



AREA 1

Terapie e approcci innovativi per correggere il difetto di base, genetica



Progetto FFC#6/2020

Valutazione della distribuzione e dell'attività di nuove molecole ad azione *readthrough* nel modello di topo e in altri sistemi di modello FC



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Laura Lentini**
(Dipartimento STEBICEF – Sez. di Biologia,
Università degli Studi di Palermo)



Partner: **Ivana Pibiri**

(Dipartimento STEBICEF – Sez. di Chimica,
Università degli Studi di Palermo)



Ricercatori coinvolti: 11



Qual è la durata dello studio: 2 anni

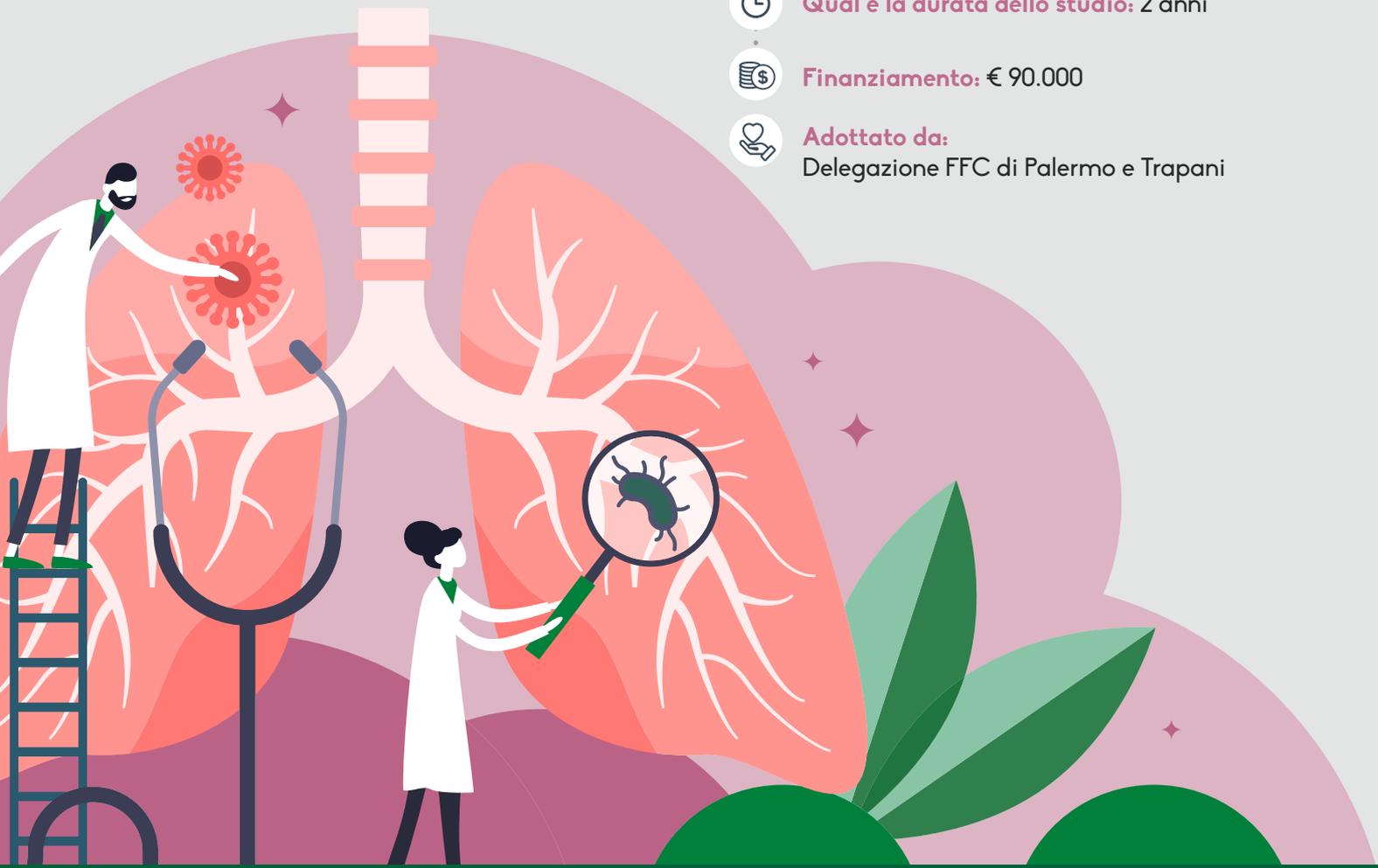


Finanziamento: € 90.000



Adottato da:

