximación multidisciplinar que incluye el cribado de las librerías de productos naturales de origen microbiano de la Fundación MEDINA así como de nuevas librerías enriquecidas en nuevos microorganismos productores pertenecientes a géneros minoritarios, el empleo de nuevas plataformas de apoyo al *screening* para la validación e implementación de nuevos ensayos de cribado, el aislamiento y caracterización de los nuevos compuestos con el perfil adecuado de actividad y potencia, la caracterización de los microorganismos productores y la biosíntesis de esas moléculas y la caracterización preclínica de sus propiedades farmacológicas relativas a seguridad y toxicidad. Para la realización de todos estos objetivos específicos se necesita el trabajo multidisciplinar de los tres departamentos de la Fundación MEDINA: Microbiología, Screening HTS y Química, siendo esta la razón de la solicitud de financiación del contrato de un investigador posdoctoral para cada área científico-técnica específica.

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	1/20



162066173131328526

Fundación MEDINA posee una de las mayores colecciones de microorganismos a nivel mundial con más de 190.000 cepas microbianas de enorme diversidad taxonómica (actinomicetos, bacterias y hongos) aisladas de muestras ambientales de diversa procedencia y ecología (suelos, maderas, líquenes, raíces, excrementos, sedimentos marinos, etc.) y recogidas en un amplio rango de orígenes geográficos. A partir de dichas cepas se ha generado una librería de extractos naturales compuesta por más de 200,000 extractos crudos y fracciones obtenidos a partir de la fermentación de estos microorganismos cultivados en una amplia variedad de condiciones que permiten la expresión de múltiples rutas biosintéticas y la producción de nuevos metabolitos. Adicionalmente, las extracciones se realizan con solventes de diferente polaridad para asegurar la mayor variedad de muestras enriquecidas y compatibles con un amplio rango de ensayos biológicos. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29950656/>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303128/>).

Esta propuesta se estructura para responder a los siguientes tres objetivos específicos:

- 1) El desarrollo de nuevas aproximaciones de ensayo para el cribado y caracterización de nuevas moléculas activas como antibacterianos, antivirales y anticancerosos.
- 2) El aislamiento y elucidación estructural de nuevos compuestos procedentes de extractos microbianos con el objetivo de describir nuevas clases estructurales activas en estos campos.
- 3) La caracterización molecular del metaboloma de las cepas productoras y de las rutas de biosíntesis de las nuevas moléculas, la optimización de su producción y generación de análogos como punto de partida para su desarrollo preclínico mediante herramientas biosintéticas y de expresión heteróloga.

2. Descripción de la actividad propuesta

2.1. DESARROLLO DE ENSAYOS CON NUEVAS APROXIMACIONES Y CRIBADO Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVAS MOLÉCULAS:

2.1.1 Descubrimiento de nuevos antibacterianos mediante el cribado de librerías de productos naturales.

Dentro de la emergencia de la resistencia a antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* son dos de los patógenos de mayor impacto a nivel global y están incluidos por la OMS en la lista de cepas prioritarias para la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas que permitan su tratamiento y combatir las cepas multirresistentes.

Por otra parte, la gonorrea es una enfermedad infecciosa grave de transmisión sexual que provoca una elevada tasa de morbilidad y mortalidad tanto en adultos como en recién nacidos y causada por *Neisseria gonorrhoeae*. En las últimas décadas han aumentado los casos de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a penicilina, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, macrólidos y más recientemente a cefalosporinas y la búsqueda de nuevos antibióticos para combatir este patógeno se ha convertido en una urgente necesidad: (https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf). (Tacconelli *et al.* 2018).

2.1.1.1. Descubrimiento de antibióticos frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* y determinación del modo de acción de los compuestos aislados mediante tecnologías de imagen.

En el cribado se ensayarán nuevos módulos de extractos de la colección de MEDINA preparados por el Departamento de microbiología frente a los dos patógenos indicados en ensayos de inhibición en microplaca, seleccionándose los extractos activos con buen perfil de inhibición superior al 70%. Los extractos activos serán confirmados y desreplicados mediante

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	2/20
 <small>162066173131328526</small>			

análisis de la ausencia de compuestos conocidos por LC/MS frente a las bases de datos de metabolitos activos de MEDINA y bases públicas y comerciales de productos naturales, y se procederá a la purificación de las nuevas moléculas bioactivas, trabajo que se realizará en conjunto con el departamento de química de la Fundación. Posteriormente se determinará la concentración mínima inhibitoria de los compuestos bioactivos purificados frente a un panel más amplio de patógenos humanos.

Para la realización de esta etapa de la propuesta se utilizará la capacidad de la plataforma de cribado de alto rendimiento que tiene el departamento de Screening HTS de la Fundación (Berenguel Hernandez AM et al., 2020). Dicha plataforma se considera como uno de los mejores a nivel internacional, y forma parte del ERIC EU-OPENSOURCE siendo uno de los 8 centros de HTS (*High Throughput Screening*) de dicha Infraestructura Europea (Brennecke P et al., 2019). También se desarrollarán nuevas aproximaciones de evaluación del modo de acción de los compuestos aislados mediante tecnologías de imagen utilizando el equipamiento de High Content Screening (HCS) disponible en MEDINA, así como aplicando metodologías de inteligencia artificial.

2.1.1.2 Screening frente al patógeno Gram negativo *Neisseria gonorrhoeae*.

Inicialmente se llevará a cabo la puesta a punto de un ensayo HTS en formato de 96 pocillos con diferentes cepas clínicas de *N. gonorrhoeae* (90570 y 88970), una de ellas Bla – y la otra Bla+, optimizando las diferentes condiciones de ensayo, incluyendo variaciones en los medios de cultivo, tiempos de incubación y mantenimiento del cultivo de las cepas. Se determinará la actividad de diferentes antibióticos con diferente modo de acción para evaluar perfiles de resistencia mediante determinación de la MIC (Mínima Concentración Inhibitoria) mediante dos técnicas de revelado diferentes: absorbancia y fluorescencia. La puesta a punto del ensayo se completará con un cribado piloto utilizando un módulo de la librería de MEDINA de 400 extractos de origen microbiano, y selección de aquellos extractos con mayor actividad. Posteriormente, se procederá al aislamiento y caracterización química de los compuestos bioactivos frente a *Neisseria gonorrhoeae* a partir de refermentaciones a pequeña escala de aquellos extractos que presenten mejor actividad y potencial novedad de sus componentes.

Se utilizará la plataforma de cribado descrita anteriormente, que consta de equipamiento de última generación tanto en distribuidores de muestras (TecanEVO, Biomeck FX e i7, 2 Packard EP3,) como en lectores con diferentes tecnologías en absorbancia, fluorescencia, luminiscencia, HTRF, FRET, luz polarizada..etc (2 Wallac Victor, 1 FLIPR Tetra, 2 Envision, 1Typhoon, 2 Image analyzer, 1 Odyssey, 1 Flow Cytometer and 2 High Content Screening: Operetta PE y Pathway 550 BD). También se contará con un robot celular para mantenimiento y dispensación de células (Select T).

En paralelo se desarrollarán ensayos de imagen para la determinación del modo de acción de los compuestos activos aislados. Para ello MEDINA dispone de equipos que permiten la lectura de varios parámetros simultáneamente sin comprometer la fiabilidad y robustez de los resultados (HCS).

2.1.2 Descubrimiento de nuevos antivirales frente a dianas de SARS-CoV2 mediante el cribado de librerías de productos naturales y de compuestos de síntesis.

La Fundación MEDINA, como centro de investigación frente a COVID-19, se encuentra explorando distintas aproximaciones para identificar inhibidores de dos de las principales dianas del COVID-19: la interacción ACE2/Spike y la proteasa vírica Mpro.

El departamento de Screening HTS de MEDINA ya tiene experiencia en la identificación de antivirales. Además, se tiene constancia de las similitudes entre el mecanismo de egreso de los virus encapsulados como VIH o Ébola, y el mecanismo del virus SARS CoV-2. El grupo tiene experiencia en el desarrollo de ensayos en formato de alto rendimiento tipo ELISA, ensayos FRET y ensayos enzimáticos con diferentes dianas, que puede extrapolarse al desarrollo de plataformas de cribado para la identificación de inhibidores de la interacción

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	3/20
 <small>162066173131328526</small>			

ACE2/Spike mediante un ensayo ELISA de competición y mediante un ensayo homólogo de FRET en tiempo resuelto (HTRF).

En paralelo, y en colaboración con el Profesor Haitao Yang de Shanghai Tech (<http://slst.shanghaitech.edu.cn/english/2018/1103/c727a35805/page.htm>), se ha adaptado el ensayo enzimático con la proteasa Mpro del SARS CoV-2, recientemente publicado en Nature (<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2223-y>), al cribado de bibliotecas de productos naturales, sintéticos y extractos/fracciones de origen microbiano.

2.1.2.1 Cribado de la librería de compuestos puros y de extractos de la Fundación MEDINA frente a la diana ACE2/Spike mediante dos aproximaciones: un ensayo ELISA de competición y un ensayo homólogo de FRET en tiempo resuelto (HTRF).

Con el fin de desarrollar esta tarea de la propuesta, se desarrollarán varias tecnologías:

- En primer lugar, se optimizará el ensayo determinando la ventana de ensayo adecuada para el cribado de bibliotecas de compuestos en formato de microplaca de 384 pocillos mediante un ensayo ELISA de competición ACE2/Spike, lo cual permitirá aumentar el rendimiento de los cribados.
- En paralelo se adaptará un kit comercial de HTRF para tratar de conseguir una plataforma de ensayo más automatizada, de menor número de etapas que el ELISA, y con unos parámetros óptimos de lectura (retraso, integración de la señal) que permita minimizar el efecto matriz de compuestos/extractos autofluorescentes.

