



Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

XVI SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri
della ricerca in fibrosi cistica

Novità in terapia genica FC

•
Personalizzare le nuove terapie

•
Ricerca FFC 2017

Verona, 19 Maggio 2018

In collaborazione con



Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata
Verona



In copertina:
Illustrazione di Saba Ferrari
"Primavera, Sorgente di Ricerca",
acquerello su cartoncino, 2018

Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello

Grafica e impaginazione: Federica Negrini

Stampa: maggio 2018, Tipolitografia Artigiana snc - San Giovanni Lupatoto (VR)



**Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus**
italian cystic fibrosis research foundation

XVI SEMINARIO DI PRIMAVERA

**Progressi recenti e sviluppi futuri
della ricerca in fibrosi cistica**

Novità in terapia genica FC

•

Personalizzare le nuove terapie

•

Ricerca FFC 2017

Hotel Tower, via Mantegna 30/S, Bussolengo (Verona Nord)
Verona, 19 Maggio 2018



Sommario

Il senso della ricerca in fibrosi cistica

Pag. 3

Gianni Mastella (Fondazione Ricerca FC, Verona)

La Terapia Genica in Fibrosi Cistica: stato dell'arte e nuovi orizzonti

Pag. 5

Giuseppe Castaldo (Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II; CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli)

Fibrosi cistica: come personalizzare le nuove terapie del difetto di base

Pag. 9

Luis J.V. Galiotta [Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA)]

Fibrosi cistica 2017: risultati dei progetti FFC nel contesto della ricerca internazionale

Pag. 15

Graziella Borgo (Fondazione Ricerca FC, Verona)

Progetti FFC conclusi nel 2017 e loro adozioni

Pag. 25



Introduzione al Seminario

Il senso della ricerca in fibrosi cistica

Gianni Mastella

(Direttore Scientifico

Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Questo appuntamento di Primavera, che si ripete da 16 anni, intende tenere il filo dell'impegno di questa Fondazione per la Ricerca in FC (FFC) a produrre nuove conoscenze per realizzare un destino migliore delle tante persone che dalla ricerca attendono nuove soluzioni terapeutiche.

È questo anche un momento per riflettere sul senso di questa nostra impresa, che è partita 60 anni orsono da un'esperienza di stretto contatto, nell'impegno di cura, con le persone malate. Sulla base di quell'esperienza arrivammo ad una concezione avanzata della pressante necessità di dare impulso alla ricerca scientifica per aprire nuove strade, atte a contrastare la malattia alle sue radici, oltre che nelle sue manifestazioni e complicanze correnti. Da un lato, quindi, gli studi per correggere il difetto di base, a livello del gene CFTR e della proteina mutata da esso codificata; dall'altro, le ricerche per migliorare le prestazioni rivolte a curare gli effetti clinici di quel difetto, con cui le persone malate debbono ancora fare quotidianamente i conti: l'infezione, l'infiammazione polmonare e le diverse complicanze.

Di questa duplice direzione di ricerca, che la Fondazione persegue, inserendosi in pieno nel contesto della ricerca internazionale, questo Seminario darà conto nelle relazioni che aggiornano sulle nuove prospettive di trattamento del gene CFTR mutato e sulle nuove modalità per predire nel singolo malato l'efficacia delle nuove terapie del difetto di base, favorendone le scelte appropriate (personalizzazione delle cure). Ne darà conto anche nella descrizione panoramica di importanti risultati ottenuti dai progetti della Rete di Ricerca FFC conclusi nell'annata 2017.

Secondo questa strategia si muove la crescente Rete di Ricerca FFC, avviata nel 2002, una larga aggregazione di ricercatori e Istituti di ricerca, cooptati negli anni alla causa della fibrosi cistica, mettendo a disposizione esperienze e competenze scientifiche diverse, maturate in altri ambiti della ricerca biomedica. Questa Rete è il vero patrimonio su cui può contare chiunque creda alla possibilità che le sorti di chi è colpito dalla malattia possano realmente cambiare. La Rete è progressivo scambio di idee e conoscenze, è interazione per progetti comuni, che richiedono spesso composizione di tecniche e discipline diverse.

Chi ci sostiene in questo sforzo si chiede talora dove potranno approdare alcuni studi, particolarmente quelli cosiddetti "di base", apparentemente lontani dal bisogno di risultati chiamati "concreti" e quindi misurabili immediatamente nel beneficio che possono portare al malato di oggi. Comprendiamo questo sentimento, particolarmente di chi vive l'incertezza della lotta quotidiana per la vita. Ma la risposta che ci sentiamo di dare è che, se affidiamo alla scienza la nostra speranza, dobbiamo anche accettarne il metodo, che è un percorso molto complesso, fatto di tappe e obiet-

tivi di maggiore o minore portata, per tentativi che presuppongono anche la capacità di ritornare daccapo quando questi non hanno abbastanza successo. Con la consapevolezza comunque che ogni risultato, piccolo o grande, positivo o meno che sia, è un contributo che, messo assieme ad altri, costruisce il sapere comune, che prima o poi porterà alle scoperte determinanti. È questo il cammino della scienza che ha rivoluzionato la vita degli uomini ed è questo il cammino che abbiamo concordato di seguire in questa nostra appassionata vicenda, che siamo certi porterà prima o poi a cambiare la storia naturale della fibrosi cistica, peraltro già in parte cambiata, grazie alla ricerca, per molte persone malate.



La Terapia genica in Fibrosi Cistica: stato dell'arte e nuovi orizzonti

Giuseppe Castaldo

(Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II; CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli)

La concezione tradizionale della terapia genica consiste nel trattare una malattia dovuta ad una mutazione genetica inserendo nelle cellule dell'organismo il gene "sano", perché svolga la funzione che quello mutato non compie. Questo obiettivo si può realizzare con due sistemi: in vivo ed ex vivo.

Nel primo caso si inserisce il gene sano in un vettore (un virus oppure un sistema non virale), e quindi il vettore viene somministrato al paziente, raggiunge le cellule bersaglio e vi trasferisce il gene sano. Nel secondo caso si prelevano le cellule dal paziente, nelle quali viene inserito il gene sano, per poi essere somministrate al paziente (si parla anche di "terapia genico-cellulare"). Se il trasferimento del gene è stato efficace, la cellula inizia a produrre la proteina normale.

Per fare questo dobbiamo prima di tutto conoscere con esattezza qual è la sequenza di basi azotate che compone il gene. Per la FC conosciamo la sequenza del gene CFTR fin dal 1989, siamo in grado di "riprodurre" il gene sano, abbiamo a disposizione i mezzi per trasferire il gene nelle cellule, eppure la terapia genica per la FC è un obiettivo ancora molto lontano, difficile da raggiungere, anche perché iniziano a svilupparsi terapie alternative in grado di contrastare in modo efficace la FC prima che la terapia genica riesca a sconfiggerla.

Quali sono le cause di questo insuccesso che dura da quasi 30 anni? Il primo motivo è proprio il carattere "sistemico" della FC, cioè il fatto che la proteina CFTR funziona in molti organi diversi e quindi la terapia genica dovrebbe avere contemporaneamente tanti bersagli diversi. Per altre malattie genetiche la terapia genica è ormai vicina all'applicazione clinica: per esempio l'emofilia. L'emofilia è una malattia in cui il gene mutato causa una minore produzione da parte del fegato di una proteina della coagulazione. Questa proteina viene rilasciata nel sangue e serve ad evitare le emorragie quando si verifica la rottura di un vaso sanguigno. Nell'emofilia la terapia genica ha un solo bersaglio (il fegato), e quindi il trasferimento del gene sano in un solo tipo di cellule è più facile.

Infatti, un aspetto importante della terapia genica è il "vettore", cioè il sistema che si usa per trasferire il gene sano nella cellula. I primi vettori utilizzati in terapia genica sono stati i virus, che hanno la caratteristica naturale di entrare in un tipo di cellula in modo specifico. Per questa ragione, ogni malattia virale colpisce principalmente un organo, proprio perché ogni virus possiede un sistema di riconoscimento specifico della cellula bersaglio.

Quindi, per introdurre un gene in una cellula si deve usare un virus specifico per quella cellula, che entri in modo efficiente ed efficace nella cellula

La terapia genica tradizionale: trasferimento di gene sano a cellule malate

In FC la terapia genica ha avuto finora successi limitati

I problemi dei "vettori" per trasferire il gene sano

così da trasferirvi una quantità sufficiente di gene “sano” (efficacia di trasferimento) ma nello stesso tempo senza causare danno alla cellula stessa. Allo stato attuale nessun tipo di vettore virale ha dimostrato di possedere queste caratteristiche nei confronti delle cellule respiratorie dei pazienti con FC, che sono state il principale bersaglio della terapia genica. In altre malattie genetiche in cui si è sperimentata la terapia genica, alcuni dei vettori virali che inizialmente sembravano innocui, con il tempo hanno dimostrato di possedere un potenziale “oncogenico”. Cioè una volta entrati nella cellula bersaglio, possono modificare il corredo genetico della cellula, e causare l’attivazione di oncogeni, cioè di geni che promuovono lo sviluppo di tumori.

Quindi, da alcuni anni si è iniziato a sperimentare nuovi vettori non virali (per esempio piccoli frammenti artificiali di membrane cellulari o altri mezzi, come microparticelle lipidiche, chiamate “liposomi”). Però è ancora presto per stabilire la loro efficacia. Questo dipende anche dal fatto che la sperimentazione di nuove terapie (e quindi anche di nuovi vettori per la terapia genica) deve affrontare un cammino lunghissimo prima di poter essere disponibile per i pazienti. Questo lungo cammino (chiamato trial) è scandito da alcune fasi prestabilite: fase I, fase II, fase III e fase IV. In ciascuna di queste fasi, che dura alcuni anni, si studiano alcuni aspetti della nuova terapia su un numero via via più grande di pazienti. Per esempio nelle fasi I e II (limitate a poche decine di pazienti) si valuta se il principio della nuova terapia è davvero efficace e, soprattutto, se la nuova terapia è “safe” cioè priva di importanti effetti dannosi. Ebbene, nessuno degli oltre 30 trial per terapia genica nella FC che sono partiti negli ultimi 30 anni ha superato la fase II.

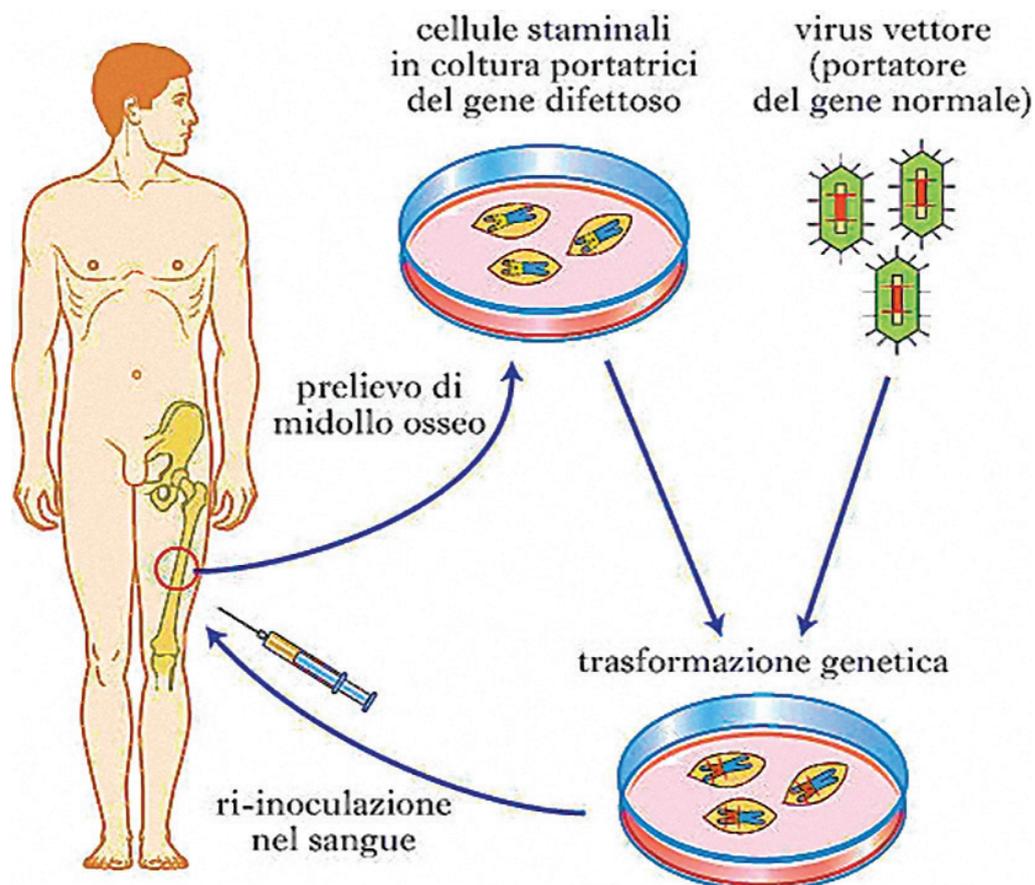
Il gruppo di ricerca coordinato da EW Alton (Regno Unito) lavora da molti anni sulla terapia genica in FC ed è arrivato a realizzare un paio d’anni fa un trial clinico di fase 2, in cui è stato sperimentato un aerosol per trattare i bronchi con una soluzione contenente il gene CFTR normale veicolato da liposomi (microparticelle lipidiche).

Un trial clinico inglese di terapia genica in FC con vettori liposomici

I risultati clinici sono stati modesti e i ricercatori ritengono che la ragione sia stata la bassa efficienza del vettore adottato per il trasporto del gene. Perciò hanno abbandonato i liposomi e sono tornati ai vettori virali, usando un

Figura 1. Terapia genica mediante cellule staminali.

Le cellule staminali del malato sono prelevate dal suo midollo osseo. Un virus vettore trasporta e inserisce al loro interno una copia del gene normale, che svolge la funzione di quello difettoso. Le cellule così trattate vengono reinfuse nel malato. (Tratto da “Terapia Genica”, Enciclopedia Medica Treccani. Inserimento redazionale)



virus del gruppo dei Lentivirus, modificato con tecniche di ingegneria genetica, in modo che perda la patogenicità e acquisti particolare capacità di assolvere la sua funzione, che è quella di invadere le cellule per inserirvi il gene (2). Non ci sono notizie circa l'avvio di un trial di fase 3. Altro limite della terapia genica in FC è rappresentato dall'emivita delle cellule bersaglio, cioè dalla durata del loro ciclo vitale nell'organismo umano. Le cellule dell'epitelio respiratorio, verso le quali è stata orientata principalmente la terapia genica della FC, hanno un'emivita di pochi giorni. Quindi, anche se si riuscisse a trasferirvi il gene sano, dopo pochi giorni le cellule "vecchie" sarebbero sostituite da altre nuove e quindi occorrerebbe ripetere spesso il ciclo di terapia genica.