Delegazione FFC di Palermo e Trapani





Perché è importante

In Italia, circa il 20% delle persone con fibrosi cistica è portatore di mutazioni stop, responsabili dell'interruzione della sintesi della proteina CFTR, che risulta monca e viene eliminata. Le mutazioni stop non rispondono ai farmaci modulatori approvati. Un approccio terapeutico per questo tipo di mutazione è rappresentato dal *readthrough*, cioè il "superamento" del segnale di stop che consente la sintesi di una proteina completa. Le molecole con questo tipo di azione vengono definite TRIDs (*Translational Readthrough Inducing Drugs*).



Che cosa hanno usato i ricercatori

Grazie a precedenti progetti (FFC#1/2014 e FFC#3/2017) sono state individuate tre molecole con elevata attività *readthrough* e una bassa tossicità sia *in vitro* sia *in vivo* (nel modello Zebrafish), chiamate NV848, NV914, NV930. Scopo di questo progetto è stato valutarne stabilità, tossicità e biodistribuzione in modello di topo oltre all'efficacia su modelli avanzati di FC. Infine, ulteriore obiettivo è stato quello di valutarne a fondo il meccanismo d'azione, anche con simulazioni al computer.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

I composti sono stati testati su modelli animali con CFTR normale per valutarne la tossicità e la biodistribuzione. Sono stati usati anche modelli di topo con mutazioni stop su CFTR.

Per studiare come vengono metabolizzati, ovvero come vengono modificati chimicamente dall'organismo nel quale sono somministrati, è stato invece usato un modello *in vitro* di fegato umano. Infine, la loro attività ed efficacia su diversi tipi di mutazione è stata valutata grazie a organoidi intestinali isolati da persone con FC portatrici di specifiche mutazioni stop, come la G542X o la W1282X. Alcuni dei test sui TRIDs sono stati eseguiti aggiungendo anche i modulatori ora disponibili, come elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor.



Che cosa hanno ottenuto

NV848, NV914, NV930 hanno mostrato una buona stabilità metabolica e biodistribuzione e non sono emersi effetti di tossicità acuta. Negli organoidi con l'aggiunta dei modulatori, è stato osservato un moderato recupero dell'attività di CFTR. Grazie alle simulazioni al computer i ricercatori hanno inoltre identificato un ulteriore possibile bersaglio dei TRIDs, la proteina FTSJ1, coinvolta nel processo di produzione delle proteine.



Che cosa succederà ora

I risultati di questo studio forniscono in parte la convalida di molecole con attività di *readthrough* per il ripristino della funzione di CFTR. Dovranno essere condotti ulteriori studi per valutare l'efficacia e la specificità di NV848, NV914, NV930. Sono in fase di completamento gli esperimenti sul modello di topo con mutazioni stop su CFTR.

Per saperne di più



Obiettivi

Tre molecole, risultate da precedente progetto efficaci nel superare il segnale di stop nella sintesi della proteina CFTR, verranno valutate su modello animale per confermarne l'efficacia *in vivo*

Le mutazioni CFTR stop comportano l'interruzione della sintesi della proteina CFTR, che risulta monca e viene eliminata. Questo gruppo di ricerca, con precedenti progetti (FFC#1/2014 e FFC#3/2017), ha messo a punto tre molecole capaci di superare efficacemente *in vitro* il segnale di stop (diverse mutazioni) contenuto nel DNA, consentendo così la sintesi completa della proteina. Il nuovo progetto intende avviare uno studio preclinico su un modello di topo transgenico contenente nel DNA il segnale di stop UGA, per valutarne l'efficacia *in vivo*. Inoltre si intende valutare la distribuzione di queste molecole *in vivo*, sempre su organismo di modello animale, studiandone altresì il meccanismo d'azione.



Risultati

Le molecole NV848, NV914, NV930 mostrano elevata attività di *readthrough* per il ripristino della funzione di CFTR in modelli animali

Le mutazioni stop rappresentano il secondo tipo di mutazione più frequente del gene CFTR. Esse causano un fenotipo severo della malattia, poiché comportano la completa assenza della proteina. Un approccio terapeutico per questo tipo di mutazione è rappresentato dal *readthrough*, cioè il "superamento" del codone di stop prematuro, meccanismo che consente di sintetizzare una proteina completa. Questo è reso possibile da farmaci noti come TRIDs (*Translational Readthrough Inducing Drugs*).