Dichos ensayos se validarán para llevar a cabo inicialmente el *screening* de las librerías de compuestos puros de MEDINA y de otras librerías de compuestos sintéticos, y a continuación se evaluarán diferentes módulos de extractos y fracciones de la librería de MEDINA

2.1.2.2 Cribado de compuestos frente a la proteasa del virus Mpro

Se propone desarrollar un nuevo ensayo enzimático basado en la evaluación de la actividad de la proteasa Mpro usando el péptido/sustrato, y poder evaluar a partir de las librerías de MEDINA o externas de compuestos sintéticos el efecto de inhibidores de la actividad proteasa.

El ensayo requiere inicialmente la puesta a **punto de la producción de la proteína Mpro** de SARS-CoV-2 **recombinante mediante** expresión en *E. coli* y purificación de la proteína soluble y funcional para el ensayo. Sobre la base de los resultados preliminares que han confirmado la eficiencia en su expresión y purificación, la proteína se va a obtener a partir la expresión del plásmido que nos permite producir de forma eficiente la enzima en su forma recombinante.

Una vez optimizado el ensayo determinando una ventana adecuada para el cribado de bibliotecas de compuestos en formato de microplaca de 384 pocillos, se validará para llevar a cabo inicialmente el *screening* de las librerías de compuestos puros de MEDINA, así como de otros compuestos de colecciones sintéticas, y posteriormente se evaluarán diferentes módulos de extractos y fracciones de nuestra librería.

Como en las tareas anteriores se utilizará en estas dos últimas, relacionadas con la enfermedad COVID-19, la plataforma de cribado del grupo de *Screening* de MEDINA juntamente con la plataforma de purificación de proteínas disponible también en dicho grupo.

2.1.3 Búsqueda de nuevos antitumorales mediante cribado HTS con ensayos fenotípicos frente a un panel de células humanas tumorales de diferentes orígenes.

2.1.3.1 Ensayo en el panel de líneas celulares de la actividad antitumoral de una selección de compuestos naturales puros de la colección de MEDINA, librerías de extractos crudos y fracciones enriquecidas.

Un subconjunto de la colección de extractos de MEDINA con una alta diversidad química será ensayado en un panel de cinco líneas tumorales humanas procedentes de piel, hígado, mama, pulmón y páncreas para determinar su efecto citotóxico sobre las mismas, mediante el test

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	4/20
 162066173131328526			

MTT (Barúa JE et al., 2019). Los resultados serán analizados mediante el software de análisis *GeneData Screener™* y serán seleccionados para un estudio posterior los extractos con mejor efecto citotóxico frente a las líneas tumorales y una mayor novedad estructural de sus componentes. Para ello los extractos se someterán al proceso descrito en el apartado 2.2.1 y de esta forma se determinará la novedad estructural de los componentes de cada extracto. Los 5 extractos más prometedores, en los que no se detecte la presencia de compuestos conocidos, serán sometidos a fraccionamiento cromatográfico y caracterización estructural de sus componentes.

Para la realización de esta tarea, así como en la mayoría de esta propuesta, intervendrán los tres departamentos de la Fundación MEDINA con sus plataformas de última generación en el descubrimiento de nuevos fármacos.

2.1.3.2 Desarrollo de una plataforma de cribado celular BRET (bioluminescence resonance energy transfer) y su aplicación a dianas de activación de inflamación en cáncer

Como parte de la colaboración de MEDINA con Promega en la expansión de su tecnología NanoBRET (<https://www.promega.es/products/epigenetics/cell-based-and-biochemical-assays/nanobret-target-engagement-assay-components/?catNum=N2150>), se va a aplicar esta tecnología a la identificación de inhibidores de la diana NLRP3 para la **activación de inflamasoma en cáncer**, con potencial terapéutico extrapolable a otras indicaciones inflamatorias y envejecimiento (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01021/full>). Para ello, se empleará una línea celular estable, proporcionada por Promega, y se optimizará su uso en formato de alto rendimiento en placa de 384-pocillos para el cribado de colecciones de compuestos puros y, complementariamente, el cribado de fracciones enriquecidas de la colección de extractos de Productos Naturales microbianos de la Colección de MEDINA. Se priorizarán las 2-3 moléculas que presenten una mejor potencia dosis-respuesta y se estudiará su mecanismo de acción mediante Western-blot y/o ensayos secundarios de superior funcionalidad.

Al tener una red de colaboración establecida, se podrán ensayar las moléculas obtenidas de la propuesta anterior de cáncer también como potenciales tratamientos antiinflamatorios en COVID-19, envejecimiento y enfermedades de inflamación de alto impacto en salud (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01021/full>, <https://www.invivogen.com/inflammasome-test-cells>). Los nuevos coronavirus (nCoV) codifican proteínas de canal iónico llamadas "viroporinas" como la proteína E, y las proteínas ORF3a y ORF8a. Una de las dianas será estas "viroporinas", que a través de mecanismos como la alteración lisosómica y la redistribución intracelular de iones, activan la diana del inflammasoma NLRP3 (definido en inglés como NLR family pyrin domain containing 3), y conduce a la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF), que provocan inflamación de los tejidos durante la enfermedad respiratoria causada por la infección por CoV.

2.1.3.3 Descubrimiento de fármacos antitumorales utilizando cultivos 3D (esferoides)

Las características biológicas de la célula tumoral se investigan, fundamentalmente, utilizando el crecimiento de líneas celulares estables en monocapa (2D). A pesar de que este modelo *in vitro* ha permitido obtener mucha información valiosa respecto a mecanismos relacionados con el crecimiento tumoral, no representa realmente el crecimiento de un tumor *in vivo*. Los tumores sólidos crecen en un orden espacial tridimensional (3D) con contactos célula-célula muy íntimos, una organización compleja de la matriz extracelular y una distribución irregular de oxígeno y nutrientes [Sant and Jonston, 2017]. Considerando estas características, se generan unas condiciones particulares de cultivo *in vitro* que permiten el crecimiento en 3D de células tumorales (esferoides). Este modelo tiene la particularidad de reflejar la situación fisiopatológica *in vivo* de microrregiones tumorales. Se generarán, por lo tanto, esferoides que servirán como modelo para la búsqueda de agentes antitumorales, específicamente para cáncer de mama y de páncreas, sobre los que se ensayarán productos naturales con la idea

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	5/20
 162066173131328526			

de encontrar nuevas moléculas con propiedades antitumorales. El efecto sobre los esferoides será analizado usando tanto medidas metabólicas como de imagen donde se utilizará el equipamiento de HCS disponible en el departamento de Screening HTS de MEDINA.

Referencias

- Tacconelli *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2017 Mar; 23:27-36. doi: 10.1016/j.ddtec.2017.03.002.
- Berenguel Hernández AM, de la Cruz M, Alcázar-Fabra M, Prieto-Rodríguez A, Sánchez-Cuesta A, Martín J, Tormo JR, Rodríguez-Aguilera JC, Cortés-Rodríguez AB, Navas P, Reyes F, Vicente F, Genilloud O. Design of High-Throughput Screening of Natural Extracts to Identify Molecules Bypassing Primary Coenzyme Q Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *SLAS Discov.* 2020 Mar;25(3): 299-309.
- Barúa JE, De la Cruz M, De Pedro N, Cautain B, Hermosa R, Cardoza RE, Gutiérrez S, Monte E, Vicente F, Collado IG. Synthesis of Trichodermin Derivatives and Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Molecules*, 2019, 24, 3811.
- Brennecke P, Rasina D, Aubi O, Herzog K, Landskron J, Cautain B, Vicente F, Quintana J, Mestres J, Stechmann B, Ellinger B, Brea J, Kolanowski JL, Pilarski R, Orzaez M, Pineda-Lucena A, Laraia L, Nami F, Zielenkiewicz P, Paruch K, Hansen E, von Kries JP, Neuenschwander M, Specker E, Bartunek P, Simova S, Les´nikowski Z, Krauss S, Lehtiö L, Bilitewski U, Brönstrup M, Taskén K, Jirgensons A, Lickert H, Clausen MH, Andersen JH, Vicent MJ, Genilloud O, Martinez A, Nazaré M, Fecke W, and Gribbon P. EU-OPENSREEN: A Novel Collaborative Approach to Facilitate Chemical Biology. *SLAS Discover.*, 2019, 24: 398-413. doi: 10.1177/2472555218816276.

2.2. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE NUEVOS COMPUESTOS

Este apartado del proyecto está dirigido al aislamiento de las estructuras activas a partir de los extractos seleccionados por criterios de actividad y de interés identificados en los programas de cribados anteriormente descritos (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26962874/>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20931260/>).

2.2.1 Desreplicación mediante LC/MS de los extractos bioactivos para la identificación de metabolitos conocidos

Todos aquellos extractos y fracciones que muestren actividad biológica en los distintos ensayos propuestos serán sometidos a un proceso de desreplicación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-UV-MS), para descartar la presencia en los mismos de compuestos conocidos. Esta metodología hace uso de analizadores de masas de baja y alta resolución en combinación con búsquedas en bases de datos internas de la Fundación MEDINA y en el diccionario de productos naturales de Chapman & Hall y otras bases de datos de productos naturales de libre acceso para descartar el estudio de extractos que contengan productos naturales conocidos y centrar nuestros análisis en aquellos con nuevos productos naturales potencialmente novedosos. La metodología se encuentra puesta a punto y forma parte de los procesos internos de análisis del departamento de química de la Fundación MEDINA (Pérez-Victoria *et al.* 2016).

2.2.2. Fraccionamiento cromatográfico de extractos bioactivos

Se llevará a cabo el estudio de aquellos extractos susceptibles de rendir nuevas moléculas con actividad biológica, seleccionados en la etapa anterior. Como norma general se llevará a cabo el aislamiento de los compuestos activos a partir de cultivos con un volumen total de 1L, aunque volúmenes de cultivo de hasta 30 L pueden ser preparados si la baja concentración de metabolitos activos en los caldos lo requiriese debido a la adquisición reciente por la Fundación de un biorreactor con dicha capacidad.