Cellule staminali come vettori genici in altre malattie: "terapia genico-cellulare"

In altre malattie genetiche, come ad esempio il deficit di ADA (enzima Adenosindeaminasi), una grave malattia del sistema immunitario che costringe i bambini affetti a vivere isolati dal mondo esterno per evitare infezioni, la terapia genica ha avuto successo perché il gene sano viene trasferito nelle cellule staminali del midollo osseo (che hanno una sopravvivenza lunghissima) e che servono a generare tutte le cellule del sistema immunitario che quindi manterranno al loro interno il gene sano trasferito con la terapia genica (Figura 1).

I primi tentativi di terapia genica per la malattia ADA sono stati effettuati nel 2002 e ad oggi sono 16 i bambini trattati con successo (3).

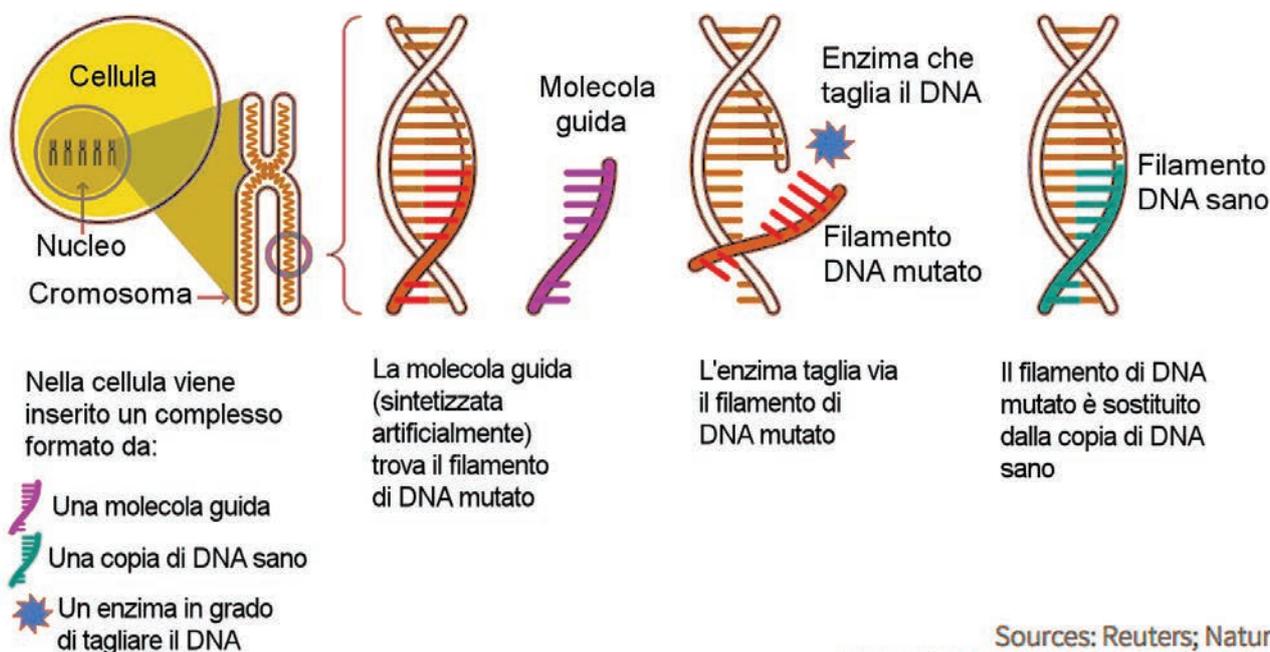
Esempi di successo con terapia genico-cellulare

Anche la beta-talassemia, anemia ereditaria grave che si trasmette come la fibrosi cistica da coppie di portatori sani asintomatici, sembrerebbe giovare della terapia genica attraverso cellule staminali del midollo osseo, che vengono prelevate dal paziente, modificate mediante vettore virale con l'inserimento del gene normale (che codifica per

DNA EDITING

La nuova tecnica di correzione del DNA è chiamata CRISPR/Cas9 e lavora in modo da "riscrivere" il DNA

COME CRISPR/Cas9 RISRIVE IL DNA



Sources: Reuters; Nature; Massachusetts Institute of Technology

Figura 2. Come funziona il "Genome-editing" con la tecnica CRISPR/Cas9. (Inserimento redazionale)

la proteina betaglobina, costituente chiave dell'emoglobina dei globuli rossi) e poi reinfuse. Sono molto recenti i dati positivi di un trial di fase 2 (4).

Infine, tra le cause dell'insuccesso della terapia genica in FC va anche ricordata la scarsa disponibilità di modelli animali su cui eseguire i primi esperimenti delle nuove terapie. Il topo è un modello molto studiato, ma la FC nel topo si presenta con caratteristiche cliniche molto diverse da quella umana; il maiale o altri animali più grossi in cui la malattia è più vicina a quella umana hanno iniziato ad essere studiati solo da pochi anni.

Nel frattempo, una nuova situazione di "mercato" ha profondamente modificato il potenziale sviluppo della terapia genica in FC negli ultimi anni. Proprio oggi che abbiamo a disposizione un enorme numero di dati sperimentali che derivano dagli studi di fase I e II l'interesse dell'industria e dei ricercatori per la terapia genica in FC ha iniziato a spostarsi verso altre malattie più diffuse della FC come i tumori, le malattie cardiovascolari o le malattie infettive gravi come l'HIV, anche grazie alla ricerca di

L'interesse dell'industria per la terapia genica si sposta verso malattie più diffuse

base che ha iniziato a mettere in evidenza le alterazioni genetiche alla base di queste malattie e quindi ad individuare i bersagli della terapia genica. Oggi il numero di sperimentazioni in corso per la terapia genica dell'HIV è almeno di tre volte più alto rispetto a quelle in corso per la FC.

Comunque, la ricerca scientifica non si ferma. Mentre l'interesse verso la terapia genica tradizionale nella FC sembra ridursi, da qualche anno ha iniziato a svilupparsi un nuovo sistema di terapia genica chiamato "editing" molecolare o, usando un termine tecnico, "CRISPR-Cas9".

Questo sistema, anziché inserire nelle cellule il gene normale, come nella terapia genica tradizionale, prevede la correzione diretta del gene difettoso. Esso si basa su alcuni elementi biologici che funzionano insieme e ricordano un intervento chirurgico di trapianto in miniatura. Vi è un enzima che viene prodotto dai batteri, e che serve a tagliare il DNA; poi vi è una sonda, cioè un piccolo pezzo di DNA formato da una sequenza di basi azotate complementari al pezzo del gene che presenta la mutazione e che serve a portare la forbice proprio nel punto "malato" cioè mutato del gene, e quindi vi è la sequenza di basi sane che verranno piazzate al posto di quella tagliata (Figura 2).

"Editing genomico": la nuova terapia genica con tecnica CRISPR-Cas9

Questo sistema, che qualcuno ha chiamato "chirurgia molecolare" sembra molto promettente nella terapia delle malattie genetiche in cui il gene è unico e le mutazioni sono note. Sono stati segnalati risultati preliminari ma promettenti per utilizzarlo nei confronti della beta-talassemia citata sopra e per l'anemia a cellule falciformi: in entrambe le malattie sono le cellule staminali del midollo osseo del malato, destinate a dare origine ai globuli rossi, ad essere "ingegnerizzate" attraverso CRISPR-Cas9, tagliando il frammento di DNA genico difettoso e inserendo al suo posto quello corretto (5).

Primi passi in FC su mutazioni "splicing"

Ci sono studi interessanti, almeno in vitro, anche nel campo della FC: in linea di principio questo sistema potrebbe essere adattato ad ogni tipo di mutazione del gene CFTR, ma per ora gli approcci riguardano in particolare le mutazioni con difetto di "splicing" (6). Ovviamente il cammino è lungo: il

passaggio dalla sperimentazione di fase I alla disponibilità del farmaco sul mercato può comportare parecchi anni, ma l'impressione è che stavolta sia stata imboccata la strada giusta.

Bibliografia

- 1) Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Personalized or precision medicine? The example of cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* 2017;8:article 390.
- 2) Alton EW, Beekman JM, Boyd AC et al. Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 2017 Feb;72(2):137-147.
- 3) Cicalese MP, Ferrua F, Castagnaro L, Rolfe K, De Boever E, Reinhardt RR, Appleby J, Roncarolo MG, Aiuti A. Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency: A Comprehensive Evaluation of Short- and Medium-Term Safety. *Mol Ther*. 2018 Mar 7;26(3):917-931.
- 4) Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *N Engl J Med*. 2018 Apr 19;378(16):1479-1493.
- 5) Cai L, Bai H, Mahairaki V, Gao Y, He C, Wen Y, Jin Y, Wang Y, Pan R, Qasba A, Ye Z, Cheng L.A Universal Approach to Correct Various HBB Gene Mutations in Human Stem Cells for Gene Therapy of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Nov 21.
- 6) Canz DJ, Hollywood JA, Scallan MF, Harrison PT. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One*. 2017 Sep 1;12(9)



Fibrosi cistica: come personalizzare le nuove terapie del difetto di base

Luis J.V. Galiotta

[Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM),
Pozzuoli (NA)]

Le prospettive terapeutiche per la fibrosi cistica (FC) aumentano sempre di più con la scoperta di nuovi farmaci che sono in grado di recuperare la funzione della proteina CFTR mutata (1,2). Lo sviluppo del potenziatore ivacaftor da parte dell'industria farmaceutica Vertex ha dimostrato che la terapia farmacologica del difetto di base è un approccio efficace per il trattamento dei pazienti FC. In effetti, già da molti anni si conosceva l'efficacia di potenziatori e correttori in vitro su cellule (2). Tuttavia, non si sapeva se l'effetto di queste molecole sarebbe stato confermato in vivo.

*Una rivoluzione
nelle cure FC:
l'era dei modulatori
di CFTR mutata*

Il risultato degli studi clinici in cui pazienti con la mutazione G551D sono stati trattati con successo con ivacaftor ha costituito una dimostrazione di principio molto importante che ha aperto la strada ad altri tipi di molecole (1-3). Infatti, il potenziatore è stato affiancato dai correttori Vertex lumacaftor e tezacaftor come possibili farmaci utili per la mutazione F508del. Altri correttori sono in fase di sviluppo e di sperimentazione clinica. Vertex sta studiando combinazioni di correttori, di prima e seconda generazione, per massimizzare l'effetto sul mutante F508del. Galapagos/AbbVie e Flatley Discovery Lab sono altre due entità che stanno sviluppando in proprio nuovi correttori e potenziatori. La stessa Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, attraverso il progetto "Task Force for Cystic Fibrosis", ha scoperto nuove molecole, particolarmente potenti sul mutante F508del, il cui sviluppo preclinico è già in corso.

*Potenti correttori
di F508del scoperti grazie
ad un progetto FFC*

Un ulteriore sviluppo nel campo FC è la scoperta dei cosiddetti "amplificatori" (4). Questo nuovo tipo di farmaco, ideato da Proteostasis, è in grado di aumentare la produzione della proteina CFTR, indipendentemente dal tipo di mutazione. È quindi una molecola che da sola è poco efficace, ma aumenta significativamente l'azione di potenziatori e correttori mettendo più proteina CFTR a disposizione per correggerla e/o potenziarla. Tutte queste nuove molecole rappresentano un'opportunità molto promettente per il trattamento di una platea molto grande di pazienti FC.

Per capire come i nuovi farmaci potranno essere utilizzati bisogna considerare le nostre conoscenze sulla proteina CFTR e sulle mutazioni che la colpiscono. CFTR forma un poro nella membrana delle cellule che la esprimono (2). Attraverso questo poro passano ioni quali il cloruro ed il bicarbonato che hanno una funzione importante nell'equilibrio idrosalino della superficie di molti epitelii. CFTR, come gran parte delle proteine cellulari, viene sintetizzata partendo dalle istruzioni presenti nel DNA del nucleo delle cellule stesse. Quando necessario, le istruzioni contenute nel gene CFTR vengono ricopiate nell'RNA messaggero, che le trasporta al di fuori del nucleo. Qui l'informazione dell'RNA viene tradotta per la sintesi della proteina.

Come funzionano normalmente il gene e la proteina CFTR

Le mutazioni che causano FC possono agire in diversi modi. In molti casi, le mutazioni causano la perdita o la sostituzione di uno solo dei 1480 aminoacidi che compongono CFTR.

Ad esempio, la mutazione F508del causa la perdita della fenilalanina in posizione 508. Invece, la mutazione N1303K implica la sostituzione

dell'asparagina in posizione 1303 con la lisina. La perdita o sostituzione di un aminoacido in una posizione importante della proteina CFTR può determinarne la perdita di funzione. Questo può succedere perché il poro di CFTR rimane chiuso (mutazioni di "gating", classe 3) oppure perché la proteina CFTR diventa instabile e viene quindi degradata subito dopo la sintesi, prima ancora di raggiungere la superficie cellulare (mutazioni di "trafficking", classe 2). In alcuni casi, le mutazioni bloccano direttamente la sintesi della proteina CFTR (mutazioni di stop, classe 1). Ad esempio, G542X rappresenta una mutazione in cui al posto delle istruzioni per l'inserimento dell'aminoacido glicina c'è un segnale di stop. La sintesi proteica quindi si ferma determinando la produzione di una proteina tronca non funzionale. Altri tipi di mutazioni sono quelle in cui la proteina CFTR ha un poro non completamente chiuso ma più "stretto" (classe 4) oppure quelle in cui ad essere alterato è il processo di costruzione ("splicing") dell'RNA (classe 5; ad es. 3849+10kb C>T e 2789+5G>A).