Grazie a precedenti progetti (FFC#1/2014 e FFC#3/2017) sono state identificate tre molecole che presentano elevata attività *readthrough* e una bassa tossicità sia *in vitro* sia *in vivo* (modello Zebrafish).

Scopo di questo progetto è stato quello di valutarne stabilità, tossicità e biodistribuzione in modello di topo oltre all'efficacia su modelli avanzati di FC. Infine, ulteriore obiettivo è stato quello di valutarne a fondo il meccanismo d'azione.

Sono stati usati topi senza mutazioni su CFTR per lo studio di tossicità acuta delle tre molecole NV848, NV914, NV930 e per la biodistribuzione di queste *in vivo*. Sono in corso studi di espressione di CFTR dopo il trattamento con le tre molecole in un modello di topo con mutazioni stop su CFTR. L'attività delle nuove molecole è stata valutata in organoidi umani intestinali con mutazioni stop del gene CFTR. Studi computazionali sono invece stati effettuati per comprendere il target biologico e il meccanismo d'azione delle molecole.

I risultati ottenuti hanno mostrato una buona stabilità e tollerabilità delle tre molecole NV848, NV914, NV930 *in vivo*, oltre alla capacità di raggiungere differenti distretti dell'organismo (NV848). È stato anche possibile osservare un recupero dell'attività di CFTR in organoidi intestinali FC con mutazione W1282X in combinazione a correttori e potenziatori. Inoltre gli studi hanno mostrato il possibile coinvolgimento della proteina FTSJ1 nel meccanismo del *readthrough* dei codoni stop.

I risultati di questo studio hanno un elevato potenziale traslazionale e forniscono in parte la convalida di molecole con attività di *readthrough* per il ripristino della funzione di CFTR.

Pubblicazioni



· *Investigating the Inhibition of FTSJ1, a Tryptophan tRNA-Specific 2'-O-Methyltransferase by NV TRIDs, as a Mechanism of Readthrough in Nonsense Mutated CFTR*

International Journal of Molecular Sciences, 2023



[Int J Mol Sci](#). 2023 Jun; 24(11): 9609.

PMCID: PMC10253411

Published online 2023 Jun 1. doi: [10.3390/ijms24119609](https://doi.org/10.3390/ijms24119609)

PMID: [37298560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37298560/)

Investigating the Inhibition of FTSJ1, a Tryptophan tRNA-Specific 2'-O-Methyltransferase by NV TRIDs, as a Mechanism of Readthrough in Nonsense Mutated CFTR

[Pietro Salvatore Carollo](#), Methodology, Investigation, Data curation, Writing – original draft, [Marco Tutone](#), Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, [Giulia Culetta](#), Software, Validation, Investigation, [Ignazio Fiduccia](#), Validation, [Federica Corrao](#), Validation, [Ivana Pibiri](#), Writing – review & editing, Funding acquisition, [Aldo Di Leonardo](#), Data curation, Writing – review & editing, [Maria Grazia Zizzo](#), Data curation, Writing – review & editing, [Raffaella Melfi](#), Methodology, Writing – review & editing, [Andrea Pace](#), Data curation, Writing – review & editing, [Anna Maria Almerico](#), Conceptualization, Writing – review & editing, and [Laura Lentini](#), Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition*

Alfredo Ciccodicola, Academic Editor

• [Author information](#) • [Article notes](#) • [Copyright and License information](#) • [PMC Disclaimer](#)

Department of Biological, Chemical, and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, 90128 Palermo, Italy; pietrosalvatore.carollo@community.unipa.it (P.S.C.); giulia.culetta@unipa.it (G.C.); ignazio.fiduccia@unipa.it (I.F.); federica.corrao01@unipa.it (F.C.); ivana.pibiri@unipa.it (I.P.); aldo.dileonardo@unipa.it (A.D.L.); mariagrazia.zizzo@unipa.it (M.G.Z.); raffaella.melfi@unipa.it (R.M.); andrea.pace@unipa.it (A.P.); annamaria.almerico@unipa.it (A.M.A.)

*Correspondence: marco.tutone@unipa.it (M.T.); laura.lentini@unipa.it (L.L.)