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	6/20
 162066173131328526			

Los extractos serán sometidos a un proceso automatizado que permitirá la obtención de fracciones enriquecidas en los componentes activos. Los datos preliminares obtenidos durante el proceso inicial de desreplicación química (complejidad de la mezcla, datos de peso molecular y polaridad de los compuestos) guiarán la elección de la estrategia a seguir en la separación. Normalmente, el extracto orgánico del caldo de fermentación se someterá a un paso de fraccionamiento genérico en una primera etapa que emplea cromatografía en fase reversa. Alícuotas de las fracciones obtenidas en cada uno de los pasos del proceso de separación serán sometidas al cribado de su actividad biológica para determinar la fracción o fracciones con las que se continuará el estudio. El proceso se repetirá entre 2 y 4 veces empleando técnicas ortogonales hasta conseguir una pureza de los compuestos activos superior al 90 % (determinada mediante HPLC, RMN, y otros datos).

El método cromatográfico (adsorbente y disolvente) de cada paso será seleccionado en base a los datos reunidos durante el primer paso de fraccionamiento y los pasos subsiguientes. Se aplicarán técnicas de filtración en gel, partición cromatográfica, intercambio iónico, fase normal y fase reversa, y diferentes resinas, geles y adsorbentes. Nuestro laboratorio tiene operativos varios procesos cromatográficos semi-automatizados con equipos de última generación. Los mismos se pueden ajustar a la escala deseada, desde miligramos a gramos dependiendo de las necesidades. El empleo de HPLC preparativo como última etapa del proceso de fraccionamiento permitirá conseguir la pureza deseada para los productos finales. Para la determinación de la pureza de nuestros compuestos nos basaremos en técnicas de cromatografía de HPLC y HPLC-MS.

2.2.3. Caracterización estructural de los nuevos compuestos bioactivos obtenidos

La elucidación estructural de los nuevos productos naturales se basará en el uso de numerosos datos combinados obtenidos mediante el empleo de distintas técnicas espectroscópicas, incluyendo de forma significativa la espectrometría de masas, mediante la cual se obtiene información sobre peso y fórmula molecular así como de los fragmentos clave de la molécula, y la espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C y ocasionalmente otros núcleos, así como experimentos de doble dimensión de acoplamiento ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C como COSY, HMQC, HSQC editado, H2BC, HMBC, y experimentos de NOESY y ROESY, mediante los cuales es posible establecer la estructura plana de los compuestos y en algunos casos la estereoquímica relativa. También serán de gran ayuda en la caracterización estructural la espectroscopía de UV, que confirma la presencia de ciertos cromóforos en la estructura, y la espectroscopia de IR, que establece la naturaleza de los diferentes grupos funcionales presentes en la misma.

La Fundación MEDINA dispone de un equipo de resonancia magnética nuclear de 500 MHz con criosonda de 1.7 mm en el cual será posible realizar todos los experimentos anteriormente mencionados para la caracterización estructural de muestras. Su empleo reducirá notablemente las cantidades de muestra necesarias para la caracterización estructural completa de las moléculas purificadas.

La determinación de estereoquímicas relativas en estructuras cíclicas se llevará a cabo mediante el análisis de las distintas constantes de acoplamiento ^1H - ^1H , las correlaciones detectadas en experimentos de NOESY y ROESY y el uso de modelización molecular. En el caso de estructuras acíclicas o macrocíclicas la determinación de su estereoquímica relativa se basará en los métodos descritos por Murata y colaboradores (Matsumori *et al.* 1999), basados en la medida de los valores de constantes de acoplamiento protón-protón y carbono-protón a varios enlaces de distancia complementada con el empleo de modelización molecular (Bifulco *et al.* 2000) o en aproximaciones basadas en el uso de la base de datos universal de espectros de ^{13}C -RMN desarrollada por Kishi y colaboradores (Kobayashi *et al.* 1999; Lee *et al.* 1999).

La aplicación de los métodos de Mosher permitirá la determinación de la estereoquímica absoluta de alcoholes secundarios. El uso de una batería de reactivos quirales auxiliares, la realización de experiencias a distintas temperaturas y los experimentos de doble derivatización han permitido extender su rango de aplicaciones a la determinación de configuraciones absolutas de alcoholes primarios con centros quirales en b, alcoholes

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	7/20
 <small>162066173131328526</small>			

terciarios con centros quirales en a, aminas primarias y secundarias, centros quirales en a y b de grupos carboxilato y compuestos polihidroxilados quirales (Seco *et al.* 2004).

El método de Marfey se empleará para la determinación de la estereoquímica absoluta de los aminoácidos en aquellos casos en que las moléculas aisladas posean una naturaleza peptídica (Bushan y Brückner 2004; B'Hymer *et al.* 2003; Marfey 1984) Dicho método está basado en la hidrólisis en medio ácido del péptido cuya estereoquímica se pretende determinar, la reacción de la mezcla de aminoácidos resultantes con 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida y la comparación de tiempos de retención en HPLC-MS de los picos obtenidos en la derivatización del hidrolizado de aminoácidos del péptido con los de los patrones de cada aminoácido conteniendo todas las posibles estereoquímicas derivatizados con el mismo reactivo.

El uso combinado de los datos espectroscópicos junto con la información proporcionada por el análisis del genoma y determinación de la secuencia de clúster de genes responsables de la biosíntesis del compuesto permitirá además en algunos casos proponer la estereoquímica y configuración absoluta de todos los centros quirales de la molécula (Ortiz-López *et al.* 2020; Pérez Victoria *et al.*, 2019).

Por último, cabe mencionar que en casos muy complejos y si es factible obtener el producto en cuestión o algún derivado en forma cristalina, la cristalografía de Rayos X (a realizar por un servicio externo) puede usarse como herramienta para establecer o corroborar la estructura propuesta. Se cuenta para ello con la colaboración de investigadores del Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra del CSIC.

Referencias

- Bhushan R, Brückner H. (2004) *Amino Acids*, 27, 231-247
- B'Hymer C, Montes-Bayon M, Caruso JA. (2003) *Journal of Separation Science*, 26, 7-19.
- Bifulco G, Dambruoso P, Gomez-Paloma L, Riccio R. (2007). *Chemical Reviews*, 107, 3744-3779.
- Kobayashi Y, Lee J, Tezuka K, Kishi Y. (1999). *Organic Letters*, 1, 2177-2180.
- Lee J, Kobayashi Y, Tezuka K, Kishi Y. (1999). *Organic Letters*, 1, 2181-2184.
- Marfey P. (1984) *Carlsberg Research Communications*, 49, 591-596.
- Matsumori N, Kaneno D, Murata M, Nakamura H, Tachibana K. (1999). *The Journal of Organic Chemistry*, 64, 866-876.
- Ortiz-López FJ, Carretero-Molina D, Sánchez-Hidalgo M, Martín J, González I, Román-Hurtado F, de la Cruz M, García-Fernández S, Reyes F, Deisinger J, Schneider T, Genilloud O. (2020). *Angewandte Chemie International Edition*, 59, 12654-12658.
- Pérez-Victoria I, Martín J, Reyes, F. (2016). *Planta Medica*, 82, 857-871.
- Pérez-Victoria I, Oves-Costales D, Lacret R, Martín J, Sánchez-Hidalgo M, Díaz C, Cautain B, Vicente F, Genilloud O, Reyes F. (2019) *Organic & Biomolecular Chemistry*, 17, 2954-2971.
- Seco JM, Quiñoá E, Riguera R, (2004) *Chemical Reviews*, 104,17-118.

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS, OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN, ANALISIS MOLECULAR DE LA BIOSÍNTESIS Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA

Esta parte del proyecto incluirá mediante la utilización de diferentes tecnologías ómicas como la metabolómica y la genómica para la **caracterización del metaboloma microbiano y el estudio de la biosíntesis de aquellos compuestos de alto interés** aislados en las etapas anteriores de la propuesta. Estas aproximaciones analíticas permitirán no solo identificar metabolitos producidos por los microorganismos de interés y la optimización de su producción, sino también el análisis genómico de su biosíntesis, y optimización de su producción en huéspedes heterólogos mediante herramientas de biología sintética.

2.3.1. Caracterización del metaboloma microbiano

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	8/20
 162066173131328526			

La detección de nuevos compuestos bioactivos suele realizarse a partir del cultivo de cepas en condiciones no optimizadas para la producción del compuesto objetivo. Por ese motivo, el desarrollo preclínico de cualquiera de las moléculas producidas por microorganismos requiere optimizar dichas condiciones de producción para garantizar el escalado de la misma para poder purificar cantidades suficientes para el desarrollo posterior de los experimentos de validación de las moléculas: perfil de actividad, eficacia y toxicidad en modelos animales, y/o obtención de material de partida para semi-síntesis de compuestos análogos con propiedades biológicas mejoradas.