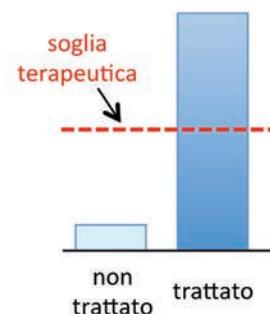
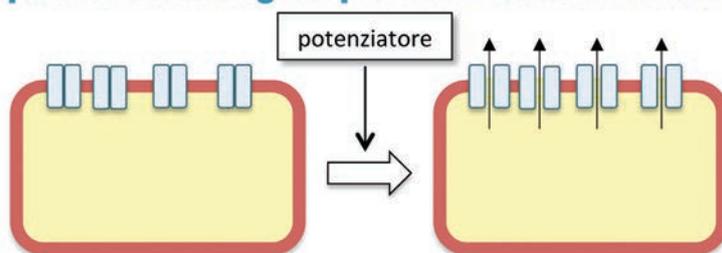
È comprensibile che il recupero farmacologico della funzione della proteina CFTR mutata debba tenere conto del tipo di mutazione/i presente/i nel paziente da trattare.

Come le mutazioni del gene CFTR alterano la funzione della proteina CFTR

Per le mutazioni di classe 3 la soluzione è rappresentata dai potenziatori che stimolano l'apertura del poro della proteina CFTR. L'efficacia in vivo del potenziatore ivacaftor, inizialmente dimostrata sulla mutazione G551D, è stata poi confermata anche sui pazienti con altre mutazioni di classe 3 (ad es. G178R, E193K, D579G, G1349D). È interessante notare che

è sufficiente una sola copia della mutazione sensibile al potenziatore per ottenere un beneficio clinico (Figura 1).

paziente omozigote per mutazione di classe 3



paziente con mutazione di classe 3 e mutazione "non trattabile" (es. G542X)

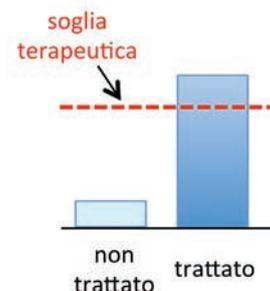
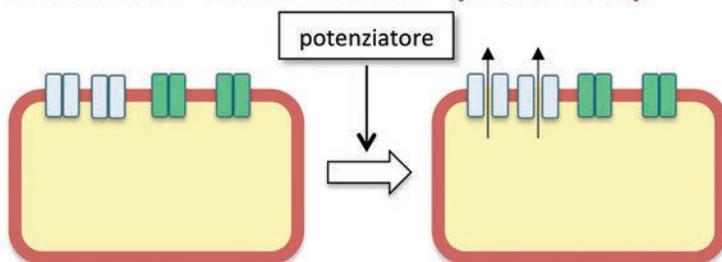


Figura 1. Meccanismo d'azione dei potenziatori.

I potenziatori sono farmaci in grado di attivare la proteina CFTR permettendone l'apertura del poro e quindi il flusso di ioni cloruro e bicarbonato. I potenziatori sono quindi particolarmente indicati per le mutazioni di classe 3 che determinano un difetto di attività della proteina CFTR. L'efficacia particolarmente marcata dei potenziatori è tale da dare un beneficio clinico molto alto nei pazienti omozigoti per mutazione di classe 3 (Figura azzurra in alto) ma anche, seppure in minor misura, ai pazienti con una sola mutazione di classe 3 e, come seconda, una mutazione "non trattabile" (es. G542X, figura azzurra in basso).

In altre parole, se un paziente ha due mutazioni diverse, non è necessario agire su entrambe le mutazioni. Se il trattamento è molto efficace - questo è il caso di ivacaftor su molti tipi di mutazioni di classe 3 - la funzione di CFTR risulta recuperata in maniera sufficiente. Questo non succede per F508del per la quale la cosiddetta "dose genica" è importante. Infatti il difetto di ripiegamento e instabilità causato da questa mutazione risponde solo parzialmente al trattamento con un singolo correttore. Infatti, si cerca di aumentare il recupero funzionale abbinando al correttore un potenziatore. Tuttavia, la combinazione correttore-potenziatore (es. lumacaftor/ivacaftor) mostra un qualche beneficio solo su pazienti con doppia copia di F508del e non su quelli in cui F508del è abbinata ad un'altra mutazione (Figura 2).

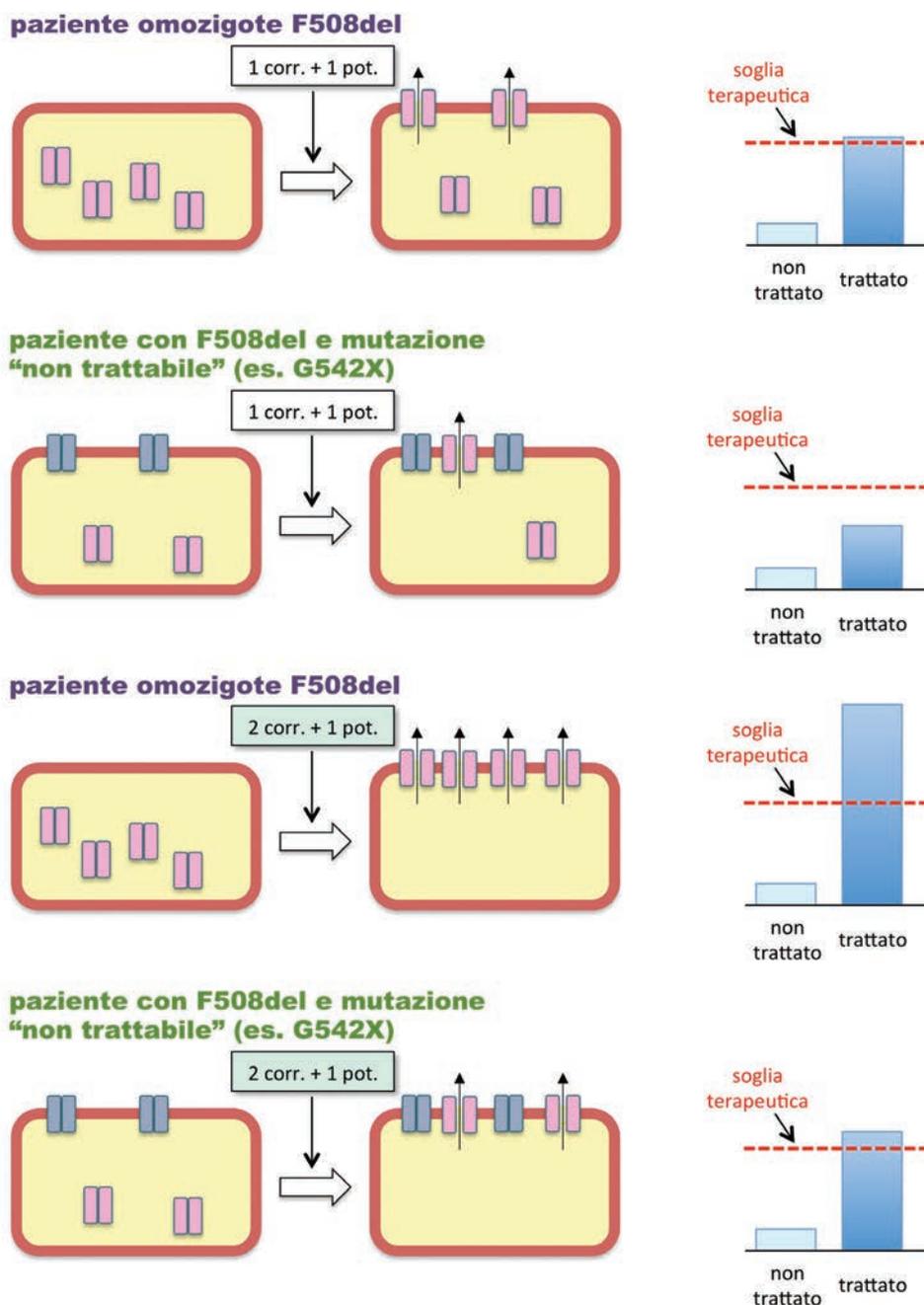


Figura 2. Meccanismo d'azione dei correttori. I correttori sono farmaci sviluppati, al momento, per il trattamento dei pazienti con la mutazione F508del. In realtà un singolo farmaco non è in grado di correggere completamente i difetti multipli di maturazione e di stabilità della proteina CFTR causati da F508del. La combinazione tra un singolo correttore ed un potenziatore ha una modesta efficacia (supera appena la soglia terapeutica) su pazienti omozigoti per F508del (prima figura in alto) ma è inattiva su pazienti con una sola copia di F508del e una seconda mutazione insensibile a potenziatori e/o correttori (seconda figura). Per questi pazienti è necessario il trattamento con una tripla combinazione di farmaci, comprendente un potenziatore e due correttori con meccanismo d'azione complementare, probabilmente peraltro con efficacia moderata (quarta figura dall'alto). La combinazione di due correttori complementari con un potenziatore nei pazienti omozigoti F508del può avere una elevata efficacia terapeutica (figura terza dall'alto).

La combinazione correttore/potenziatore per la più diffusa mutazione F508del

Il motivo è che i pazienti omozigoti producono una quantità doppia di proteina sensibile al correttore. Per i pazienti con una sola copia di F508del si prevede la necessità di combinazioni triple (due correttori diversi più potenziatori) per le quali l'efficacia molto elevata renderà la seconda mutazione ininfluenza (5). Ad esempio, pazienti con F508del e una mutazione di classe 1, per le quali al momento non esiste un trattamento efficace, potrebbero beneficiare della tripla combinazione (Figura 2). Un altro esempio è rappresentato da F508del e N1303K, una mutazione sempre di classe 2 ma insensibile ai correttori. Anche in questo caso, il recupero di F508del con trattamenti molto efficaci dovrebbe essere sufficiente senza la necessità di agire anche su N1303K.

Grazie al numero crescente di molecole a disposizione (correttori, potenziatori, amplificatori), è possibile guardare il futuro con ottimismo, ipotizzando la possibilità di trattare tutti i pazienti con il trattamento farmacologico più adatto.

Al momento un ostacolo serio è rappresentato dalle mutazioni di stop (classe 1) per le quali non esiste al momento una molecola efficace. Infatti il farmaco ataluren (PTC124) non ha dimostrato una chiara efficacia negli studi clinici in cui è stato provato. Questo rappresenta un problema soprattutto per i pazienti con una doppia copia di mutazione di classe 1.

Il problema delle mutazioni stop

Per questo motivo, sono in corso diversi programmi di ricerca per la scoperta di molecole che siano in grado di "correggere" le mutazioni di classe 1. Questo effetto può essere ottenuto utilizzando un farmaco che favorisca l'inserimento di un aminoacido nella posizione in cui è presente il segnale di stop permettendo così alla proteina CFTR di essere sintetizzata completamente.

In definitiva la prospettiva più probabile è la disponibilità in un prossimo futuro di un ventaglio di farmaci in grado di recuperare la funzione della proteina CFTR a diversi livelli. In molti casi, le informazioni disponibili nella letteratura scientifica permetteranno ai medici la scelta del trattamento farmacologico più adeguato, ritagliato su misura del genotipo del paziente.

Possibilità di un trattamento personalizzato ritagliato su misura del genotipo del paziente

Questa potrebbe essere la situazione di pazienti con F508del in singola o doppia copia, per i quali si può prevedere il trattamento con combinazioni di correttori-potenziatori, oppure di pazienti con mutazioni di classe 3 sicuramente responsive al trattamento con un solo farmaco potenziatore. In altri casi si potrebbe verificare però la situazione di pazienti con mutazioni "sconosciute". Esistono molti esempi di pazienti le cui mutazioni, poiché rare, non sono mai state studiate in laboratorio per comprenderne

la classe di appartenenza e la sensibilità farmacologica. Affrontare questo tipo di studio per ogni mutazione sarebbe molto difficile e richiederebbe molto tempo. La risposta a questo problema sarà l'uso delle cellule del paziente stesso (6).

Uso di cellule del paziente stesso per testare l'efficacia della cura prima del trattamento

Infatti, nuove tecniche di laboratorio permettono di prelevare cellule nasali e/o intestinali da ciascun paziente e di ricostruire in vitro i tessuti di partenza (Figura 3). Su questi modelli cellulari la valutazione della funzione della proteina CFTR mutata e la risposta al trattamento farmacologico permetterà la possibile definizione di un protocollo terapeutico personalizzato (6-8).

L'uso, a scopo diagnostico o di ricerca, di biopsie rettali da pazienti FC, è una pratica comune già da molti anni. Generalmente, i frammenti di mucosa rettale venivano usati al momento per valutare la funzione della proteina CFTR. Questo approccio limitava molto il numero di studi eseguibili su ciascun campione. Negli anni più recenti sono state però messe a punto delle nuove metodiche di coltura cellulare che espandono enormemente le possibilità di studio. Infatti, da ciascuna biopsia è possibile isolare le cellule epiteliali e, utilizzando opportune condizioni di coltura, sfruttarne

la grande capacità proliferativa (7). In pratica, le cellule epiteliali intestinali vengono mantenute sospese in una matrice gelatinosa arricchita di sostanze nutritive e di fattori che favoriscono la crescita ed il differenziamento. All'interno della matrice, le cellule formano delle sfere cave, ripiene di liquido, i cosiddetti "organoidi" (Figura 3).

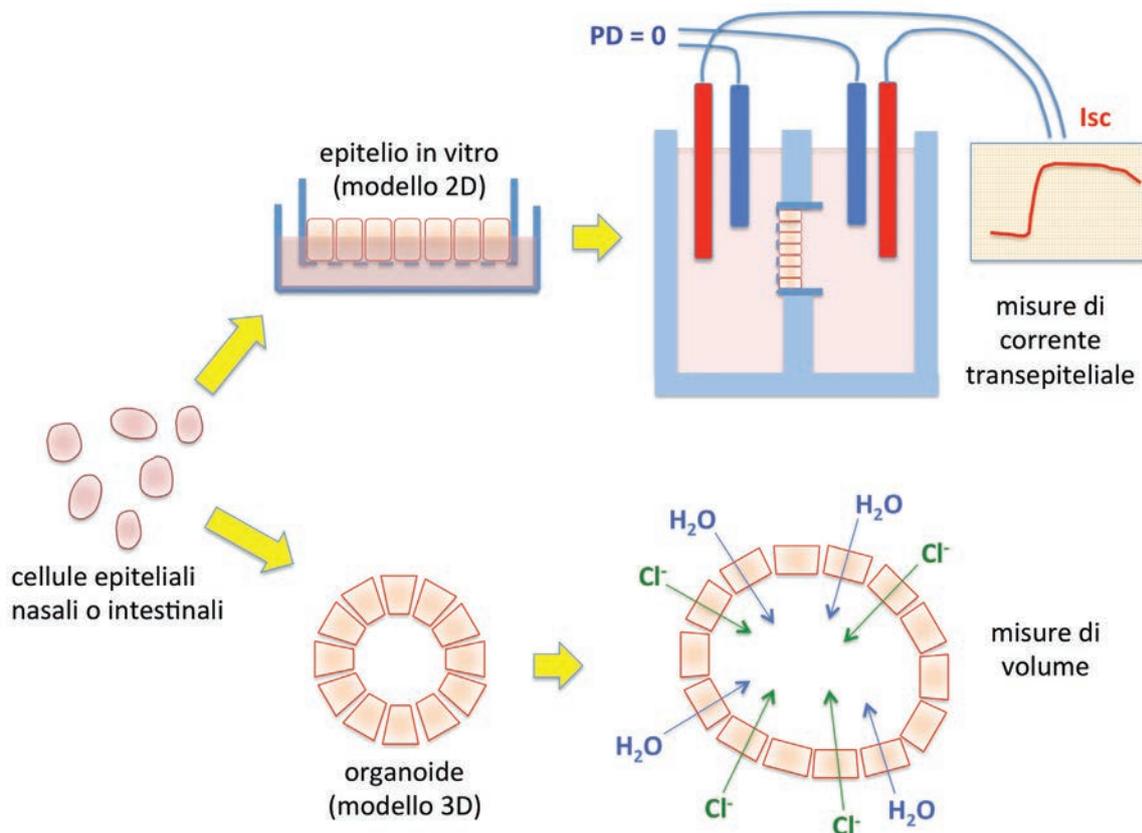


Figura 3. Modelli cellulari per la medicina personalizzata.