Funding Statement

[Go to:](#) ▶

The research leading to these results has received funding from the European Union-NextGenerationEU through the Italian Ministry of University and Research under PNRR-M4C2-11.3 Project PE_00000019 "HEAL ITALIA" to Ivana Pibiri and Laura Lentini CUP B73C22001250006 (Dip. STEBICEF-University of Palermo) and by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation with FFC#06/2020 grant to Laura Lentini and Ivana Pibiri.

Publicazioni



- **Nonsense codons suppression. An acute toxicity study of three optimized TRIDs in murine model, safety and tolerability evaluation**
Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023

Biomedicine & Pharmacotherapy 156 (2022) 113886



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Biomedicine & Pharmacotherapy

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



Nonsense codons suppression. An acute toxicity study of three optimized TRIDs in murine model, safety and tolerability evaluation

Federica Corrao^a, Maria Grazia Zizzo^a, Marco Tutone^a, Raffaella Melfi^a, Ignazio Fiduccia^a,
Pietro Salvatore Carollo^a, Aldo Di Leonardo^a, Gaetano Caldara^a, Riccardo Perriera^a,
Andrea Pace^a, Beatrice Belmonte^b, Selene Sammataro^b, Ivana Pibiri^{a, *}, Laura Lentini^{a, *}

^a Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, Palermo, Italy
^b Tumor Immunology Unit, Department PROMISE, University of Palermo, Palermo, Italy



Funding

This work was supported by Fondazione Fibrosi Cistica (FFC) (Del. Palermo and Trapani, Italia), [Grant FFC#6/2020].

Publicazioni



- **Readthrough Approach Using NV Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs): A Study of the Possible Off-Target Effects on Natural Termination Codons (NTCs) on TP53 and Housekeeping Gene Expression**
International Journal of Molecular Sciences, 2023



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Readthrough Approach Using NV Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs): A Study of the Possible Off-Target Effects on Natural Termination Codons (NTCs) on TP53 and Housekeeping Gene Expression

Riccardo Perriera , Emanuele Vitale, Ivana Pibiri *, Pietro Salvatore Carollo, Davide Ricci, Federica Corrao, Ignazio Fiduccia, Raffaella Melfi , Maria Grazia Zizzo, Marco Tutone , Andrea Pace  and Laura Lentini *

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze Ed. 16-17, 90128 Palermo, Italy; riccardo.perriera@unipa.it (R.P.); emanuele.vitale@unipa.it (E.V.); piersalvo21@gmail.com (P.S.C.); davide.ricci@unipa.it (D.R.); federica.corrao01@unipa.it (F.C.); ignazio.fiduccia@unipa.it (I.F.); raffaella.melfi@unipa.it (R.M.); mariagrazia.zizzo@unipa.it (M.G.Z.); marco.tutone@unipa.it (M.T.); andrea.pace@unipa.it (A.P.)
* Correspondence: ivana.pibiri@unipa.it (I.P.); laura.lentini@unipa.it (L.L.); Tel.: +39-091-238-97545 (I.P.); +39-091-238-97341 (L.L.)

Funding: The research leading to these results has received funding from the European Union-NextGenerationEU through the Italian Ministry of University and Research under PNRR-M4C2-I1.3 Project PE_00000019 "HEAL ITALIA" to Ivana Pibiri and Laura Lentini CUP B73C22001250006 (Dip. STEBICEF-University of Palermo), and by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation with FFC#06/2020 grant to Laura Lentini and Ivana Pibiri. The views and opinions expressed are those of the authors only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Commission. Neither the European Union nor the European Commission can be held responsible for them.

Rendiconto economico



AREA 1

Terapie e approcci innovativi per correggere il difetto di base, genetica

Progetto FFC#6/2020

Valutazione della distribuzione e dell'attività di nuove molecole ad azione *readthrough* nel modello di topo e in altri sistemi di modello FC



Responsabile:

Laura Lentini

(Dipartimento STEBICEF – Sez. di Biologia, Università degli Studi di Palermo)



Periodo:

2020-2023



Grant assegnato:

€ 90.000



Usato per:

- Materiale di consumo € 61.109
- Spese viaggio/convegni € 869
- Borse di studio € 12.000
- Servizi scientifici € 1.092
- Spedizioni € 3.830
- Pubblicazioni scientifiche € 2.641
- Equipment € 6.232

€ 87.773



Saldo (usato per altri progetti):

€ 2.227