La caracterización analítica del metaboloma de las cepas productoras de nuevos antiinfecciosos (antibióticos y antivirales) y anticancerosos se llevará a cabo inicialmente mediante el análisis de los metabolitos producidos por cada cultivo de interés en múltiples medios de producción con diferentes composiciones nutricionales en cuanto a contenido en fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y otros oligoelementos, y condiciones de fermentación (tiempo, temperatura, formato y escala de crecimiento líquido o sólido). La Fundación dispone del conocimiento y la experiencia en el cultivo de microorganismos heredada del antiguo centro de MSD, con unas instalaciones para la manipulación y preparación de cultivos de todos los organismos en campanas de nivel BSL2. Así mismo dispone de una de las mayores bases de datos de medios de cultivo utilizados a nivel industrial para la producción de metabolitos que se utilizarán en este proyecto. Este estudio se podrá llevar a diferentes escalas y formatos que abarcan desde la utilización de microfermentaciones en placas Duetz de 96 pocillos que permiten la incubación simultánea de hasta 96 cepas en volúmenes de fermentación inferiores a 1 mL, pudiendo analizar en paralelo más de 20-25 composiciones de medios diferentes. Otros formatos disponibles incluyen los viales EPA con 10 mL de medio, o matraces conteniendo 100 o 250 mL de medio de producción. MEDINA tiene de una gran capacidad de cultivo en todos estos formatos ya que dispone de más de 18 armarios incubadores orbitales Kuhner con regulación de agitación, temperatura y humedad durante toda la fermentación, que en el caso de los hongos pueden llegar a 21 y 28 días en función de los grupos de cultivos y condiciones utilizadas. Este amplio abanico de condiciones permitirá determinar las mejores condiciones de producción de metabolitos con potencial actividad biológica a partir del análisis de los extractos obtenidos a partir de las fermentaciones que se analizarán por HPLC-MS utilizando la plataforma analítica del centro ya descrita en el punto 2.2.1. Se aplicarán herramientas desarrolladas en MEDINA como el MASS-Studio (https://doi.org/10.1007/978-3-319-56148-6_20) para el análisis de los perfiles cromatográficos, que permitirán caracterizar las nuevas especies moleculares que no existan en las bases de datos y determinar su singularidad en las condiciones estudiadas. Este tipo de aproximaciones permitirán disponer del perfil metabolómico de las cepas productoras en las diferentes condiciones de cultivo, e identificar las mejores condiciones de producción para cada uno de los compuestos de interés en cada una de las condiciones de laboratorio, siguiendo la metodología ya desarrollada en el centro (Serrano et al., 2017; González-Menéndez et al., 2018, 2019). El análisis del perfil metabolómico permitirá igualmente identificar de manera preliminar los flujos metabólicos a lo largo del crecimiento del cultivo y conocer mejor las condiciones fisiológicas asociadas a la producción del metabolito de interés. Dicho análisis proporcionará información sobre la variación de los componentes básicos del metabolismo primario y determinar los factores limitantes para la producción del metabolito de interés.

Con el fin de aumentar la producción de dichos compuestos, las fermentaciones se escalarán posteriormente a formatos de biorreactor utilizando las unidades de 7L, y posteriormente de 30L (Biorreactor BIONET), con las cuales se podrá monitorizar la producción del compuesto a lo largo del ciclo de cultivo, así como todas las variables de pH, oxígeno disuelto, biomasa, consumo de carbono, etc. Dichos experimentos se llevarán a cabo tanto con bacterias como con cepas de hongos filamentosos, adecuando las condiciones de fermentación a las características de cada uno de estos microorganismos. La optimización de la producción a escala de biorreactor permitirá transferir el proceso a otros colaboradores o empresas cuando se requiera escalar la producción a tanques con volúmenes de 300L a 1000L.

Referencias

- Martínez G., González-Menéndez V., Martín J., Reyes F., Genilloud O., Tormo J.R. (2017) MASS Studio: A Novel Software Utility to Simplify LC-MS Analyses of Large

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	9/20



162066173131328526

- Sets of Samples for Metabolomics. In: Rojas I., Ortuño F. (eds) Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO 2017. Lecture Notes in Computer Science, vol 10208. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56148-6_20
- Serrano R, González-Menéndez V, Rodríguez L, Martín J, Tormo JR, Genilloud O (2017) Co-culturing of Fungal Strains Against *Botrytis cinerea* as a Model for the Induction of Chemical Diversity and Therapeutic Agents. *Front. Microbiol* 8:649
 - González-Menéndez V, Martínez G, Serrano R, Muñoz F, Martín J, Genilloud O, Tormo JR. Ultraviolet (IUV) and mass spectrometry (IMS) imaging for the deconvolution of microbial interactions. *BMC Syst Biol*. 2018 Nov 20;12(Suppl 5):99. doi: 10.1186/s12918-018-0617-3.
 - González-Menéndez V, Crespo G, Toro C, Martín J, de Pedro N, Tormo JR, Genilloud O. Extending the Metabolite Diversity of the Endophyte *Dimorphosporicola tagani*. *Metabolites*. 2019 Sep 21;9(10). pii: E197. doi: 10.3390/metabo9100197

2.3.2. Caracterización de las rutas de biosíntesis y optimización de la producción de las moléculas identificadas.

Otro aspecto relevante del proyecto consistirá en la caracterización de cada organismo productor a nivel genético mediante determinación de la secuencia completa del genoma y el análisis de la capacidad biosintética. Será imprescindible disponer de esta información de partida para estudiar la fisiología del microorganismo productor e identificar la ruta responsable de la biosíntesis del compuesto activo mediante herramientas bioinformáticas, elucidar los mecanismos de regulación de su producción y permitir una optimización de las condiciones de producción para su escalado y generación de nuevos análogos mediante manipulación genética de la ruta de biosíntesis.

El Departamento de Microbiología está dotado con todo el equipamiento de última generación de un laboratorio de biología molecular para el desarrollo de todo tipo de experimentos a gran escala de manipulación genética con cepas recombinantes y análisis del material genético

La secuencia completa de cada cepa productora se determinará mediante una combinación de PacBio e Illumina HiSeq2000, que permita obtener un primer borrador de genoma con el menor número de contigs posibles teniendo en cuenta que se tratarán de genomas grandes de más de 10Mb y de hasta 40 Mb en el caso de los hongos filamentosos. La anotación del genoma mediante antiSMASH permitirá indicar la presencia de potenciales rutas biosintéticas, y su potencial biosintético (Weber et al. 2015). Para determinar la agrupación génica responsable de la biosíntesis de cada uno de los compuestos será necesario llevar a cabo un análisis retro-biosintético de cada uno de los compuestos en función de sus características estructurales con objeto de plantear una hipótesis biosintética. El análisis biosintético proporcionará en cada caso una gran cantidad de información extraordinariamente útil respecto a determinadas proteínas que deberían estar codificadas en cada agrupación génica, facilitando su identificación en los clústeres anotados en el genoma.

El abordaje principal consistirá en la generación mediante herramientas de bioingeniería y manipulación genética de la ruta biosintética, nuevas variantes cada molécula con propiedades mejoradas respecto a su actividad específica, perfil de actividad y propiedades farmacocinéticas que permitan proponer el desarrollo de una nueva generación de compuestos. En función de las posibilidades de manipulación genética de cada una de las cepas implicadas, se optará por la manipulación de la cepa productora original mediante herramientas de mutagénesis dirigida de última generación (CRISPRCas9) o bien, si el organismo no es manipulable genéticamente mediante clonaje, siguiendo las múltiples estrategias desarrolladas en los últimos años como la estrategia TAR (Transformation-associated recombination) (Yamanaka et al. 2014) y el método de Gibson, basado en el ensamblaje de múltiples fragmentos en un vector (Gibson et al. 2009), así como el uso de PACs (*P1-derived Artificial Chromosomes*) optimizados para la integración de forma estable y mediante conjugación de grandes fragmentos de ADN de hasta 200 Kb (Tocchetti et al. 2018).

La expresión heteróloga se podrá llevar a cabo en diferentes cepas hospedadoras diseñadas para la expresión eficiente de estos metabolitos secundarios como *Streptomyces coelicolor* M1152 y M1154, o *Streptomyces albus* J1074, que en el pasado han sido empleadas de forma

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	10/20



162066173131328526

exitosa para la expresión heteróloga de agrupaciones génicas codificantes de metabolitos secundarios.

El desarrollo en los últimos años de técnicas para la explotación de CRISPR-Cas9 para la edición de genomas ha supuesto una revolución en el campo de la biosíntesis de productos naturales microbianos, en donde la manipulación/edición de los genes biosintéticos supone un cuello de botella (Choi and Lee, 2016). Se llevará a cabo la edición de genes de la agrupación génica responsable de la biosíntesis de cada compuesto en el hospedador heterólogo utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 adaptada a actinomicetos, lo que nos permitirá profundizar en nuestro conocimiento de la biosíntesis de cada compuesto y a la vez generar nuevos análogos que serán evaluados en su perfil de bioactividad.

El grupo de Microbiología tiene amplia experiencia previa en el clonaje y expresión de una amplia variedad de nuevas rutas biosintéticas correspondientes a moléculas de diferentes clases estructurales, y que será esencial para el desarrollo del proyecto (Sanchez-Hidalgo et al.; 2020; Oves-Costales et al., 2020, Ortiz-López et al., 2020; Roman-Hurtado et al, 2021).

Referencias

- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug D., Kim, H.U., Bruccoleri, R., Lee, S.Y., Fischbach, M.A., Müller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano E., Medema M.H., antiSMASH 3.0- a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters, *Nucleic Acids Res.* 2015, *43*, W237-W243
- Yamanaka, K., Reynolds, K.A., Kersten, R.D., Ryan, K.S., González, D.J., Nizet, V., Dorrestein, P.C., Moore, B.S. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yield the antibiotic taromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2014, *111*, 1957-1962
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases *Nat. Methods*, 2009, *6*, 343-345
- Tocchetti, A., Donadio, S., Sosio, M. large inserts for big data: artificial chromosomes in the genomic era. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018, *365*, fny064
- Choi, K.R., Lee, S.Y. CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnol. Adv.* 2016, *34*, 1180-1209
- Sánchez-Hidalgo M, Martín J, Genilloud O. Identification and Heterologous Expression of the Biosynthetic Gene Cluster Encoding the Lasso Peptide Humidimycin, a Caspofungin Activity Potentiator. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2). pii: E67.
- Oves-Costales D, Sánchez-Hidalgo M, Martín J, Genilloud O. Identification, Cloning and Heterologous Expression of the Gene Cluster Directing RES-701-3, -4 Lasso Peptides Biosynthesis From a Marine *Streptomyces* Strain. *Mar Drugs*. 2020 May 1;18(5):238.
- Ortiz-López FJ, Carretero-Molina D, Sánchez-Hidalgo M, Martín J, González I, Román-Hurtado F, de la Cruz M, García-Fernández S, Reyes F, Deisinger JP, Müller A, Schneider T, Genilloud O. Cacaoidin, First Member of the New Lanthidin RiPP Family. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2020 59(31):12654-12658.
- Román-Hurtado F, Sánchez-Hidalgo M, Martín J, Ortiz-López FJ, Carretero-Molina D, Reyes F, Genilloud O. One Pathway, Two Cyclic Non-Ribosomal Pentapeptides: Heterologous Expression of BE-18257 Antibiotics and Pentaminomycins from *Streptomyces cacaoi* CA-170360. *Microorganisms*. 2021 Jan 8;9(1):135.

