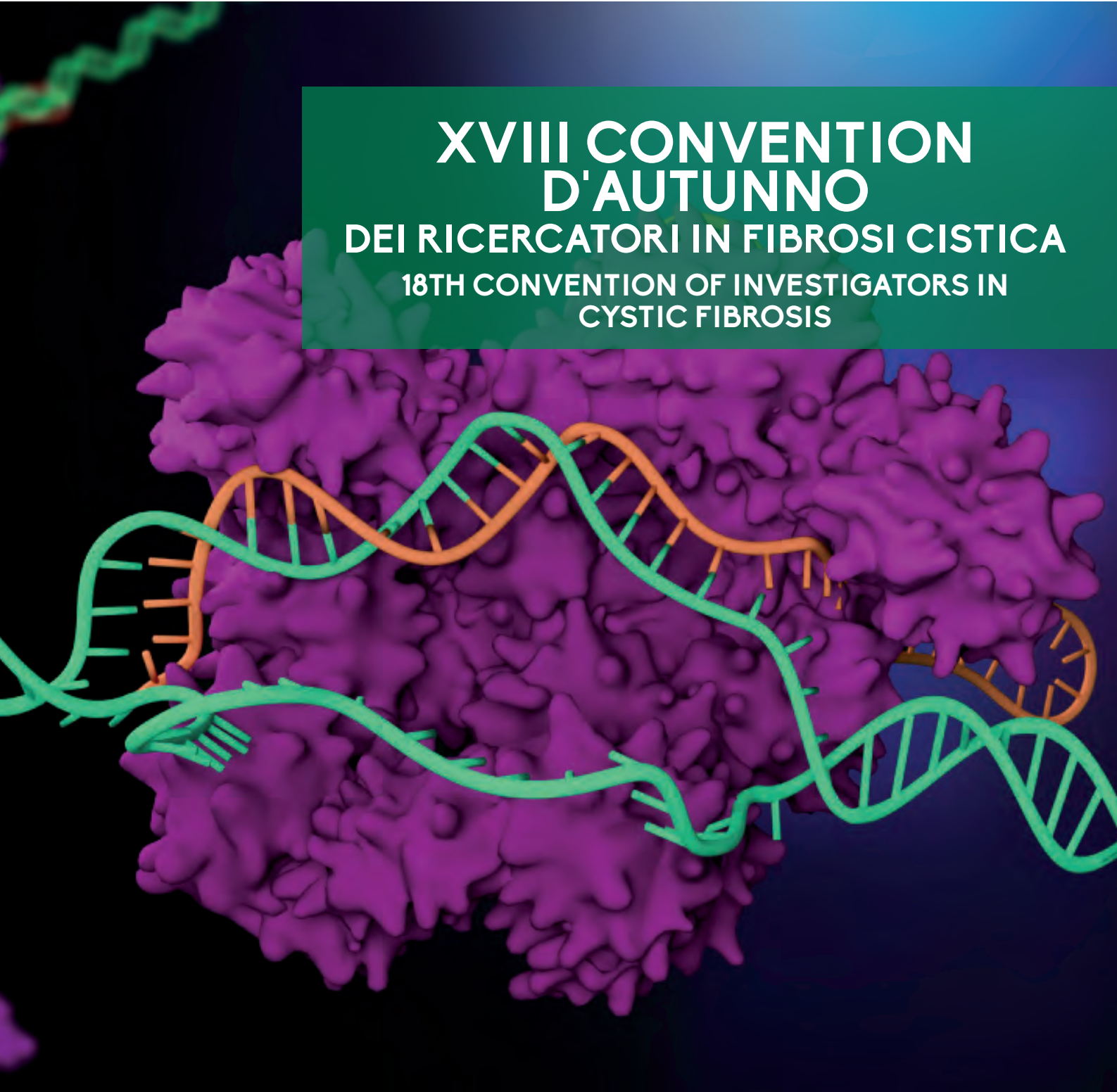




**Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus**  
*italian cystic fibrosis research foundation*

**XVIII CONVENTION  
D'AUTUNNO  
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA  
18TH CONVENTION OF INVESTIGATORS IN  
CYSTIC FIBROSIS**



**VERONA, 19/20 NOVEMBER 2020**

*In copertina/On the cover*

### **Correzione del DNA genico**

La nuova tecnica lavora in modo da riscrivere il DNA correggendo eventuali errori (mutazioni) presenti nella sequenza delle molecole che lo compongono. Nella cellula viene inserito il complesso chiamato CRISPR/Cas9, un insieme di proteine fra cui vi è Cas9, un enzima in grado di tagliare il DNA (Acido Desossiribonucleico a doppia elica); inoltre un filamento di RNA-guida (Acido Ribonucleico a singola elica), che è in grado di identificare il frammento di DNA mutato. L'RNA-guida aggancia questo frammento e porta Cas9 nel punto voluto. Lì Cas9 apre la doppia elica ed elimina il frammento. A seconda del tipo di mutazione, per correggerla a volte è sufficiente il taglio del frammento, altre volte al posto del frammento tagliato via deve essere inserita una copia della sequenza normale. L'immagine illustra CRISPR/Cas9 (in viola), RNA-guida (in arancio), che aggancia il frammento mutato del DNA (in verde) per portare in quella sede l'azione di Cas9.