In molti casi, soprattutto per pazienti con mutazioni rare con sensibilità farmacologica sconosciuta, è importante prelevare le cellule del paziente stesso per effettuare valutazioni in vitro. Le cellule nasali, prelevate mediante "brushing", o intestinali, prelevate mediante biopsia rettale, possono essere coltivate su membrana porosa oppure seminate all'interno di una matrice gelatinosa. Nella prima condizione si formano degli strati cellulari che riproducono la struttura dell'epitelio in vivo. Su questi modelli bidimensionali (2D) è possibile valutare la funzione di CFTR e la risposta a farmaci misurando la corrente ionica transepiteliale. Nella seconda condizione si formano gli organoidi, strutture cave (sferiche) ripiene di un liquido conseguente alla secrezione operata da CFTR. Il rigonfiamento dell'organoide permette di valutare l'effetto di modulatori farmacologici di CFTR.

L'aspetto interessante è che il volume di liquido all'interno di ciascun organoide dipende dall'attività di CFTR. Quanto più attiva la CFTR, tanto maggiore il volume dell'organoide. Pertanto è possibile effettuare dei saggi molto semplici in cui l'attività di un potenziatore, di un correttore o di combinazioni di farmaci si traduce in un rigonfiamento più marcato degli organoidi generati da un paziente (7). In questo modo è possibile saggiare velocemente una batteria di trattamenti per definire quello più efficace nel singolo paziente. La grande capacità proliferativa delle cellule epiteliali intestinali permette di generare grandi quantità di organoidi da ciascun paziente. Inoltre, la possibilità di congelare le cellule stesse, consente, quando necessario, di continuare gli studi senza la necessità di ripetere la biopsia.

Gli "organoidi" intestinali: il loro rigonfiamento misura l'efficacia dei modulatori

Alle cellule intestinali, ora si affiancano anche le cellule epiteliali nasali come secondo modello per la medicina personalizzata. In passato, le cellule epiteliali nasali, prelevate da pazienti mediante "brushing", avevano un limite costituito da una bassa capacità proliferativa. Con le comuni tecniche di coltura, queste cellule rallentavano velocemente la propria crescita e "invecchiavano". Recentemente sono stati descritti due metodi diversi per potenziare la crescita delle cellule nasali.

**“Nasosferoidi”:
ricavati da cellule nasali
per misurare
il rigonfiamento curativo**

In questo modo si possono effettuare molti più esperimenti da ciascun campione e quindi verificare la risposta di CFTR a diversi trattamenti. Per le cellule nasali è possibile, così come per le cellule intestinali, generare degli organoidi (nasosferoidi) sospesi all'interno di una matrice gelatinosa o flottanti in un mezzo di coltura liquido (6,8). Su queste strutture tridimensionali si possono effettuare misure di rigonfiamento (“organoid swelling”). Il metodo alternativo è la formazione su una membrana porosa di epitelii altamente differenziati su cui effettuare registrazioni di trasporto ionico transepiteliale, un metodo più tradizionale e molto sensibile per la valutazione della funzionalità di CFTR (Figura 3).

In definitiva, il miglioramento delle tecniche di coltura permette di isolare ed espandere le cellule epiteliali di singoli pazienti e di studiarne *in vitro* il comportamento dopo trattamento con diversi tipi di farmaci. Questo sarà importante per i pazienti con mutazioni rare/orfane ma anche potenzialmente utile per i pazienti con mutazioni più diffuse e caratterizzate.

**Trattamento
personalizzato anche
per pazienti FC con
mutazioni rare/orfane?**

Ad esempio, vista la possibile disponibilità in futuro di diversi tipi di correttori per F508del, si potrà effettuare *in vitro* un confronto tra le diverse molecole per evidenziare la soluzione migliore per ciascun paziente prima di passare al trattamento vero e proprio *in vivo*. Queste grandi potenzialità richiederanno un adeguamento delle normative esistenti che dovranno aiutare il clinico nel proprio intento di fornire al paziente un trattamento “personalizzato”.

Bibliografia

- 1) Solomon GM, Marshall SG, Ramsey BW, Rowe SM (2015). Breakthrough therapies: Cystic fibrosis (CF) potentiators and correctors. *Pediatr Pulmonol* 50: S3-S13
- 2) Zegarra-Moran O, Galiotta LJ (2017) CFTR pharmacology. *Cell Mol Life Sci* 74: 117-128
- 3) Guimbellot J, Sharma J, Rowe SM (2017). Toward inclusive therapy with CFTR modulators: Progress and challenges. *Pediatr Pulmonol* 52: S4-S14
- 4) Molinski SV, Ahmadi S, Ip W, Ouyang H, Villella A, Miller JP, Lee PS, Kulleperuma K, Du K, Di Paola M, Eckford PD, Laselva O, Huan LJ, Wellhauser L, Li E, Ray PN, Pomès R, Moraes TJ, Gonska T, Ratjen F, Bear CE (2017). Orkambi and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue. *EMBO Mol Med* 9: 1224-1243
- 5) Hanrahan JW, Matthes E, Carlile G, Thomas DY (2017). Corrector combination therapies for F508del-CFTR. *Curr Opin Pharmacol* 34: 105-111
- 6) Cholon DM, Gentsch M (2018). Recent progress in translational cystic fibrosis research using precision medicine strategies. *J Cyst Fibros* 17: S52-S60
- 7) Dekkers JF, Gogorza Gondra RA, Kruisselbrink E, Vonk AM, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, van der Ent CK, Beekman JM (2016). Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur Respir J* 48: 451-458
- 8) Guimbellot JS, Leach JM, Chaudhry IG, Quinney NL, Boyles SE, Chua M, Aban I, Jaspers I, Gentsch M (2017). Nasospheroids permit measurements of CFTR-dependent fluid transport. *JCI Insight* 2, pii: 95734



Fibrosi cistica 2017: risultati dei progetti FFC nel contesto della ricerca internazionale

Graziella Borgo

(Fondazione per la Ricerca in Fibrosi Cistica)

Lo scopo di questa relazione è descrivere i risultati dei più recenti progetti di ricerca FFC ed esaminare come essi s'inseriscono nell'attualità dei grandi temi affrontati dalla ricerca scientifica internazionale per questa malattia. Obiettivo di FFC è promuovere in Italia una Rete di Ricerca per FC, coinvolgendo scienziati, competenze e centri di ricerca. Dal 2002 a oggi FFC ha selezionato e finanziato 336 progetti di ricerca ed altri sono in corso di selezione per il 2018. L'annata 2017 ha visto lo sviluppo complessivamente di 58 progetti: 26 progetti (conclusi al 31 agosto 2017), 15 progetti in corso, 17 progetti nuovi (avviati all'inizio di settembre 2017). Illustrerò i risultati dei 26 conclusi, che nella maggior parte dei casi hanno già superato il vaglio della comunità scientifica internazionale generando pubblicazioni su autorevoli riviste. La pubblicazione scientifica è un traguardo che ancora oggi rappresenta nel mondo della ricerca uno strumento fondamentale di comunicazione e confronto. È utile quindi inserire i progetti FFC nel contesto della produzione scientifica internazionale 2017, per capire in che misura la interpretano e vi contribuiscono. Ricorrendo alla banca dati elettronica PUB MED, si possono trovare più di 2500 articoli pubblicati fra Ottobre 2016 e ottobre 2017 sulla fibrosi cistica. Selezionando le riviste di maggior impatto e interesse per i lettori, ne restano ancora circa 1500. Il dato riflette bene il periodo scientifico senza precedenti che gli studi sulla malattia FC stanno attraversando: le pubblicazioni riportano l'esplosione di nuove conoscenze e gli studi di nuove terapie.

Questa mole di lavori è stata vagliata da un team di autorevoli figure che ha composto una lista, alla fine molto selezionata, in cui sono suggerite le migliori pubblicazioni generate da tutto il mondo scientifico nel 2017, per rilevanza del tema e novità dei dati (1). Ho utilizzato questa lista come premessa alla descrizione dei risultati FFC 2017, con l'obiettivo di cogliere connessione e sintonia fra i temi segnalati in campo internazionale e il contributo dato dalla ricerca FFC, per dare il senso non solo del ruolo che FFC riveste, ma anche del vasto percorso scientifico comune, mai come oggi carico di buone prospettive.

I 26 progetti FFC conclusi nel 2017 sono distribuiti secondo linee di ricerca: 10 nella linea chiamata CFTR e difetto di base, 5 per l'Infiammazione polmonare, 7 per l'Infezione polmonare, 4 per la Ricerca Clinica. Un'altra linea, di recente aperta, è stata chiamata linea dei Marcatori Biologici e intende studiare le prove che in laboratorio ("in vitro") e in vivo, su cellule di vario tipo derivate dal malato stesso, possono predire nel singolo individuo l'efficacia dei composti che intervengono sul funzionamento della proteina CFTR geneticamente mutata ("modulatori" di CFTR, distinti in potenziatori e correttori); i progetti relativi a questa linea sono in corso.

*Mai come in questi
anni tanta ricerca
in campo FC, con
altissimo numero di
pubblicazioni scientifiche*

*Connessione e sintonia
fra i temi della ricerca
internazionale
e i progetti FFC*

Le linee di ricerca indicano che FFC si muove su due grandi direzioni, da un lato affrontare studi mirati ai problemi con cui il malato di fibrosi cistica deve fare i conti oggi e dovrà farli ancora per un arco di tempo non breve (in particolare l'infezione e l'infiammazione polmonare), dall'altro puntare su studi che aprano prospettive di intervento di "radice" correggendo il difetto che sta alla base della malattia.

CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

È l'area cui FFC riserva particolare attenzione. I progetti finanziati riflettono il principale interesse della ricerca di base internazionale: trovare una terapia di radice della malattia attraverso "modulatori" farmacologici in grado di intervenire sul difetto della proteina CFTR. Alcuni modulatori sono già in commercio: il potenziatore Kalydeco (Ivacaftor), indicato per mutazioni con difetto di gating e negli USA anche per mutazioni "con funzione residua"; il correttore Orkambi (composto dal potenziatore Ivacaftor più il correttore Lumacaftor), per soggetti con doppia copia della mutazione F508del. Ad Orkambi si è aggiunto nel 2018 Symdeko (il nuovo correttore Tezacaftor + il potenziatore Ivacaftor), proposto per chi, avendo doppia copia di F508del, non risponda ad Orkambi, oppure per chi ha una copia di F508del e una copia di mutazione con funzione residua.

Il grande tema della ricerca FC oggi: trovare nuovi farmaci modulatori della proteina CFTR mutata

Ma la ricerca non si ferma e punta a trovare composti più efficaci e con minori effetti collaterali, che superino i limiti evidenziati soprattutto dai correttori nell'ambito della sperimentazione clinica. Ci sono due modi di concepire l'attività dei correttori di CFTR mutata: secondo una visione, il farmaco dovrebbe avere come bersaglio direttamente la proteina difettosa, per aumentare la sua capacità di maturazione fino all'arrivo sulla membrana della cellula; secondo un'altra, la correzione della proteina può avvenire attraverso la modulazione delle molte altre proteine che con varie funzioni sono presenti nel citoplasma cellulare (2). Tra queste vi sono proteine che decidono il destino di CFTR mutata, avviandola alla degradazione o permettendole di maturare e migrare sulla membrana cellulare. Assumendo come valide entrambe le ipotesi, la prospettiva è che il farmaco correttore ottimale, in particolare della mutazione F508del ma anche di altri tipi di mutazioni, sia una combinazione di molecole diverse (anche in tripla combinazione), che agendo in vario modo su bersagli diversi siano complementari e possano sommare i loro effetti.

I nuovi modulatori saranno combinazioni di più composti con diverso meccanismo d'azione

Agirebbero direttamente su CFTR mutata i composti detti correttori di prima generazione, mentre i correttori di seconda generazione agirebbero su proteine dell'ambiente intracellulare, ancora poco note (FIG 1). Una nuova categoria di modulatori, chiamati Amplificatori, è in grado di aumentare la produzione della proteina CFTR, indipendentemente dal tipo di mutazione, e incrementare quindi l'azione di Potenziatori e Correttori. Si può vedere dalla figura 1 come ci siano molti candidati a diventare nuovi correttori, sia di prima che di seconda generazione; e ci siano proposte per nuovi potenziatori, in grado di agire sulla proteina mutata quando è in membrana. Lo stato della sperimentazione di questi composti varia dalla fase preclinica (in laboratorio o in modelli cellulari) alla fase clinica 1 (sicurezza in soggetti volontari), alla fase clinica 2 (efficacia e sicurezza su numero limitato di pazienti), alla fase 3 (efficacia e sicurezza su numero elevato di pazienti) (3).

Dal progetto strategico "Task Force for Cystic Fibrosis" per F508del il nuovo correttore FFC/ARN23765

Rimane il fatto che il meccanismo d'azione di tutti questi candidati farmaci è ancora poco conosciuto: questo costituisce un grande campo di ricerca che aiuterebbe a selezionare in modo più mirato nuovi composti terapeutici.