3. Proyección e impacto internacional de la propuesta por cada una de las áreas científico-técnicas, en su caso.

Los resultados globales del proyecto están dirigidos al desarrollo de nuevos fármacos antiinfecciosos y antitumorales que respondan a necesidades terapéuticas para la población mundial como los definidos en el Plan de Acción Global de la OMS para combatir la multirresistencia (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>), y el cáncer (<https://www.who.int/cancer/es/>) que tendrán no solo un elevado impacto a nivel clínico, sino también a nivel social y económico.

En cuanto al impacto científico-técnico, esta propuesta plantea hipótesis y metodologías novedosas integrando todas las nuevas aproximaciones y tecnologías de vanguardia en

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	11/20
 162066173131328526			

biología celular para el descubrimiento de nuevos fármacos, así como aquellas aplicadas en biotecnología y la biología sintética a la expresión y caracterización de nuevas moléculas derivadas de microorganismos. Desde la perspectiva metodológica, se proponen estrategias novedosas para abordar el descubrimiento racional de inhibidores como son las tecnologías de imagen y 3D, que simulan ambientes más similares a los que un fármaco tiene que enfrentarse en los tejidos del cuerpo humano, lo que aporta enormes ventajas para el desarrollo de fármacos. La aproximación que se propone al problema es multidisciplinar y conjuga la aplicación de metodologías en el campo de la microbiología, biología y química de vanguardia y el desarrollo de nuevas aplicaciones de ensayos, como son los esferoides y “cell-painting”. Esperamos que la sinergia entre las distintas aproximaciones permita avanzar significativamente hacia el descubrimiento de nuevos inhibidores como potenciales agentes antiinfecciosos (incluyendo antivirales) y antitumorales. La metodología desarrollada será, asimismo, de aplicabilidad general en otros sistemas relevantes en biomedicina o biotecnología.

La difusión de los resultados será de libre acceso y se realizará fundamentalmente a través de publicaciones en revistas científicas internacionales situadas en las primeras posiciones de sus respectivas áreas y comunicaciones en congresos científicos y reuniones especializadas. Nuestro equipo de investigación mantiene importantes colaboraciones internacionales con grupos académicos y empresas en las distintas áreas a través de al menos 6 consorcios, financiados a través del programa H2020 o fundaciones privadas (NovoNordisk Fund, Fundación LaCaixa) con colaboraciones específicas con grupos de investigación a nivel global (DTU Biosustain Dinamarca, DNDi y Institut Pasteur Korea), con los que compartimos el interés por los objetivos científicos de estas líneas de investigación, y que constituyen, por tanto, una plataforma excelente para catalizar futuras solicitudes de financiación a nivel internacional en el contexto del nuevo Horizonte Europa y otras convocatorias internacionales (NIH, fundaciones privadas).

En el campo de la química biológica y la farmacología, MEDINA es miembro fundador de la infraestructura europea ERIC-EU-OPENSSCREEN (<https://www.eu-openscreen.eu>), y está directamente relacionado con los más de 24 centros europeos de screening y química biológica de 8 países, desarrollando y poniendo a disposición de la comunidad científica internacional una de las mayores plataformas en red europeas para el cribado de alta densidad y el desarrollo de ensayos y descubrimiento de fármacos. En particular MEDINA ha liderado desde EU-OPENSSCREEN el paquete de trabajo de descubrimiento de nuevos fármacos para combatir las nuevas variantes de SARS-CoV-2 y otras infecciones emergentes en la propuesta presentada recientemente por el consorcio de Infraestructuras Europeas ISIDORE a la convocatoria HE-INFRA-2021-EMERGENCY-02 de la Comisión Europea. Además MEDINA mantiene una estrecha relación con el mundo biofarmá y biotecnológico, y es miembro asociado de la BEAM Alliance, asociación de SMEs europeas para el desarrollo de nuevos antiinfectivos (<https://beam-alliance.eu>). Así mismo MEDINA pertenece a diferentes redes nacionales como la Red de descubrimiento Temprano de Fármacos ES-OPENSSCREEN, a la Red del ISCIII de Investigación en Enfermedades tropicales (RICET), y es miembro fundador de la nueva Asociación Española para el Descubrimiento de Fármacos creada a partir de la Spanish Drug Discovery Network (SDDN).

Desde el campo de la química de productos naturales, MEDINA es un centro de referencia en la investigación de productos naturales reconocido internacionalmente y con numerosas colaboraciones europeas con grupos especializados en el descubrimiento y caracterización de nuevas moléculas, gran parte de ellas financiadas por consorcios europeos de los programas FP7 y H2020 (PHARMASEA, MARPIPE, BLUE AND GREEN) con cuyos miembros mantiene actualmente colaboraciones activas (M. Jaspars, Univ Aberdeen; T. Larsen, Technical University of Denmark DTU; Deniz Tasdemir, GEOMAR Centre for Marine Biotechnology, Kiel). Así mismo participa en nuevos consorcios, como es el nuevo COST Action Ocean4Biotech (<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00278>). Todo ello va a asegurar una proyección e impacto internacional de los resultados del proyecto en esta comunidad científica como viene siéndolo hasta ahora a través de sus publicaciones.

En el terreno de la biotecnología, y la producción de metabolitos por microorganismos, los resultados de esta propuesta tendrán igualmente gran impacto para la comunidad internacional en cuanto al descubrimiento de nuevos compuestos y rutas de biosíntesis como

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	12/20
 <small>162066173131328526</small>			

viene siendo en los últimos años a través de sus colaboraciones en proyectos europeos (TOPCAPI, IIMENA, MARBLES, NACTAR) y publicaciones relacionadas con sus estudios del metaboloma microbiano y el análisis de la biosíntesis y expresión heteróloga de nuevos productos naturales activos, y de su interacción con grupos de investigación de pioneros en este campo (T. Weber (DTU Biosustain, Dinamarca), G.van Wezel (Univ Leiden), M. Medema (U. Wageningen), E.Takano (U. Manchester) entre otros).

Es probable que como resultado de este proyecto multidisciplinar se identifiquen compuestos cabeza de serie de interés para el desarrollo de nuevos antitumorales, antivirales y antimicrobianos que podrían constituir la base para nuevas terapias contra cánceres y enfermedades infecciosas para las que actualmente no se dispone de tratamiento o los existentes son problemáticos. Como tales, estos resultados serían muy posiblemente de interés para compañías biotecnológicas o farmacéuticas con quienes mantiene contactos regulares y con las cuales se negociarían licencias para su desarrollo, una vez que se hubiera protegido la propiedad intelectual generada en MEDINA bajo patentes internacionales.

4. Adecuación de la propuesta a las prioridades temáticas del PAIDI 2020 (2).

La propuesta pretende responder a la necesidad urgente de desarrollar nuevos antibióticos y antivirales con nuevos modos de acción y nuevas moléculas con propiedades anticancerígenas, y ofrece la oportunidad de identificar nuevos productos naturales que puedan servir de punto de partida en esta búsqueda.

La gestión de la resistencia antimicrobiana y el desarrollo de nuevos antibióticos que puedan ofrecer alternativas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas se integran dentro de una de las líneas directrices de la nueva Estrategia de investigación e innovación en salud en Andalucía. Dicha estrategia busca garantizar que la actividad investigadora en el Sistema de Agentes del Conocimiento de Andalucía esté orientada a la obtención de resultados, a la traslación y aplicabilidad en salud, a la transferencia tecnológica de los conocimientos resultantes de la investigación, y a la excelencia científica, contribuyendo al progreso social y económico de Andalucía. En ese contexto la propuesta busca dar respuesta a un importante problema de salud pública, establecer avances y técnicas innovadoras que puedan repercutir directamente en las futuras líneas de investigación en el centro y para el resto de los grupos de investigación andaluces trabajando en el campo del desarrollo de fármacos. Esta actuación viene reforzada por la importancia de responder dentro de este marco a las necesidades terapéuticas para el tratamiento de infecciones virales como es el SARS-CoV-2 y sus nuevas variantes, o futuros agentes infecciosos emergentes que podrán ser de gran impacto debidos al cambio climático, y que se enmarca de manera relevante en la estrategia de salud andaluza.

Por otra parte, más de 40.000 nuevos casos de cáncer se diagnosticaron en Andalucía en 2017, y se estima que la incidencia llegará a más de 56.000 nuevos casos anuales en 2035, según datos de la Sociedad Andaluza de Oncología Médica (SAOM). Se estima que una de cada tres personas tendrá algún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Aunque es cierto que debido a la mejora en los tratamientos y al diagnóstico temprano tanto la calidad como la esperanza de vida han mejorado en los últimos años, sigue siendo una de las enfermedades más prevalentes en nuestra comunidad. Los datos sobre la incidencia de cáncer en Andalucía se encuentran en la media del resto de España. Queda por lo tanto patente el problema al que se enfrenta la sociedad, que no está resuelto, y que hace que el desarrollo de nuevos fármacos y terapias suponga no solo una oportunidad, sino también una obligación.

Dentro de las prioridades identificadas para Andalucía como parte de la Estrategia RIS3-Andalucía, el proyecto propuesto esta englobado en la categoría de “Salud y bienestar social”, y puede tener un claro efecto sobre la gestión de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de nuevos tratamientos antitumorales, constituyendo el germen de un posible futuro impacto indirecto en el coste asistencial relacionado con la gestión hospitalaria de los problemas derivados de las enfermedades infecciosas y oncológicas.

5. Trayectoria en I+D+i de la entidad solicitante referida a los últimos 5 años y desglosada por áreas científico-técnicas en la que se realiza solicitud de algún contrato.

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	13/20



162066173131328526

Descripción de la plantilla de investigación

La Fundación MEDINA es un Centro de Investigación en Medicamentos Innovadores enfocado en el descubrimiento de nuevas entidades químicas derivadas de productos naturales de origen microbiano con actividad biológica y aplicación sobre un amplio espectro de áreas terapéuticas que puedan constituir el punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos en fases pre-clínicas y clínicas. Su actividad investigadora actual se organiza alrededor de tres departamentos o áreas principales (Microbiología, Química de Productos Naturales, y Screening y Validación de Dianas) que le han permitido bajo el liderazgo de su dirección científica y los directores de área, establecer una continuidad al antiguo centro de MSD y a más de 50 años de experiencia en descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales. MEDINA es un centro de investigación multidisciplinar enfocado en la investigación de medicamentos y compuestos bioactivos de interés a partir de productos naturales de origen microbiano así como en la evaluación de fármacos en fases preclínicas a través de una plataforma de ensayos que permite la evaluación de los riesgos cardiotoxicos y neurotóxicos de nuevos compuestos en desarrollo, así como posibles interacciones medicamentosas, claves en las etapas tempranas de desarrollo de cualquier molécula. Además, participa de manera activa en la identificación de nuevos marcadores metabólicos que puedan usarse como herramienta en el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades.

El equipo de la Fundación MEDINA proviene de un grupo de referencia en España en el descubrimiento preliminar de fármacos a partir de Productos Naturales por su trabajo previo desarrollado en el Centro de Investigación Básica de España (CIBE) de Merck Sharp & Dohme de España S.A. El mismo se ha complementado con la incorporación de investigadores provenientes de otras empresas como PharmaMar SA, líder mundial en descubrimiento de fármacos de origen marino, así como de investigadores de reconocido prestigio en el campo de la Resonancia Magnética Nuclear, la Biología Celular del Cáncer o la Química y Biología de Sistemas Biosintéticos. La amplia experiencia del grupo es resultado de más de 20 años de investigación continuada en proyectos de I+D+i desde dentro de la industria farmacéutica y biotecnológica, y de colaboraciones con instituciones científicas públicas y privadas en España y a nivel internacional.

La plantilla de MEDINA está constituida en la actualidad por 28 investigadores, de los cuales 20 poseen el título de doctor, y 11 técnicos de laboratorio, dedicados en exclusiva a actividades de I+D, que bajo supervisión de la Dirección Científica garantizan el desarrollo de los proyectos competitivos concedidos a la Fundación. Son doctores en Ciencias Biológicas, Químicas y Farmacéuticas, así como licenciados y máster con amplia experiencia en el descubrimiento de fármacos en el entorno de investigación de una multinacional farmacéutica y del entorno académico. El equipo de investigación está liderado por su directora científica y los responsables de área, todos ellos investigadores de relevancia internacional por su trayectoria investigadora en el descubrimiento de nuevos fármacos (Índice h (GS): O. Genilloud (41), F. Vicente (40), F. Reyes (30))

Investigadores incorporados

Durante el período 2016-2020 se han incorporado a la plantilla de MEDINA un total de 8 nuevos investigadores postdoctorales en proyectos financiados por convocatorias públicas de los programas europeos FP7 y H2020 (3), Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación de Brasil (1) el Instituto de Salud Carlos III (RICET, 1) y la convocatoria de Proyectos de I+D+i para entidades privadas de la Junta de Andalucía en el año 2018 (3). En el año 2021 se ha dado continuidad laboral a una de las investigadoras postdoctorales previamente asignada a uno de los proyectos H2020 a través de un proyecto concedido por la Fundación La Caixa para la búsqueda de nuevos agentes antiparasíticos que coordina MEDINA.

Además, la fundación ha conseguido también financiación para la realización de tesis doctorales por parte de 3 investigadores, pertenecientes a los programas H2020 (ETN MarPipe, 1 investigador), y un proyecto concedido por la Fundación Novo Nordisk (IIMENA, 2 investigadores).

Recursos financieros obtenidos en convocatorias competitivas

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	14/20
 162066173131328526			

En los últimos 5 años (2016-2020) la fundación ha conseguido financiación en convocatorias competitivas por un total de 7.754.350,02€ euros dentro de programas europeos, nacionales, regionales y de instituciones privadas tales como la Fundación Novo Nordisk y la Fundación la Caixa. La relación de proyectos que han obtenido financiación en dichas convocatorias y su cuantía se detalla a continuación:

1. FP7-KBBE.2012.3.2-01. Grant Agreement no: 312184. "**PharmaSea: Increasing value and flow in the marine biodiscovery pipeline**", Marcel Jaspars (Scientific Coordinator), José Fernando Reyes (WP2 Leader), European Commision FP7, 2012-2017, 849.882,48€
2. IMI-ND4BB 2013-2016 **European Gram Negative Antibacterial Engine (ENABLE)**, Rob Scavenger (GSK, coordinator), O Genilloud (Representante de MEDINA), 34 participantes, Innovative Medicines Initiative (IMI)- New Drugs for Bad Bugs ND4BB, 2013-2018., 346.498,80€
3. FP7-PEOPLE-2013-IAPP. Grant Agreement no:612276 "**MICROSMETICS Exploitation of microbial biodiversity for the discovery and development of novel cosmeceutical agents**", N. Fokkialakis (University of Athens), O Genilloud (Representante MEDINA), FP7, 2013-2017., 227.471,72€
4. H2020-MSCA-RISE-2015. Grant agreement No: 690944 "**Ocean Medicines**" Donatella de Pascale (CNR, Nápoles, coordinadora) José Fernando Reyes (Representante de MEDINA y coordinador de uno de los paquetes de trabajo, WP5), European Commision H2020, 2015-2019., 36.000€
5. H2020- TWINN-2015. Grant agreement no: 692419. **BLUEandGREEN-Boosting scientific excellence and innovation capacity in biorefineries based on marine resources**. Vitor Vasconcelos (CIIMAR, Oporto, coordinador) Francisca Vicente (Representante de MEDINA). European Commision H2020, 2015-2019., 136.031,01€
6. RTC-2016-5674-1. **Metabreast. Determinación de perfiles metabolómicos en el diagnóstico precoz del cáncer de mama**. Implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta al tratamiento. Atrys (empresa coordinadora), MEDINA (participante). Convocatoria Retos-colaboración del Ministerio de Economía y competitividad. 2016-2019., 150.752€
7. RD16/0027/0015. **Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales (RICET)**. Francisca Vicente (IP, MEDINA). Instituto de Salud Carlos III. 2016-2020., 114.559,50€
8. H2020-MSCA-ITN-2015. Grant agreement no: 721421. **MarPipe-Improving the flow in the pipeline of the next generation of marine biodiscovery scientists**. Donatella de Pascale (CNR-Italia, coordinadora) José Fernando Reyes (Representante de MEDINA y coordinador de uno de los paquetes de trabajo, WP6) European Commision H2020, 2016-2020, 247.873€
9. H2020-NMBP-BIO-2016. Grant Agreement no: 720793. **TOPCAPI- Thoroughly Optimised Production Chassis for Advanced Pharmaceutical Ingredients**. Eriko Takano (University of Manchester, coordinadora) Olga Genilloud (Representante de MEDINA y coordinadora de uno de los paquetes de trabajo, WP4) European Commision H2020, 2016-2020 , 499.375€
10. BIO2016-78746-C2-1-R: **Identificación y optimización de inhibidores de la gemación vírica: hacia el desarrollo de antivirales de amplio espectro**. Irene Luque Fernández (UGR, IP y coordinadora) María Francisca Vicente Pérez (MEDINA, IP Subproyecto) 2017-2021., 23.000€
11. Asociación Duchenne Parent Project España: **MDN-0005 as a new therapeutic tool targeting muscle regeneration and inflammatory response in DMD**. Francisco Hernández Torres (Universidad de Jaén, IP), José Rubén Tormo y Carmen Ramos Martín (Investigadores, MEDINA).(2019-2020) 24.000 €
12. Novo Nordisk Foundation: **IIMENA-Integration of Informatics and Metabolic Engineering for the discovery of Novel Antibiotics**. Tilmann Weber (DTU, Copenhague, coordinador) Olga Genilloud (Representante de MEDINA y coordinadora de uno de los paquetes de trabajo, WP1) 2017-2023, 1.986.824,86€