Abbiamo inserito fra i correttori di prima generazione il composto ARN23765, frutto del progetto strategico FFC *Task Force for Cystic Fibrosis* (TFCF). TFCF ha portato alla brevettazione italiana ed europea di due classi di correttori e, tra essi, ARN23765 è risultato il più potente, essendosi dimostrato efficace anche a concentrazioni particolarmente basse su cellule bronchiali primarie F508del (derivate da polmoni espantati da malati FC) (FIG.2)

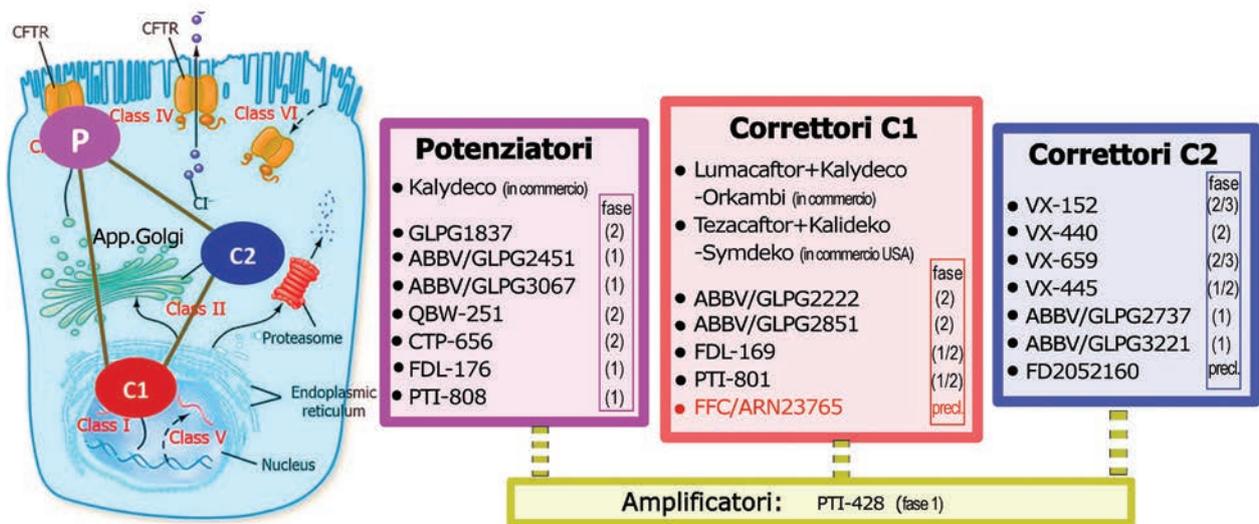


Figura 1. Modulatore della proteina CFTR mutata per F508del e altre mutazioni.

A sinistra è rappresentata schematicamente una cellula epiteliale bronchiale (colore celeste) in cui sono visibili: 1) il **nucleo**, al cui interno il gene CFTR presente nel DNA codifica la sintesi della proteina CFTR; 2) il **reticolo endoplasmatico** (intorno al nucleo) e 3) l'**apparato di Golgi** (colore verde), entrambe strutture in cui avviene la maturazione di CFTR; 4) il **proteasoma**, struttura in cui avviene la degradazione delle proteine riconosciute come difettose dal sistema di controllo di qualità della cellula. Le mutazioni del gene CFTR determinano la sintesi di una proteina CFTR mutata e poco o per niente funzionante: nel caso delle mutazioni di classe I e di molte di classe V, CFTR viene degradata precocemente; nel caso delle mutazioni di classe II, CFTR inizia la maturazione fuori dal nucleo ma può essere riconosciuta come mutata e avviata alla degradazione nel proteasoma; oppure può sfuggire al controllo, essere "trafficata" nel citoplasma, maturare ulteriormente nell'apparato di Golgi e arrivare a posizionarsi sulla membrana cellulare apicale della cellula. Qui funziona come canale per il trasporto dello ione Cloruro (Cl⁻) (rappresentato in colore arancione). Le mutazioni di classe III, IV e alcune di classe V permettono che CFTR si posizioni sulla membrana apicale. Alla classe VI appartengono mutazioni che determinano instabilità della proteina sulla membrana cellulare.

I modulatori di CFTR mutata sono distinti in **Potenziatori (P)**, che intervengono su CFTR quando è sulla membrana della cellula, per potenziare la sua funzione di canale per il cloro, e in **Correttori (C1 e C2)** che intervengono nella maturazione di CFTR e nel suo percorso verso la membrana cellulare. Si ritiene che il meccanismo d'azione dei **Correttori C1 (Correttori di prima generazione)** sia rivolto direttamente a CFTR nelle prime fasi di maturazione fuori dal nucleo; quello dei **Correttori C2 (Correttori di seconda generazione)** sia rivolto alle proteine contenute nel citoplasma della cellula, che indirizzano CFTR sulla membrana o l'avviano alla degradazione. Una nuova categoria di modulatori, chiamati **Amplificatori** è in grado di aumentare la produzione della proteina CFTR, indipendentemente dal tipo di mutazione, e incrementa quindi l'azione di Potenzianti e Correttori.

Nei riquadri l'elenco dei Potenzianti, Correttori C1 e Correttori C2 in fase di studio (tranne Kalydeco, Orkambi e Symdeko, in commercio). **Tra parentesi è indicata la fase dello studio:** preclinico (in laboratorio o su animali), clinico (= nell'uomo), distinto in fase 1 (sicurezza, in genere su volontari sani), 2 (efficacia e sicurezza su piccolo numero di malati), 3 (efficacia e sicurezza su grande numero di malati).

(Figura adattata da "Li H, Pesce E, Sheppard DN et al "Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: from discovery to drug development" J Cyst Fibros 2018 Mar; 17(2S):S14-S21)

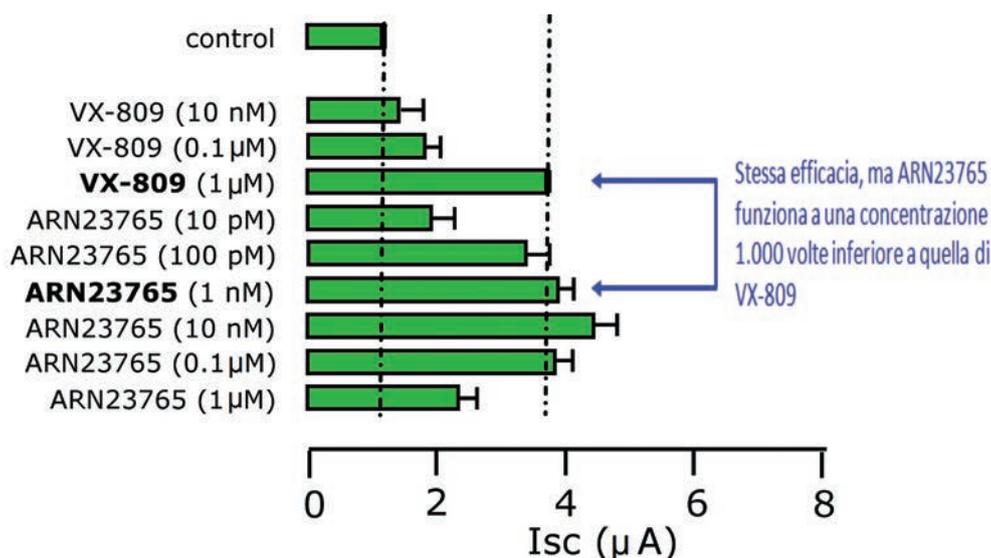


Figura 2. Dal progetto TFCF: Valutazione di efficacia del correttore VX-809 (lumacaftor) in confronto al correttore FFC/ARN23765 (a varie concentrazioni) in cellule bronchiali di pazienti omozigoti per la mutazione F508del.

Le barre indicano l'entità del recupero dell'attività di F508del-CFTR, rispetto al controllo, a seguito del trattamento con ciascun correttore alle concentrazioni riportate. Tale recupero viene stimato con la misura dell'intensità di corrente (Isc) che fluisce attraverso uno strato di cellule dopo trattamento con i correttori. La corrente è dovuta al flusso di ioni cloruro attraverso la proteina CFTR presente sulla membrana cellulare. Maggiore è la quantità di proteina che il correttore riesce a far giungere in membrana, maggiore sarà la corrente misurata e, pertanto, più alta è l'efficacia del correttore (Autori: L. Galiotta e T. Bandiera. Progetto FFC/Task Force for Cystic Fibrosis)

Esso ha anche superato favorevolmente alcuni saggi di eventuale tossicità in vitro e di adeguatezza chimica ai requisiti richiesti per un farmaco. Questi dati consentono di entrare subito nella fase di studio preclinico (sintesi e formulazione farmaceutica del composto e studi di farmacocinetica su modelli animali con caratteristiche biologiche vicine a quelle umane), che si concluderà nei primi mesi del 2019, con la prospettiva auspicata che si possa accedere alla sperimentazione clinica già entro il 2019 stesso.

Per F508del altri due candidati correttori FFC

Passando ai **correttori di seconda generazione**, vi sono interessati due progetti FFC (FFC #2/2015, FFC#10/2016). I bersagli individuati sono rispettivamente la proteina RNF5, una proteina sentinella che blocca la proteina CFTR-F508del difettosa e la avvia alla degradazione (A. Cavalli, Università di Bologna) e la proteina HSP27, che ha funzione simile (M. Salvi, Università di Padova). I ricercatori hanno individuato come sia possibile bloccare queste proteine e quindi favorire il recupero di CFTR mutata. Queste molecole andrebbero a supportare l'azione dei correttori già esistenti (terapia combinata) e sono state sperimentate su cellule bronchiali primarie con mutazione F508del.

Due candidati potenziatori FFC

Per quanto riguarda i **potenziatori**, da segnalare il progetto FFC# 4/2016 (A. Ghigo, Università di Torino): è stato sperimentato, oltre che su cellule primarie, anche su organoidi intestinali, un peptide (frammento di proteina) chiamato PI3Kgamma, che mostra di incrementare significativamente l'effetto di Orkambi. La nuova molecola è coperta da brevetto ed è stata riconosciuta come farmaco orfano dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA). Sempre azione di potenziatore ha dimostrato il composto GM1 (un glicolipide) che favorisce la stabilità di CFTR sulla membrana (progetto FFC#9/2015, A. Tamadini, Lab. Patologia Molecolare, Ospedale di Verona).

Ricerca di composti per correggere mutazioni splicing

Ma i progetti FFC si sono rivolti anche alla possibile correzione di **difetti della proteina CFTR derivati da altre mutazioni CFTR**. È il caso delle mutazioni splicing (lo splicing è il meccanismo che, eliminando le parti non codificanti del DNA, porta all'RNAmessaggero, destinato alla sintesi della proteina), affrontato dal progetto FFC #5/2015 (S.Duga, Università Humanitas, Milano) che ha studiato l'effetto "correggi-splicing" della kinetina, un ormone di origine vegetale. Sono stati ottenuti risultati molto preliminari, ma è interessante notare che la stessa kinetina è sperimentata per correggere le mutazioni splicing di altre due gravi malattie genetiche (disautonomia familiare e neurofibromatosi).

E sempre a proposito di mutazioni diverse da F508del, il progetto FFC #29/2015 (C. Sorio, Università di Verona) ha indagato la possibilità che i monociti, un tipo di globuli bianchi circolanti nel sangue, sottoposti ad uno speciale test (test HS-YFP) possano indicare se la proteina CFTR, mutata per effetto di varie mutazioni fra cui quelle stop, risponda all'attività di farmaci modulatori di CFTR già in commercio. Il test avrebbe il vantaggio di poter essere realizzato attraverso un semplice prelievo venoso e si aggiunge agli altri in via di sviluppo nell'area di ricerca dei "Marcatori Biologici".

Progetti FFC per nuove conoscenze su CFTR: indagare il nesso fra CFTR mutata, autofagia e xenofagia cellulare

Ci sono poi progetti che non hanno portato alla scoperta di nuove molecole o composti, ma nuove conoscenze nel campo di temi più generali di **fisiopatologia della proteina CFTR**, di cui sappiamo ancora poco: per esempio il rapporto fra CFTR difettosa e mitocondri, gli organuli intracellulari responsabili della respirazione interna della cellula; il rapporto fra CFTR e "autofagia" (il processo di rimozione del materiale intracellulare degradato) nonché quello tra CFTR e "xenofagia" (capacità delle cellule di eliminare agenti patogeni). L'autofagia nelle cellule FC sarebbe difettosa, con conseguente accumulo di proteine alterate, fra cui la stessa CFTR mutata, che avviano processi infiammatori. Molecole come cisteamina e timosina alfa 1 (già impiegate per la cura di altre malattie) sono state proposte per ripristinare l'autofagia, ridurre l'infiammazione e recuperare CFTR. C'è interesse anche a livello internazionale

per questi argomenti, con dati peraltro contrastanti. Questi progetti risultano utili per acquisire conoscenze di base che ancora mancano prima di considerare razionale e fondata l'ipotesi di usare questi composti nella terapia del malato FC.

INFIAMMAZIONE POLMONARE

L'inflammation in fibrosi cistica è ancora oggi poco conosciuta. Sappiamo che avviene in maniera molto intensa, sappiamo che non la vediamo ma che danneggia progressivamente il polmone, ma non sappiamo che cosa la scatena e perché sembra sia superiore di quanto necessario per controllare l'infezione (4,5). Non conosciamo abbastanza la relazione fra la proteina CFTR difettosa e questa esagerata risposta infiammatoria, e non sappiamo quanto invece inflammation e infezione microbica siano fra loro connesse, come avviene in altre patologie. E sarebbe importante, anche nel campo dell'inflammation, poter personalizzare la terapia, a seconda dell'età e di altre variabili.

La ricerca internazionale sta studiando in particolare la precocità della comparsa dell'inflammation nel polmone FC e quali indicatori (markers) possono essere usati per monitorarla, a tutte le età e anche in assenza di sintomi. Sullo sfondo rimane sempre il problema di arrivare ad un farmaco antinfiammatorio che abbia minori effetti collaterali del cortisone e di pochi altri di uso corrente.

Il progetto FFC#24/2015 (M. Strazzabosco, Università di Padova) ha studiato la relazione fra CFTR difettosa, presente nelle cellule biliari (colangiociti, cioè cellule epiteliali che rivestono le vie biliari, specializzate nella secrezione e trasporto della bile) e l'inflammation. Per il progetto è stato utilizzato un nuovo modello cellulare: cellule biliari adulte con mutazione F508del ottenute da cellule staminali di pazienti FC. Queste cellule, la cui struttura è fortemente disorganizzata per effetto della CFTR difettosa (FIG 3A-3B), mostrano di essere sensibili al farmaco correttore; ma l'originalità dello studio è stata la dimostrazione che, impedendo con un particolare composto l'azione di una proteina che favorisce

Dalla ricerca internazionale: necessità di chiarire i meccanismi dell'inflammation; individuarne marcatori precoci; scoprire nuovi antinfiammatori

Da un progetto FFC un nuovo modo di spiegare e curare la malattia epatica FC

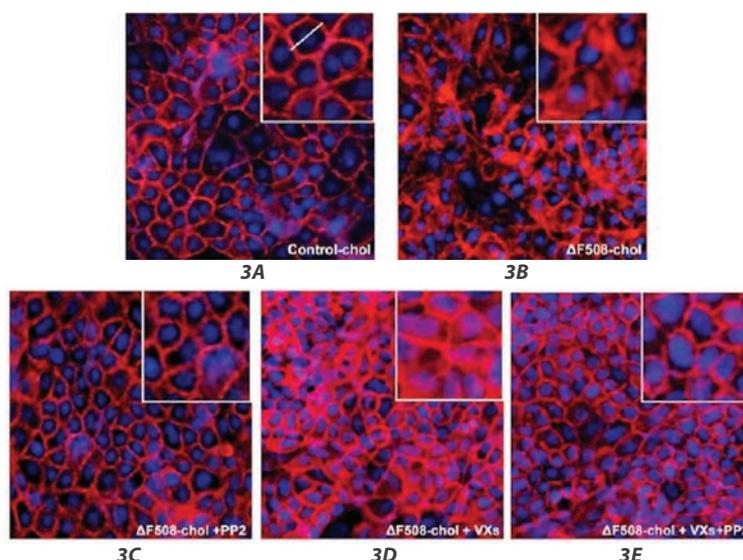


Figura 3. Effetto dell'antinfiammatorio PP2 e dei modulatori di CFTR-F508del su colangiociti umani F508del.

Figg. 3A-3B. Immagine di colangiociti umani normali (3A) e colangiociti umani F508del (3B). Si può vedere come il citoscheletro (intellatura) della cellula, costituito principalmente da filamenti della proteina actina, nei colangiociti F508del sia fortemente disorganizzato in confronto ai normali.

Figg. 3C-3D-3E. Immagine di colangiociti umani F508del esposti all'effetto dell'antinfiammatorio PP2 da solo (3C), del potenziatore VX-770 + correttore VX-809 (farmaco Orkambi) (3D) e del potenziatore VX-770 + correttore VX-809 (farmaco Orkambi) insieme all'antinfiammatorio PP2 (3E). Si può vedere come, per effetto di questa tripla combinazione, i colangiociti F508del riacquistino organizzazione del citoscheletro simile ai colangiociti normali della Fig. 3B.

Dalla pubblicazione: "SrcKinase Inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in F508del human cholangiocytes and improves CFTR correctors efficacy". *Hepatology* 2018 Mar;67(3):972-988

l'infiammazione (la proteina SRC, particolarmente presente nel tessuto epatico), aumenta l'effetto del farmaco correttore di CFTR mutata, la struttura della cellula si riorganizza (FIGURA 3C-D-E), e in ultima analisi migliora la funzione di secrezione della bile svolta dalla cellula biliare. Questi dati possono aprire la strada ad un modo nuovo di trattare l'epatopatia FC, che vede combinato l'antinfiammatorio con il correttore di CFTR mutata.

Altri progetti hanno puntato più direttamente sulla ricerca di antinfiammatori che siano già in uso o in studio per altre patologie ("riposizionamento" di farmaci) perché questo accorcerebbe i tempi di ricerca per il loro utilizzo anche in FC. Con il progetto FFC #16/2015 V. Evangelista (Università di Chieti) ha dimostrato che particolari composti chiamati Inibitori delle Fosfodiesterasi sono efficaci nel contrastare l'eccessiva risposta di globuli bianchi neutrofili dell'infiammazione polmonare FC; le Fosfodiesterasi sono enzimi importanti per il metabolismo della cellula e inibitori di questi enzimi entrano nella composizione di farmaci già in commercio per il trattamento di un'importante patologia respiratoria chiamata Bronopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO). Ancora più avanzata è la prospettiva di un nuovo antinfiammatorio generato dal progetto FFC#

Da progetti FFC studio e riposizionamento a scopo antinfiammatorio di farmaci già in uso per altre malattie

22/2015 (M.C. Dehecchi, Lab. Patologia Molecolare, Ospedale di Verona). Partendo da un farmaco già in commercio, il Miglustat (Zavesca è il nome commerciale, ed è usato nel trattamento del morbo di Gaucher, una grave malattia genetica), è stata studiata la famiglia a cui appartiene (la famiglia degli iminozuccheri) arrivando ad identificare derivati con forte effetto antinfiammatorio, anche a dosaggi molto bassi, in modelli murini con infezione polmonare. Altro progetto è FFC#18/2016 (C. Cigana, Istituto S.Raffaele, Milano) che ha identificato molecole chimiche di nuova sintesi per combattere l'eccesso di composti "Mucopolisaccaridi" (un insieme di proteine e glicidi) prodotti naturalmente in corso di infezione respiratoria cronica FC e di forte valenza infiammatoria.

INFEZIONE POLMONARE

La ricorrenza delle infezioni respiratorie e la difficoltà di trattarle con strategie antibiotiche efficaci rappresenta sicuramente un grande tema di ricerca a livello internazionale. Ci sono stati in anni recenti importanti progressi soprattutto per quanto riguarda la formulazione per via aerosolica di antibiotici già in uso per altre vie, "confezionati" con nuove modalità adatte a far risparmiare tempo nella terapia quotidiana. Ma la domanda pressante è quella di antibiotici nuovi e magari più "potenti". In realtà l'industria farmaceutica sembra attualmente non investire molto nella ricerca

La ricerca internazionale non produce antibiotici nuovi; studia i meccanismi di resistenza a quelli correnti; i rapporti fra batteri e ospite malato; i batteri emergenti negli adulti FC

di molecole nuove, perché è un processo che richiede costi elevatissimi, un tempo molto lungo e deve confrontarsi con un mercato troppo concorrenziale.

In particolare in campo FC, nel 2017 gli studi si sono diretti su altri versanti, come le condizioni particolari per cui i batteri caratteristici della malattia, a partire da *Pseudomonas aeruginosa*, acquisiscono resistenza e cronicizzano l'infezione. Molte ricerche quindi sul biofilm (involucro mucoide) con cui *Pseudomonas* si difende dai processi immunitari e dagli antibiotici, sui rapporti fra *Pseudomonas* e altri batteri, sul "microbioma polmonare" (la complessa comunità di diversi batteri che colonizza il polmone FC). Interesse

anche per agenti patogeni che emergono nella popolazione adulta FC (Micobatteri atipici, funghi come *Aspergillus fumigatus*). Pochi studi riguardo a *Burkholderia cenocepacia* (Bcc), categoria batterica di difficile trattamento che è comunque in calo da quando si sono applicate misure di prevenzione della trasmissibilità tra malati. Con riferimento all'infezione da *B. cenocepacia*

Una nuova molecola FFC contro Burkholderia cenocepacia

acquista particolare rilievo il progetto FFC#19/2015 (G. Riccardi, Università di Pavia), che ha portato i ricercatori, da tempo impegnati su questo fronte, a identificare e brevettare una nuova molecola risultata attiva su cellule epiteliali bronchiali FC e su modelli murini con infezione da Bcc.

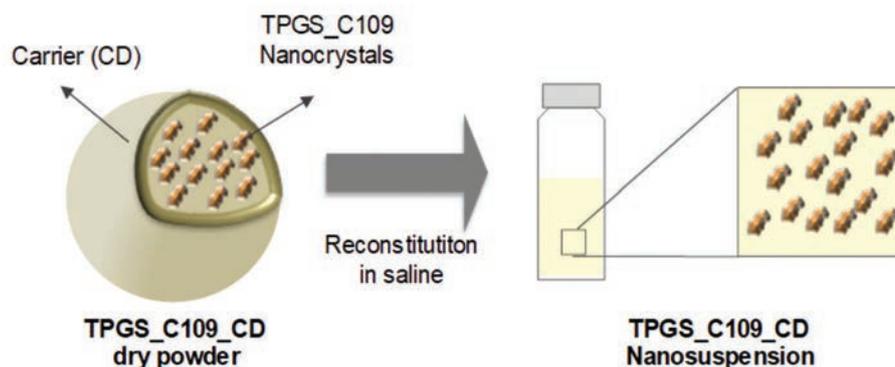


Figura 4. Dal progetto FFC#19/2015: Formulazione del composto C109 attivo in vitro contro *Burkholderia cenocepacia*. La formulazione prevede che nanocristalli del composto C109, stabilizzati con un derivato della Vitamina E (TPGS), siano preparati sotto forma di particelle di polveri stabili a lungo termine. Le particelle hanno caratteristiche tali da poter essere disciolte in soluzione salina ed essere somministrate per via aerosolica con comuni nebulizzatori. (Autore: F. Ungaro)

Il progetto è arrivato alla fase della sintesi di piccole quantità del composto e dello studio della formulazione ottimale per una somministrazione per via aerosolica (FIGURA 4). Al Congresso 2017 della Società Europea FC la giovane ricercatrice del gruppo ha ricevuto un premio che sta ad indicare l'attenzione internazionale per il progetto.

Il progetto FFC 13#2016 (E. Tortoli, Istituto S.Raffaele, Milano) si è posto un obiettivo importante nel campo dei Micobatteri Non Tubercolari (Micobatteri Atipici, MA). Questi possono rappresentare negli adulti con FC un problema importante perché il clinico non dispone ancora di criteri diagnostici certi per capire quando sono realmente responsabili di peggioramento della situazione respiratoria; inoltre, in caso di MA patogeni, i trattamenti oggi disponibili hanno limiti di efficacia e di tollerabilità. Il progetto ha portato a realizzare per la prima volta un modello di topo con infezione da MA in cui studiare le caratteristiche genetiche e i fattori di aggressività di vari ceppi di MA, in modo da rendere distinguibili in laboratorio quelli realmente patogeni dagli altri.

Un test di laboratorio per riconoscere i Micobatteri atipici realmente patogeni in FC

La scarsità di nuovi antibiotici e la conseguente necessità di esplorare strade alternative ha portato al progetto FFC#16/2016 (D. Ghisotti, Università di Milano): sono stati studiati i fagi, virus che attaccano in modo specifico le cellule batteriche (e non quelle umane), riproducendosi al loro interno e provocando la morte del batterio stesso. Si tratta quindi di "nemici biologici naturali" dei batteri, proprio come gli antibiotici sono "nemici farmacologici". La terapia con fagi ha una certa diffusione nei paesi dell'Est europeo essendo utilizzata contro batteri responsabili di infezioni di vario tipo; invece nei paesi occidentali i fagi non sono ancora arrivati ad essere sperimentati nell'uomo. In questo progetto è stata documentata, in diversi modelli animali, l'efficacia della terapia fagica contro le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*.

Ricerca FFC di antimicrobici alternativi: i Fagi

Se non disponiamo di antibiotici nuovi, rendiamo più efficaci quelli che abbiamo. Questo il criterio alla base di altri due progetti FFC#21/2015, (P. Visca, Università Roma 3) e FF#14/2016 (G. Bertoni, Università Milano). Il primo ha studiato l'effetto del gallio (ione Ga³⁺) che *Pseudomonas* utilizza al posto del ferro (ione Fe³⁺) di cui ha bisogno, restandone ucciso. Sono state sviluppate formulazioni inalabili di gallio destinate a potenziare l'attività battericida degli antibiotici. L'interesse della ricerca internazionale per il gallio è indicato anche dal fatto che due trial clinici di fase II, con gallio per via endovenosa e gallio per via aerosolica, sono in corso con il supporto della Fondazione FC americana. Il progetto FFC#14/2016 ha individuato come causa della resistenza agli antibiotici piccole molecole di RNA (sRNA) prodotte dal batterio stesso e la possibilità di neutralizzarle.

Nuove modalità per potenziare l'efficacia degli antibiotici correnti

Infine, tenendo presente che il modello animale rappresenta una risorsa fondamentale per la ricerca, importanti anche per le decisioni cliniche in tema di terapia antibiotica le evidenze ottenute

su modello murino dal Progetto FFC#15/2015 (D.Cirillo, Istituto San Raffaele, Milano) : l'infezione da Stafilococco aureo crea condizioni favorevoli all'impianto cronico di *Pseudomonas aeruginosa*. Sempre in tema di modelli animali, il progetto FF#11/2015 (N. Lorè, Istituto San Raffaele, Milano) ha ottenuto, attraverso vari incroci, un modello di topo del tutto nuovo, che potremmo definire un topo "con malattia FC personalizzata".

Modelli animali con malattia FC più simile a quella umana

Potrà portare conoscenze importanti su come la mutazione del gene CFTR F508del sia influenzata da altri geni (geni modificatori): sappiamo che la malattia FC può avere decorso molto diverso anche in soggetti che hanno mutazioni del gene CFTR uguali (anche fra coppie di fratelli); questo, perché l'attività del gene CFTR è influenzata da altri geni che fanno parte del corredo genetico individuale. Scoprire i geni che modificano, in senso positivo o negativo, il gene CFTR e la proteina che produce, potrebbe portare a ricadute pratiche importanti come per esempio una maggior personalizzazione delle terapie. Il nuovo modello animale permetterà anche di rendere gli indispensabili studi preclinici dei nuovi farmaci più vicini alle condizioni reali dell'organismo umano.

RICERCA CLINICA

La ricerca clinica internazionale 2017 ha avuto come tema principale i trial clinici in cui sono stati sperimentati i farmaci modulatori di CFTR, soprattutto i trial di fase III che, data la numerosità dei pazienti che includono, forniscono dati attendibili riguardo l'efficacia e la sicurezza del composto candidato a diventare farmaco. Nel giugno 2017 AIFA (Agenzia Italiana per il Farmaco) ha approvato il farmaco Orkambi per la terapia di soggetti con doppia copia di F508del (a partire da dodici anni). Oltre ad Orkambi, il Servizio Sanitario Nazionale fornisce, su prescrizione dei centri FC, Kalydeco per la mutazione G551D e altre mutazioni dette "gating" (a partire dai 2 anni) e per la mutazione R117H (a partire dai 18 anni).