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	15/20



162066173131328526

13. H2020-INFRADEV-2018-1. Grant Agreement no: 823893. **EU-OPENSREEN-DRIVE-** Ensuring long-term sustainability of excellence in chemical biology within Europe and beyond. European Commission H2020, Olga Genilloud IP. 2018-2022. 196.091,25€
14. CDTI- **TRIDs4DEB: Inductores de la traducción en mutaciones sin sentido para la epidermólisis bullosa distrófica** Almirall coordinador, MEDINA (IP F. Vicente) 2020-2022, 210.140€
15. PI19/00921. **Nuevos antibióticos contra patógenos Gram negativos multirresistentes.** Proyectos de investigación en Salud de la Acción estratégica en Salud 2017-2010. Instituto de Salud Carlos III. Olga Genilloud IP. 2020-2022. 141.570 €
16. RTC2019-007357-1 **Firma molecular en biopsia líquida para respuesta a radioterapia y recaída temprana en cáncer de próstata.** Atrys (empresa coordinadora), MEDINA (participante). Convocatoria Retos-colaboración del Ministerio de Economía y Competitividad. AEI 2020-2023., 121.026,40€
17. PY18-RE-0027. **Caracterización de microorganismos asociados a líquenes de afloramientos yesíferos como fuente de metabolitos antimicrobianos frente a fitopatógenos y estudio de sus implicaciones biológicas.** Proyectos de I+D+i para entidades de carácter privado del año 2018 (PAIDI 2020). José Fernando Reyes IP. 2020-2022. 344.425 €
18. PY18-RE-0030. **Nueva aproximación para el descubrimiento de compuestos microbianos que induzcan la biosíntesis de nuevos antibióticos en actinomicetos.** Proyectos de I+D+i para entidades de carácter privado del año 2018 (PAIDI 2020). Ignacio Pérez-Victoria IP. 2020-2022. 306.020 €
19. PY18-RE-0031. **En busca de nuevos antibióticos derivados del nuevo inhibidor de la replicación bacteriana kibdelomicina.** Proyectos de I+D+i para entidades de carácter privado del año 2018 (PAIDI 2020). Olga Genilloud IP. 2020-2022. 380.313 €
20. PY18-RE-0041. **Búsqueda de nuevos inhibidores anti-tumorales procedentes de productos naturales del punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 e inhibidores de traslocación nuclear.** Proyectos de I+D+i para entidades de carácter privado del año 2018 (PAIDI 2020). María Francisca Vicente IP. 2020-2022. 277.400 €
21. HR20-00584. **Discovery of new antiparasitic drug candidates and innovative modes of actions from Microbial Natural Products.** La Caixa Health Research HR20. Olga Genilloud IP. 2020-2023. 697.351 €
22. H2020--**FNR-2020-2 Marine Biodiversity as Sustainable Resource of Disease-Suppressive Microbes and Bioprotectants for Aquaculture and Crop Diseases** MARBLES- Grant Agreement no:101000392; G van Wezel, University of Leiden (coordinador); O. Genilloud (IP MEDINA, coordinadora WP5), 2021-2026 685.618 €

Producción científica

El equipo de la Fundación MEDINA ha publicado en el periodo 2016-2020 un total de 71 publicaciones en revistas científicas del primer cuartil (Q1) y 39 publicaciones en revistas del segundo cuartil (Q2) según el Journal Citation Reports y 8 capítulos de libro como fruto de su investigación interna y en los distintos proyectos nacionales y europeos en los que ha participado, así como a través de colaboraciones científicas. Para las publicaciones de 2020 se ha usado el índice de impacto correspondiente al año 2019, aun cuando la progresión de algunas de las revistas permite augurar que algunas de las publicaciones Q2 muy probablemente pasarán a ser Q1 en 2020. La siguiente tabla muestra la distribución de las publicaciones de MEDINA por revistas y cuartil:

Nº publicaciones en cada revista	Revistas Q1	Revistas Q2
9	J Nat Prod, Mar Drugs (2016, 2017, 2018)	

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	16/20



162066173131328526

8	Front Microbiol (2018, 2019, 2020)	Molecules
7		Mar Drugs (2019, 2020)
4	Sci Rep	
3	Antibiotics (2019, 2020), Planta Med, Appl Environ Microbiol, Neuropharmacology	Nat Prod Res, Front Microbiol (2017)
2	Front Mar Sci, Front Pharmacol, Curr Opin Microbiol, PLoS One	Metabolites, Tetrahedron Lett, Expert Opin Ther Patents, Tetrahedron
1	J Org Chem, Org Lett, Angew Chem Int Ed, J Med Chem, Cell Mol Life Sci, Cancer, Environmental Res, BMC Compl Med Ther, Eur J Med Chem, Mol Pharm, Org Biomol Chem, ACS Chem Neurosci, Nat Prod Rep, J Chromatogr A, Food Chem, Talanta, J Ethnopharmacol, Antimicrob. Agents Chemother, Food Chem Toxicol, ACS Infect Dis, Phytomedicine	Pathogens, ACS Chem Biol, Bioorg Med Chem Lett, Int J Environ Res Public Health, BMC Syst Biol, Antibiotics (2018), Bioanalysis, J Biomol Screen J Biotechnol, Plant Byosyst

Además, en el año 2021 se han publicado hasta la fecha un total de 15 artículos en revistas Q1 y 5 artículos en revistas Q2.

Un listado completo de la producción científica de MEDINA está disponible en: <https://www.medinadiscovery.com/research/scientific-publications/>

Se han dirigido y defendido por investigadores de la Fundación MEDINA un total de 4 tesis doctorales en los últimos 5 años, dos de ellas con mención internacional (MI). Tres de ellas se han defendido en la Universidad de Granada (José Pérez del Palacio (MI, 2017), Víctor González Menéndez (MI, 2019) y Caridad Díaz Navarro (2020)) y la cuarta en la Universidad Complutense de Madrid (Mercedes de la Cruz Moreno (2019)). Además, se encuentran en su fase final de desarrollo o en redacción otras cuatro tesis doctorales, tres en la Universidad de Granada (Fernando Román Hurtado, Daniel Carretero Molina y María Kokkini) y una en la Universidad de Alcalá de Henares (Gloria Crespo Sueiro).

Recursos financieros captados mediante contratos de investigación con empresas o entidades privadas

La fundación MEDINA ha conseguido financiación en los últimos 5 años por un valor global de 7.582.174,06 euros como fruto del desarrollo de contratos con empresas y centros públicos y privados. Estos incluyen contratos con multinacionales y biotech biofarmacéuticas, y del sector agro, y biotecnológico (Genentech, MSD Animal Health, Ginkgo Bioworks, Demuris, Syngenta, Novozymes, Apha-Bio, Invaio, Basf y otras instituciones cuya identidad no se revela por motivos de confidencialidad).

Patentes y licencias concedidas

MEDINA es titular de dos nuevas patentes desde el año 2016 (WO 2016/174226 A1 y WO 2016/128401 A1) que describen el uso de nuevos productos naturales microbianos en el tratamiento del cáncer. Además, varios investigadores de los departamentos de química y screening de la fundación figuran como coinventores en cuatro patentes nacionales presentadas en los últimos 5 años por la Universidad de Oviedo (ES2585929 A1, ES2605011

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	17/20
 162066173131328526			

A1, ES2613746 A1 y ES2752040 A1) que reivindican el uso de productos naturales microbianos de origen marino en el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

Como resultado de la colaboración con la empresa APHEA-Bio, MEDINA es también co-titular en dos patentes europeas WO/2018/060519 y WO/2020/161351 extendidas a EEUU para el uso de microorganismos para la mejora del crecimiento de plantas y su resistencia a fitopatógenos.

Así mismo MEDINA ha firmado recientemente nuevos acuerdos de licencia con diferentes compañías, entre las que destaca el acuerdo de licencia con Prokaryotics para el desarrollo preclínico del nuevo antibiótico medinamicina (abril 2019), y diferentes licencias de uso de microorganismos productores de antibióticos (1 Genentech, 21 WarpDrive) o con actividad en biocontrol y bioestimulante del crecimiento en plantas (7 Novozymes, 10 Apeha).

Indicadores relevantes de internacionalización:

Por lo que respecta a la proyección internacional de la Fundación MEDINA, esta participa o ha participado en los últimos 5 años en 10 consorcios europeos financiados con fondos públicos de los programas FP7 (PharmaSea) y H2020 (Ocean Medicines, Microsmetics, Blue & Green, MarPipe, TOPCAPI y EU-OPENSSCREEN-DRIVE), la Innovative Medicines Initiative (ENABLE) o con fondos privados de la Fundación NovoNordisk (IIMENA) y la Fundación La Caixa. En este último consorcio MEDINA actúa como coordinadora de un equipo de trabajo en el que además participan el Instituto Pasteur de Corea (IPK) y la Drug for Neglected Diseases initiative (DNDi). El título completo y la financiación obtenida en cada uno de estos proyectos se han detallado anteriormente. MEDINA es beneficiaria en un nuevo proyecto H2020 MARBLES concedido en 2021 y en el que coordina uno de los principales paquetes de trabajo. Como resultado de la interacción con las instituciones participantes en estos consorcios se han llevado a cabo numerosos intercambios de personal entre las instituciones participantes, algunos de ellos motivados por la propia naturaleza de algunos de los proyectos cuyo objetivo es precisamente el intercambio de investigadores. Se han recibido en MEDINA investigadores de varias universidades e instituciones europeas y mundiales tales como la Universidad de Aberdeen, la Technical University of Denmark, la Universidad de Leuven, la Universidad de Wageningen, la universidad de Leiden, la universidad de Western Cape (Sudáfrica), la Estación Zoológica de Nápoles y la National and Kapodistrian University de Atenas e investigadores de MEDINA han realizado estancias en instituciones extranjeras tales como la DTU-Biosustain, Technical University of Denmark, así como en la compañía francesa Soliance y la National and Kapodistrian University de Atenas.

6. Justificación de la necesidad e impacto de las contrataciones solicitadas en cada una de las áreas científico-técnicas

MEDINA tiene gran experiencia en el desarrollo de proyectos de descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antiinfecciosa y anticancerígena. Desde 2016, estos proyectos de investigación, junto con otros esfuerzos colaborativos, se han materializado en 90 nuevas publicaciones, 8 nuevas patentes, 13 proyectos financiados en curso. Como resultado de una producción científica tan fructífera y la relevancia de sus contribuciones, la Fundación MEDINA ha sido validada por expertos internacionales independientes como uno de los 8 centros europeos de cribado de alto rendimiento dentro de la Infraestructura Europea ERIC EU-OPENSSCREEN, que tiene el ambicioso objetivo de promover el descubrimiento de nuevos fármacos y la investigación en química biológica. MEDINA es uno de los pocos centros singulares con experiencia en productos naturales, y promueve a través de EU-OPENSSCREEN el cribado de grandes librerías de compuestos y el desarrollo de ensayos de cribado de última generación.