Dalla ricerca internazionale: risultati di trial clinici con modulatori di CFTR; nuovi dati da registri malattia; studi clinici per interventi terapeutici molto precoci

Oltre al tema dei trial clinici con modulatori di CFTR, nel 2017 sono stati pubblicati studi interessanti sui dati forniti dai Registri-malattia, strumenti indispensabili per conoscere come stanno, che vita fanno e quanto vivono i malati di fibrosi cistica nel mondo. In particolare i dati del Registro Canadese hanno indicato netti miglioramenti complessivi. Ha pubblicato una sintesi di dati nazionali anche il Registro italiano, che nei prossimi anni potrebbe rappresentare una buona risorsa per ricerche cliniche ed epidemiologiche. Infine, un filo conduttore che lega altri studi della ricerca internazionale 2017 è l'aver affrontato da un lato la necessità e opportunità di un intervento terapeutico precoce (molti lavori sullo screening neonatale) e dall'altro, per una popolazione FC che "invecchia", l'ottimizzazione delle terapie tradizionali esistenti, in particolare quelle antibiotiche. Una serie di lavori ha sottolineato come sia vincente la terapia antibiotica precoce e "aggressiva", ai primi sintomi di esacerbazione, e più vantaggiosa se fatta in ospedale rispetto a casa. In altri termini, no alla politica dell'"aspetta e sta a vedere" ("*way and see attitude*") perché contribuisce al declino della funzionalità respiratoria.

*Un progetto FFC indaga l'ileo da meconio, la complicità più precoce; ed un altro sperimenta un protocollo migliorativo per l'eradicazione precoce di *Pseudomonas aeruginosa*.*

La ricerca FFC riflette bene questi temi: nella linea delle cure più tempestive e più efficaci, si è concluso il progetto FFC#28/2015 (R. Padoan, Centro FC, Università di Brescia) che ha affrontato il problema della complicità più precoce della fibrosi cistica, l'ileo da meconio, occlusione intestinale acuta che interessa il 10-15% dei neonati FC. Lo studio ha visto la collaborazione di 13 centri FC italiani, con raccolta di un'ampia casistica composta da 85 casi di nati con ileo da meconio nel periodo 2009-2014 (rappresentano il 70% del numero complessivo riportato negli stessi anni dal registro-malattia italiano). Sono state identificate le procedure assistenziali di maggior successo e i fattori di rischio dei neonati da monito-

rare con maggiore intensità. Questi dati serviranno a ottimizzare i protocolli terapeutici e favorire una più stretta collaborazione fra neonatologi, chirurghi e specialisti FC. Anche il progetto FFC #30/2015 (G. Taccetti, Centro FC, Ospedale Meyer, Firenze) ha l'obiettivo di migliorare le terapie in campo antibiotico. Viene sperimentato un avanzamento rispetto ai protocolli in uso per l'eradicazione di *Pseudomonas aeruginosa* ed è anche questo frutto di una collaborazione di 12 centri FC italiani. Attraverso trial clinico controllato farà conoscere (si concluderà tra poco) se sia vantaggioso aggredire il batterio, oltre che per via generale, anche con terapia locale dei seni paranasali, in quanto essi agiscono da serbatoio di rifornimento e quindi di cronicizzazione di *Pseudomonas* (FIGURA 5).

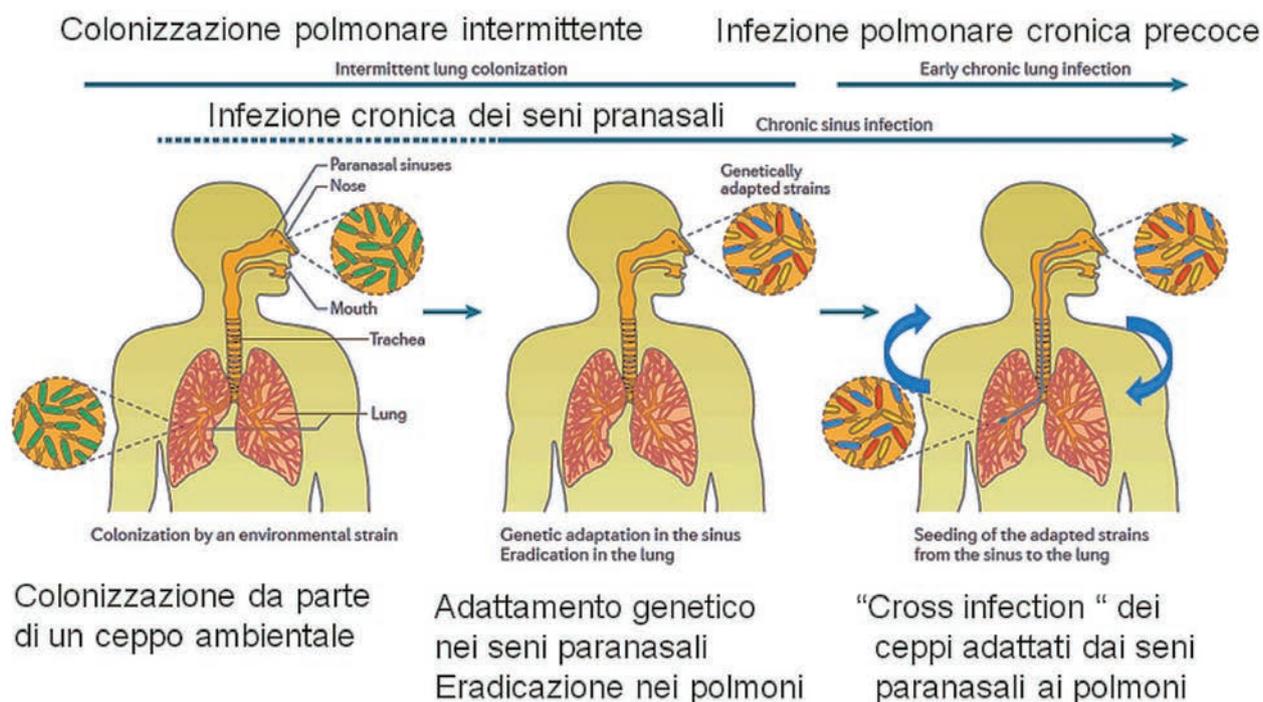


Figura 5. Dal Progetto FFC#30/2015: Modello di colonizzazione da *Pseudomonas aeruginosa* nelle vie aeree del paziente FC.

Il batterio *Pseudomonas aeruginosa* proveniente dall'ambiente (ceppo ambientale) si localizza nelle vie aeree superiori, di cui fanno parte i seni paranasali, e nelle vie inferiori (bronchi e polmoni). Il trattamento antibiotico può eradicare *Ps. aeruginosa* alla prima infezione nei polmoni, ma nei seni paranasali il batterio resiste e assume caratteristiche genetiche particolari che lo rendono adatto alla colonizzazione cronica (ceppi adattati). I ceppi adattati provenienti dai seni paranasali si insediano nei polmoni e determinano infezione polmonare cronica precoce. Autore: G.Taccetti.

I progetti che vedono la collaborazione di più centri rappresentano un valore aggiunto ottenuto dalla ricerca clinica FFC, perché implicano confronto fra centri di cura, ricerca di omogeneità nei protocolli diagnostici e assistenziali, in sostanza il superamento della "politica del campanile".

Infine il progetto FFC#21/2016 (S. Bisogni, Centro FC, Ospedale Meyer, Firenze) ha dimostrato, sperimentandolo nei malati, l'utilità di un dispositivo per realtà virtuale, una speciale maschera che isola dalla realtà esterna e immerge a 360 gradi nella visione di un filmato, da indossare durante i prelievi venosi, per alleviare ansia e dolore. La ricerca indaga quindi anche temi apparentemente "minori", sottolineando che la qualità della vita dei malati di tutte le età è un obiettivo importante da perseguire.

Un trial clinico controllato sperimenta, contro ansia e dolore da prelievo venoso, l'uso di un dispositivo a "realtà virtuale"

Bibliografia

- 1) MEngr BK. Cystic Fibrosis 2017-The year in review. *Respiratory Care* 2018; 63:239-242
- 2) Li H, Pesce E, Sheppard DN et al. Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: from discovery to drug development. *J Cyst Fibros* 2018 Mar; 17(2S):S14-S21
- 3) Hudoch KM, Clancy JP. An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opinion On Emerging Drugs* 2017;22:331-346
- 4) <http://www.fibrosicistica.ricerca.it/wp-content/uploads/2016/12/L%E2%80%99inflammatione-polmonare-in-fibrosi-cistica.pdf>, 24/11/2016
- 5) Cantin AM, Harti D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 2015 ; 14(4)-419-30

PROGETTI FFC CONCLUSI NEL 2017 E LORO ADOZIONI

AREA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

FFC/TFCF “Task force for Cystic Fibrosis” 1^a-2^a-3^a fase

Responsabile: Luis Galletta (Lab. Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova)

Adottanti: Energy T.I. Group SpA. Milano - LIFC Sicilia, in ricordo di Davide Radicello - Danone SpA - Fam. per la Ricerca - Fondazione Corrado e Bruno Maria Zaini - Dekra SpA - Campagna Natale 2016 - Numero Solidale Natale 2016 - Piazzalunga Srl - Rortos Srl - Brandart Srl - Evento “Swing per la ricerca” promosso Del. FFC Villa d’Almè - Quota parziale Cinque X mille 2014 - Bike Tour 2016 - Eventi “La notte dei sapori 2” e “FFC Golf Cup 2016” - Gruppo Aziende Nordest promosso da Del. FFC Vicenza e Verona Val d’Alpone - SLF Abrasivi Srl - Saint Gobain SpA - “Amici per la ricerca” Bassano del Grappa - Loifur Srl - Mevis Spa - Amici della ricerca di Milano - Evento “Dai respiro alla Ricerca” promosso da Del. FFC Palermo - Fondazione Mediolanum - Evento “Guardare lontano” promosso da Del. FFC Milano - Project Hope Rosa Pastena - LIFC Messina - Fund Raising Dinner Claudio Miceli - #CorrerePerUnRespiro - “Imprese straordinarie Milano per la ricerca” - Trofeo Neurone 2017.

FFC#1/2015 “Correlazione tra mitocondri e F508del-CFTR nella fibrosi cistica”

Responsabile: Anna Atlante (Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR Bari)

Adottanti: Infront e Play for Change - Gare di golf FFC

FFC#2/2015 “La ubiquitina ligasi RNF5/RMA1 quale nuovo bersaglio terapeutico per il recupero della proteina CFTR mutata per effetto di F508del”

Responsabile: Andrea Cavalli (Dip. Farmacia e Biotecnologie - Univ. Bologna)

Adottanti: Del. FFC Verona - Evento “La notte dei sapori” - Del. FFC Tradate Gallarate - Audemars Piguet Italia

FFC#5/2015 “La citochina vegetale kinetina e suoi analoghi come potenziali composti terapeutici per la correzione dei difetti di splicing del gene CFTR”

Responsabile: Stefano Duga (Univ. Humanitas, Milano)

Adottanti: Del. FFC Roma

FFC#8/2015 “Studiare il ruolo della TG2 nella patogenesi della fibrosi cistica: identificazione di possibili bersagli terapeutici innovativi”

Responsabile: Mauro Piacentini (Dip. Biologia – Univ. Tor Vergata, Roma)

Adottanti: Del. FFC Cecina e Rosignano - LIFC Toscana - LIFC con Associazioni Regionali per Campagna Nazionale FFC 2015 - Del. FFC Novara

FFC#9/2015 “Identificazione di bersagli molecolari per ridurre l’effetto collaterale dei potenziatori sulla stabilità in membrana della F508del-CFTR”

Responsabile: Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecolare, UOC Lab. Analisi Osp. Borgo Trento, Dip. Patologia e Diagnostica - AOUI Verona)

Adottanti: Del. FFC Milano - “A bordo con Rachele #CorrerePerUnRespiro”

FFC#2/2016 “Strategie alternative per il ripristino funzionale di CFTR-F508del: nuovi target per lo sviluppo di farmaci contro la fibrosi cistica”

Responsabile: Giorgio Cozza (Ist. Europeo Ricerca in Fibrosi Cistica - presso Divisione Genetica e Biologia Cellulare, Ist. San Raffaele Milano)

Adottanti: LIFC Toscana

FFC#3/2016 “Strategie terapeutiche in fibrosi cistica basate su MicroRNA in grado di modulare CFTR e infiammazione (MicroRNA-CF)”

Responsabile: Roberto Gambari (Dip. Scienze della Vita e Biotecnologie, Sez. Biochimica e Biologia Molecolare, Univ Ferrara)

Adottanti: Del. FFC Lecce - Latteria Montello – Del. FFC Tradate Gallarate

FFC#4/2016 “Sviluppo di un peptide derivato dall’enzima PI3K γ come nuovo e efficace potenziatore del canale mutato CFTR-F508del”

Responsabile: Alessandra Ghigo (Dip. Biotecnologia Molecolare e Scienze Salute, Univ. Torino)

Adottanti: Del. FFC Vicenza

FFC#10/2016 “Modulazione della proteinchinasi CK2 per regolare le molecole chaperoniche che controllano il destino della proteina CFTR-F508del”

Responsabile: Mauro Salvi (Dip. Scienze Biomediche, Univ. Padova)

Adottanti: Gruppo FFC Seregno

AREA INFIAMMAZIONE POLMONARE

FFC#16/2013 “Fosfodiesterasi tipo-4 (PDE4) e recettori β 2 adrenergici come potenziali bersagli farmacologici per ridurre l’infiltrazione neutrofila e il danno polmonare nella fibrosi cistica. Studi preclinici e identificazione di biomarcatori di efficacia”

Responsabile: Virgilio Evangelista (Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Univ. Chieti)

Adottanti: LIFC con Associazioni Regionali per Campagna Nazionale FFC - Del. FFC Lecce - LIFC Emilia

FFC#20/2015 “Ruolo del meccanismo di controllo della qualità mitocondriale nella risposta infiammatoria innescata da *P. aeruginosa* in fibrosi cistica”

Responsabile: Alessandro Rimessi (Dip. Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione Segnali – Univ. Ferrara)

Adottanti: Del. FFC Fabriano / Gruppo FFC Perugia Città di Castello e Umbertide - Del. FFC Ferrara - Del. FFC Bologna

FFC#22/2015 “Uno studio sistematico di iminozuccheri, derivati del miglustat, come possibili farmaci antinfiammatori per la malattia polmonare in fibrosi cistica”

Responsabile: Cristina Dehecchi (Lab. Patologia Molecolare, Dip. Patologia e Diagnostica - Osp. Verona)

Adottanti: Del. FFC Genova - Gruppo FFC “Rita”, Verona - Del. FFC Pesaro con Gruppo FFC Fidenza - Del. FFC Cosenza Sud - Del. FFC Pavia - Del. FFC Catania Paternò

FFC#24/2015 “Cellule biliari con difetto di CFTR derivate da cellule staminali umane pluripotenti indotte (iPSC) come modello per studiare il ruolo dell’immunità innata nella malattia epatica della fibrosi cistica”

Responsabile: Mario Strazzabosco (Dip. Chirurgia e Medicina Traslazionale, Lab. Epatologia – Univ. Milano-Bicocca)

Adottanti: Del. FFC Imola e Romagna - Ma.Gia, Srl – Del. FFC Soverato e San Costantino Calabro – Del. FFC Taranto e Gruppi FFC Massafra e Alberobello

FFC#18/2016 “Valutazione preclinica dell’efficacia di composti che competono con i glicosaminoglicani polmonari nel ridurre l’infiammazione e il danno al tessuto causati dall’infezione cronica da *Ps. aeruginosa*”

Responsabile: Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, Div. Immunologia, Trapianto e Malattie infettive, Ist. Scientifico S. Raffaele, Milano)

Adottanti: Del. FFC Palermo - Vittoria, Ragusa e Siracusa - Catania Mascalucia - Messina - Gruppo FFC Tremestieri

AREA INFEZIONE POLMONARE

FFC#11/2015 “Nuovi modelli murini di fibrosi cistica con diversi profili genetici”

Responsabile: Nicola Ivan Lorè (Div. Immunologia, Trapianti, Malattie Infettive - Ist. Scientifico S. Raffaele, Milano)

Adottanti: Del. FFC Villa d'Almè - Reggio Calabria, con amici 1° Trofeo Neurone - Torino - Tradate Gallarate - Bologna

FFC#15/2015 “Impatto del trattamento anti-Staphylococcus aureus sul danno polmonare indotto da Ps. aeruginosa

Responsabile: Daniela Cirillo (Unità Patogeni Emergenti, Div. Immunologia, Trapianti, Malattie Infettive, Ist. S. Raffaele, Milano)

Adottanti: Del. FFC Palermo, Vittoria Ragusa Siracusa, Catania Mascalucia

FFC#19/2015 “Formulazioni inalabili di nuove molecole attive contro Burkholderia cenocepacia: dalle applicazioni in vitro a quelle in vivo”

Responsabile: Giovanna Riccardi (Lab. Microbiologia Molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologie L. Spallanzani, Pavia)

Adottanti: Del. FFC Como Dongo - Olbia Tempio - Reggio Calabria

FFC#21/2015 “Utilizzo del gallio come antibatterico nel trattamento delle infezioni polmonari da Pseudomonas aeruginosa”

Responsabile: Paolo Visca (Dip. Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia - Univ. Roma Tre)

Adottanti: Del. FFC Lago di Garda con i Gruppi FFC di Chivasso, Arezzo e Isola Bergamasca

FFC#13/2016 “Messa a punto di un modello single-cell e di un modello animale per lo studio della patogenesi dell'infezione da membri del Mycobacterium abscessus complex in pazienti con fibrosi cistica”

Responsabile: Enrico Tortoli (Unità Batteri Patogeni Emergenti, Div. Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Ist. San Raffaele Milano)

Adottanti: Gruppo FFC Ascoli Piceno - “Amici di Laura” Casnigo, BG - Del. FFC Valdadige - Gruppo Magenta Milano

FFC#14/2016 “Ruolo di sistemi regolati da piccoli RNA non codificanti nell'infezione da Pseudomonas aeruginosa delle vie aeree di malati FC: una nuova frontiera nell'identificazione di bersagli molecolari per antibatterici innovativi”

Responsabile: Giovanni Bertoni (Dip. Bioscienze, Univ. Milano)

Adottanti: Del. FFC Reggio Calabria - Gruppo FFC Vigevano

FFC#16/2016 “Terapia fagica per combattere le infezioni da Ps. aeruginosa in pazienti con FC

Responsabile: Daniela Ghisotti (Dip. Bioscienze, Univ. Milano)

Adottanti: LIFC Toscana

AREA RICERCA CLINICA / EPIDEMIOLOGICA

FFC#28/2015 “Fibrosi cistica e ileo da meconio: studio multicentrico sui fattori di rischio per esiti avversi durante l'infanzia”

Responsabile: Rita Padoan (Centro Supporto FC - Ospedale dei Bambini, Az. Ospedaliera Spedali Civili, Brescia)

Adottanti: Gruppo FFC Seregno -- Gruppo FFC Sassari Castelsardo - Del. FFC Cuneo Alba

FFC#29/2015 “Testare il recupero di funzione CFTR in pazienti FC con mutazioni nonsense e difetti di apertura del canale”

Responsabile: Claudio Sorio (Dip. Patologia e Diagnostica - Univ. Verona)

Adottanti: Donatori Campagna Pasqua 2016 - Gruppo FFC Altamura Bari - Del. FFC Manciano Grosseto, con Fam. Catalano - Del. FFC Montescaglioso Matera - Gruppo FFC Lecco Valsassina

FFC#30/2015 “Studio randomizzato multicentrico sull’eradicazione di Ps. aeruginosa in pazienti con FC: confronto tra il trattamento eradicante classico e il trattamento classico associato alla terapia antibiotica delle alte vie respiratorie”

Responsabile: Giovanni Taccetti (Dip. Medicina Pediatrica, Centro FC, Univ. Firenze, Osp. Meyer, Firenze)

Adottanti: Del. FFC Cecina e Rosignano - LIFC Toscana - Saint-Gobain Abrasivi S.p.a.

FFC#21/2016 “La realtà virtuale per ridurre il dolore e l’ansia del prelievo venoso nei bambini con fibrosi cistica”

Responsabile: Sofia Bisogni (Dip. Scienze Salute, Univ. Firenze)

Adottanti: Del. FFC Sondrio Valchiavenna

Per donare

- Online sul sito: fibrosicisticaricerca.it
- Bonifico Unicredit Banca (senza commissione presso questi sportelli):
IT 47 A 02008 11718 000102065518
- SWIFT-BIC code (per pagamenti dall'estero) UNCRITM1N58
- Banco BPM: IT 92 H 05034 11708 000000048829
- c/c postale n. 18841379
- 5x1000 alla FFC n. 93100600233

Le donazioni effettuate a favore di Onlus comportano il diritto di usufruire di alcune agevolazioni fiscali, così come previsto dal nostro sistema tributario.

Per approfondire: fibrosicisticaricerca.it/sostieni-la-fondazione nella sezione benefici fiscali



DONARE CON FIDUCIA

FFC aderisce all'Istituto Italiano della Donazione che ne attesta l'uso trasparente ed efficace dei fondi raccolti, a tutela dei diritti del donatore.



Presidente emerito
VITTORIANO FAGANELLI



Presidente
MATTEO MARZOTTO



Direttore Scientifico
GIANNI MASTELLA



Pres. Comitato Scient.
GIORGIO BERTON

Consiglio di Amministrazione

Presidente emerito: Vittoriano Faganelli

Presidente Matteo Marzotto

Vicepresidenti Paolo Faganelli,

Michele Romano

Consiglieri Michele Bauli, Sandro Caffi,

Francesco Cobello, Paolo Del Debbio,

Francesco Ernani, Giuseppe Ferrari,

Gianni Mastella, Donatella Treu,

Luciano Vettore, Patrizia Volpato.

Direzione scientifica

Direttore Gianni Mastella

Vicedirettore Graziella Borgo

Comitato di consulenza scientifica

Presidente Giorgio Berton

Consulenti Paola Bruni, Roberto Buzzetti,

Gian Maria Rossolini, Paolo Bernardi

Presidenza e Segreteria

(M. Marzotto, G. Cadoni, F. Lavarini)

Tel. 045 8123438-7037 - Fax 045 8123568

Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani 1

37126 Verona

fondazione.ricercaffc@aovr.veneto.it

gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it

federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

Direzione Scientifica (G. Mastella)

Tel. 045 8123567

gianni.mastella@aovr.veneto.it

Vicedirezione Scientifica (G. Borgo)

Tel. 045 8127027

borgograziella@gmail.com

Direzione di Gestione (G. Zanferrari)

Tel. 045 8127028

giuseppe.zanferrari@gmail.com

Amministrazione (G. Cadoni,

M. Bergamaschi, M. Giacomuzzi, E. Fabietti)

Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025 - 7029

gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it

fondazione.ricercaffc@aovr.veneto.it

Comunicazione

(M. Zanolli, R. Perbellini, S. Chignola, F. Malvezzi)

Tel. 045 8123599 - 7026

comunicazione.ffc@aovr.veneto.it

Ufficio stampa (P. Adami)

Tel. 045 581893

patrizia@clabcomunicazione.it

Raccolta Fondi e Rapporti con il Territorio

(F. Cabianca, L. Fratta, G. Buemi, F. Morbioli)

Tel. 045 8123605 - 7032 - 7033 - 3604

fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it

laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it

giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it

francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it

fibrosicisticaricerca.it

 **Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica**

 **fondazioneffc**

Delegazioni della Fondazione

Alessandria - Valle Scrivia	347 3095778
Ancona - Fabriano	347 8638704
Ascoli Piceno	New! 320 4792114
Avellino	349 3940749
Bari - Alberobello	348 2632041
Belluno	0437 943360
Bergamo - Trescore Balneario	338 4276716
Bergamo - Villa D'Almè	335 8369504
Biella	331 9028525
Bologna	348 1565099
Brescia	030 5233919
Brescia - Franciacorta	340 6589530
Brindisi - Torre	New! 327 2056244
Catania Mascalucia	333 1909983
Cagliari - Villasimius	348 7162291
Catania - Paternò	340 7808686
Catanzaro - Soverato	347 5283975
Cecina e Rosignano	340 6113886
Como - Dongo	333 7737473
Cosenza Nord	349 0519433
Cosenza Sud	347 9041138
Cuneo - Alba	333 6301943
Fermo	339 4758897
Ferrara	347 4468030
Foggia	320 4848190
Genova	348 1634818
Grosseto - Manciano	333 8221877
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	388 3498587
Lecco Valsassina	New! 338 9993582
Livorno	0586 808093
Lodi	347 0969534
Lucca	340 3436289
Matera - Montescaglioso	334 3477508
Messina	349 7109375
Milano	335 456809
Napoli e Pompei	081 679151
Napoli - San Giuseppe Vesuviano	338 7032132
Novara	331 7287449
Olbia Tempio	334 6655844
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	338 4124077
Parma	0521 386303
Pavia	338 3950152
Pesaro	347 0191092
Pescara	347 0502460
Ragusa - Vittoria Siracusa	338 6325645
Reggio Calabria	342 5618929
Reggio Emilia	0522 874720
Roma	339 7744458
Roma - Monterotondo	349 6500536
Roma - Pomezia	349 1538838
Rovigo	349 1252300
Sassari - Castelsardo	338 8437919
Siena	348 5435913
Sondrio Valchiavenna	333 7063142
Taranto "A Carmen La Gioia"	320 8715264
Taranto - Massafra	329 2025039
Torino	328 8352087
Torino - Rivarolo Canavese	347 9672344
Trapani - Marsala	333 7240122
Treviso - Montebelluna	335 8413296
Treviso - Trevignano	340 6749202
Trieste	348 4959691
Varese	347 8347126
Varese - Tradate Gallarate	347 2441141
Verbania e V.C.O.	338 2328074
Vercelli	335 1264091

Verona	347 8480516
Verona - Bovolone	348 3395278
Verona - Cerea "Il sorriso di Jenny"	339 4312185
Verona - Lago di Garda	348 7632784
Verona - Boschi Sant'Anna Minerbe	328 7140333
Verona - Valdadige	340 6750646
Verona - Valpolicella	339 3316451
Verona - Val d'Alpone	New! 328 9688473
Vibo Valentia - San Costantino Calabro	388 7767773
Vicenza	333 8877053
Viterbo	339 2107950

Gruppi di Sostegno della Fondazione

Agrigento	347 5490769
Alessandria - Acqui Terme	366 1952515
Alessandria - Casale Monferrato	New! 392 6657566
Ancona - Falconara	347 3329883
Arezzo	331 3700605
Asti - Moncalvo	New! 339 5819218
Bari - Altamura	334 7295932
Bari - Bitritto	340 1618950
Barletta	0883 519569
Benevento	347 4722532
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bolzano - Val Badia	0474 52012
Brindisi - Latiano	347 6350915
Cagliari - Isili	388 8925391
Campobasso	346 8744118
Cremona	New! 389 1191703
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Firenze - Reggello	328 7043136
Foggia - Manfredonia	347 5012570
Foggia - San Giovanni Rotondo	340 8789661
Frosinone	320 7277330
Genova "Mamme per la ricerca"	333 4761744
Golfo di Policastro	New! 328 8660690
Gorizia - Grado	328 6523404
Imperia	339 5073139
La Spezia - Sarzana "Natalina"	349 7665757
Macerata - Civitanova Marche	349 3746720
Medio Campidano	349 7829841
Messina - Tremestieri	328 5541071
Milano - Casarile	339 2055787
Milano - Lainate	348 3807009
Milano - Magenta	339 4887552
Milano - Seregno	338 4848262
Modena - Sassuolo	333 5862932
Nuoro - Siniscola	320 7953209
Oristano - Riola Sardo	342 5133252
Padova - Urbana	347 0814872
Parma - Fidenza	334 6994359
Pavia - Vigevano	339 2001843
Perugia - Città di Castello Umbertide	320 9273469
Prato	328 9076797
Ravenna - Faenza	0546 44310
Roma - Vaticano	328 2442701
Rovigo - Adria	377 2077527
Sassari - Alghero	329 2096790
Savona - Spotorno	334 3368141
Siracusa - Melilli	333 2005089
Sondrio - Morbegno	New! 349 6852688
Teramo - Martinsicuro	New! 388 9400461
Torino - Chivasso	011 9172055
Torino - Ivrea	335 7716637
Torino - Nichelino	New! 333 2923955
Trento - Ass.ne Trentina FC	340 5228888
Venezia - Mirano	340 1668645
Verona "Rita"	347 6064471



Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

www.fibrosicisticaricerca.it