Para dar un mayor peso específico al desarrollo de programas innovadores para el descubrimiento de moléculas anticancerígenas y antiinfecciosas, el **Departamento de Screening y Validación de Dianas** necesita incorporar un investigador postdoctoral altamente cualificado que estaría involucrado en los aspectos de investigación del departamento relacionados con la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de ensayos para la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales y antimicrobianos a partir de

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	18/20



162066173131328526

productos naturales de origen microbiano. En el **área de cáncer**, el investigador postdoctoral se enfrentará al reto de actualizar la cartera de modelos celulares estables diana específicos. Para ello, el candidato postdoctoral deberá manejar a nivel de experto las tecnologías de biología molecular de última generación, como CRISPR y cultivos en 3D. Con respecto al **área de antiinfectivos**, el investigador postdoctoral se centrará en el estudio y desarrollo de nuevas aproximaciones y modelos de ensayo para la detección de compuestos con actividad antimicrobiana o antibiofilm y la validación de estos compuestos frente a bacterias y hongos patógenos de importancia clínica, alimentaria o veterinaria, profundizando en el estudio del mecanismo de acción de los compuestos identificados mediante el desarrollo de tecnologías de fenotipado por imagen. Las plataformas de cribado, en las que estaría involucrado el Postdoctoral del grupo de *Screening* y su aplicación al descubrimiento de nuevos productos naturales con actividad farmacológica, serán unas excelentes pruebas de concepto para incrementar la capacidad de descubrimiento de nuevas moléculas que puedan servir para un futuro desarrollo de fármacos.

En el **Departamento de Química**, el investigador postdoctoral a contratar llevará a cabo análisis preliminar mediante LC/MS de los extractos que resulten ser activos en los distintos programas de HTS de la propuesta para priorizar aquellos con mayor interés y novedad estructural de sus componentes que serán usados en las siguientes etapas. El fraccionamiento cromatográfico guiado por actividad biológica, mediante el uso de distintos soportes cromatográficos y equipos de media y alta presión y la determinación de la estructura de los nuevos compuestos, incluyendo su estereoquímica absoluta. Las capacidades analíticas en estas áreas se verán notablemente incrementadas con la contribución del nuevo investigador, lo cual se traducirá en el procesado de un mayor número de extractos bioactivos y en la obtención de un mayor número de nuevas moléculas que puedan ser usadas como candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos.

Finalmente el **Departamento de Microbiología** requiere reforzar el área de investigación enfocada en el análisis de la biosíntesis y expresión heteróloga de productos naturales activos mediante la incorporación el investigador posdoctoral con amplia experiencia en herramientas de análisis bioinformático de genomas microbianos, y otras tecnologías ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica) para el análisis de la expresión de las rutas de biosíntesis de productos naturales bioactivos y caracterización analítica, y en la utilización de herramientas moleculares de última generación aplicadas en el clonaje y expresión heteróloga de rutas de biosíntesis de bacterias y hongos productores de compuestos de interés. Su trabajo estará perfectamente integrado con los programas desarrollados por el grupo y directamente vinculado con el estudio y la optimización de la producción de los diferentes compuestos de interés para el centro tanto en los microorganismos silvestres como en huéspedes heterólogos cuando no sea posible la manipulación genética de los primeros, enfrentándose a la manipulación genética de especies microbianas no estudiadas hasta la fecha. Dicha línea de investigación permitirá contribuir a la descripción de los mecanismos de biosíntesis para las nuevas moléculas, y a su vez la valorización de dichos compuestos al conseguir asegurar el desarrollo tecnológico de nuevos procedimientos de biosíntesis, generación de análogos mediante mutagénesis dirigida, y garantizar la producción en cantidad suficiente para suplir las siguientes etapas del desarrollo preclínico de dichos compuestos.

Las investigaciones en las que participarían los investigadores postdoctorales solicitados son prioritarias para el centro y tendrían gran impacto social dado el alarmante incremento y diseminación de la resistencia bacteriana a los antibióticos, y la necesidad de obtener nuevos fármacos antivirales y anticancerígenos, patologías que constituyen actualmente uno de los mayores problemas de salud pública y sanidad animal a escala mundial, dado que los fármacos disponibles son cada vez menos eficaces, tóxicos o inexistentes y existe una necesidad urgente de dar respuestas a estas necesidades terapéuticas y encontrar nuevas alternativas para prevenir patologías con gran impacto a nivel clínico, animal, alimentario y medioambiental. El descubrimiento de estas nuevas moléculas incidiría en la generación de nueva propiedad intelectual y nuevas patentes, aumentaría la diseminación de los resultados a través de las publicaciones científicas, generando un valor adicional para la Fundación MEDINA, que redundaría directamente sobre los baremos de Investigación en la Comunidad Investigadora Andaluza y en el impacto en innovación y desarrollo tecnológico de biomedicina y salud humana principalmente.

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	19/20



162066173131328526

7. Experiencia a adquirir por el personal investigador contratado y su repercusión en la empleabilidad del mismo.

La experiencia a adquirir por el investigador postdoctoral a contratar en el departamento de *Screening* se basará en profundizar en las técnicas y el instrumental del cribado de alto rendimiento, descubrimiento de fármacos, gestión de grandes bibliotecas de fármacos, manejo de grandes bases de datos, química biológica de productos naturales...etc. Para ello, tendrá acceso a todo el equipamiento disponible en MEDINA, así como a la experiencia de todos los miembros del equipo de MEDINA, los cuales tienen gran experiencia tanto en la academia como en compañías privadas de biotecnología y farmacéuticas. La repercusión en la empleabilidad del postdoctoral le proporcionará publicaciones de artículos de relevancia nacional e internacional en cáncer, antiinfectivos y biomedicina, aspecto esencial para que el candidato desarrolle su carrera como joven investigador. A su vez también le facilitará la adquisición de capacidades, de técnicas y de gestión de especial relevancia a nivel biotecnológico y biomédico, así como la internacionalización de su CV a través de la participación en proyectos internacionales. Todo esto le proporcionará una experiencia excelente que sin duda contribuirá de forma significativa a aumentar su empleabilidad en el sector farmacéutico o en cualquier otro sector de la biotecnología relacionado con la caracterización biológica de productos naturales bioactivos.

El investigador postdoctoral por contratar en el departamento de química tendrá acceso a tecnología de última generación para el análisis, fraccionamiento cromatográfico y caracterización estructural de nuevas moléculas disponible en la Fundación MEDINA. Cabe destacar en este sentido la existencia en la institución de un equipo de resonancia magnética nuclear provisto de una criosonda de bajo volumen, única en España, que permite la determinación de la estructura de moléculas purificadas en cantidades inferiores al miligramo. La experiencia de los investigadores de la fundación en la obtención y determinación estructural de moléculas bioactivas, que en algunos casos supera los 25 años, quienes asesorarán y guiarán al investigador en el proceso, junto con el modelo de trabajo de la fundación, similar al desarrollado por la mayoría de las compañías privadas de las cuales proceden muchos investigadores de MEDINA, le proporcionará una experiencia única que sin duda contribuirá de manera significativa a aumentar su empleabilidad en el sector farmacéutico o en cualquier otro sector de la biotecnología relacionado con la obtención y caracterización de productos naturales bioactivos. Además, su participación como co-autor en publicaciones científicas de alto impacto contribuirá al desarrollo de su carrera científica y a su promoción a nivel internacional como experto en el campo de la química de productos naturales.

El investigador posdoctoral candidato del Departamento de Microbiología tendrá acceso a la mayor y más diversa colección de microorganismos, hongos y bacterias filamentosas, productores de compuestos naturales bioactivos cuyas rutas de biosíntesis están hoy en día pendientes de caracterizar. Tendrá acceso al equipamiento y software de última generación en microbiología y biología molecular para el cultivo de microorganismos, el análisis de la biosíntesis de productos naturales mediante diferentes técnicas ómicas incluida la plataforma de análisis de LC-MS del centro, y la ingeniería molecular de las rutas en una amplia batería de organismos huéspedes heterólogos. El investigador contará así mismo con la amplia experiencia del equipo de investigación que le asesorará en el cultivo y el estudio de la fisiología y metaboloma de estos microorganismos, en el análisis bioinformático y retrosintético de los nuevos compuestos como hipótesis de partida para la búsqueda de genes y funciones enzimáticas necesarias para la biosíntesis, así como la manipulación de microorganismos mediante herramientas de biología sintética y expresión heteróloga. Sin lugar a duda, la experiencia a adquirir por parte del investigador posdoctoral en un entorno extremadamente innovador en cuanto al tipo de proyectos y retos e a desarrollan un entorno sumamente multidisciplinar será de enorme valía de cara a su formación y proyección de carrera investigadora tanto en el sector académico como en un amplio rango de sectores industriales relacionados con el uso de productos derivados de procesos biotecnológicos a partir de microorganismos, un sector claramente en amplia expansión.

Código Seguro de verificación: GA5WXTURV99CD2YE9K34FMC98. Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento. Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica. Para comprobar la validez y autenticidad de este documento, puede acceder a la dirección: <https://sica2.cica.es/investigacion/public/verifyGrantForm.jsf> indicando el CSV especificado.

FIRMADO POR:	DIEGO POZAS GARCIA - 52626973Y		
ID. FIRMA	162066173131328526	FECHA Y HORA	10/05/2021 17:51
SERVIDOR	@firma v6 - Junta de Andalucía	PÁGINA	20/20
 162066173131328526			