### **Gene Editing**

*The new Gene Editing technique works to rewrite the DNA by correcting any errors occurring in its bases sequence. The following are inserted into the cell: a complex called CRISPR/Cas9, a set of proteins including the Cas9 protein, an enzyme capable of cutting DNA (double-stranded Deoxyribonucleic Acid); in addition, a strand of an RNA-guide (single-stranded Ribonucleic Acid), which is able to identify the mutated DNA fragment. The RNA-guide engages this fragment and drives Cas9 to the target point. Here Cas9 opens the double-strand and cuts the wrong fragment. Depending on the genetic error type, sometimes it is sufficient to cut the fragment, sometimes a copy of the normal fragment has to be inserted in the place of the mutated one. The image illustrates CRISPR/Cas9 (in purple), the RNA-guide (in orange), which identifies the altered DNA fragment (in green) and drives there Cas9.*

*In collaboration with*



Azienda Ospedaliera  
Universitaria Integrata  
Verona



*With the Patronage of*



CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO  
AGRICOLTURA VERONA

*With the Contribution of*



**Redazione:**

Gianni Mastella, Graziella Borgo, Federica Lavarini

**Grafica e impaginazione:**

Porpora ADV di Michela Chesini

Ada Frapporti

**Foto copertina:**

Meletios Verras - Biomed Graphics

**Stampa:**

Novembre 2020, Gruppo Sinergia Srl, Verona

# **XVIII CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA**

## ***18<sup>th</sup> Convention of FFC Investigators in Cystic Fibrosis***

***Webinar***

**Verona, 19-20 Novembre 2020  
Centro Congressi Camera di Commercio**

**Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti  
finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica  
(2018-2020)**

***Progress of research projects funded by FFC (2018-2020)***



**Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus**

*italian cystic fibrosis research foundation*

## GENERAL INDEX

Webinar Program at a glance .....	3
Webinar Full Program .....	4
Full Index of Abstracts .....	6
Project Adstracts .....	9

## APPENDICES

1. Archive of Publications & Congress Abstracts from FFC Projects (2011 - 2020) .....	64
2. Institutes and Laboratories involved in FFC Projects .....	91
3. International Reviewers of FFC Projects .....	95
4. FFC Projects (2002-2020): funding and publications .....	97
5. FFC Projects (2018 – 2020) adopted by Supporter .....	98

## Webinar Program at a glance

### Thursday, November 19<sup>th</sup>

- 08,25-08,30 Introduction and greetings
- 08,35-10,40 **Session 1**  
BASIC MECHANISMS FOR RECOVERY OF MUTATED CFTR
- 10,41-11,00 *Coffee & technical break*
- 11,01-13,30 **Session 2**  
THERAPY-ORIENTED *IN VITRO/EX VIVO* PREDICTIVE MODELS (Therotyping)
- 13,31-14,00 *Lunch & technical break*
- 14,00 -16,00 **Session 3**  
CLINICAL ISSUES

### Friday, November 20<sup>th</sup>

- 08,31-09,50 **Session 4**  
NEW PATHS TO RESCUING MUTATED CFTR
- 09,5-10,00 Technical break
- 10,01-11,30 **Session 5**  
NEW APPROACHES TO ANTIMICROBIAL TREATMENTS
- 11,31-11,50 *Coffee & technical break*
- Session 6**  
INFLAMMATION IN CYSTIC FIBROSIS: AN OBSTACLE COURSE
- 11,51-12,50 First part
- 12,51-13,20 *Lunch & technical break*
- 13,21-14,15 Second part
- 14,16-14,20 Closing remarks

# WEBINAR FULL PROGRAM

## (oral presentation)

**Thursday, November 19<sup>th</sup>**

08.25 - 08.30 Introduction & Greetings

### Session 1

#### BASIC MECHANISMS FOR RECOVERY OF MUTATED CFTR

Chairman: **Gambari R.** Co-chairman: **Borgo G.**

08.30 - 08.45 **Baroni D.**

Dissecting the rescue mechanisms mediated by CFTR correctors (FFC #3/2018, concluded)

08.46 - 09.00 **Hirsch E.**

In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3Ky-mediated regulation of CFTR (FFC#8/2018, concluded)

09.00 - 09.15 **Gambari R., Corradini R.**

Revealing the microRNAs-transcription factors network in cystic fibrosis: from microRNA therapeutics to precision medicine (CF-miRNA-THER) (FFC#7/2018, concluded)

09.16 - 09.30 Discussion (Replies to chat interventions)

09.31 - 09.40 *Technical break*

09.41 - 09.55 **Aureli M., Tamanini A.**

Development of ganglioside GM1-based therapy to improve F508delCFTR rescue approaches (FFC#2/2018, concluded)

09.56 - 10.10 **Luini A., Tamanini A., Borgatti M.**

Targeting the signalling network controlling proteostasis and inflammation to rescue F508del-CFTR (FFC#7/2019, concluded)

10.11 - 10.25 **Salvi M.**

Functional role of post-translational modifications in F508del correction (FC#11/2019, concluded)

10.26 - 10.40 Discussion (Replies to chat interventions)

10.41 - 11.00 *Coffee and technical break*

### Session 2

#### THERAPY ORIENTED IN VITRO/EX VIVO PREDICTIVE MODELS (Therotyping)

Chairman: **Galiotta L.** Co-Chairman: **Braggion C.**

11.01 - 11.15 **Eramo A., Lucarelli M.**

Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (therotyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches (FFC#12/2018, concluded)

11.16 - 11.30 **Sorio C.**

Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic (FFC#13/2018, concluded)

11.31 - 11.45 **Frulloni L., de Jonge H., Lucidi V.**

Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis (FFC#6/2018, concluded)

11.46 - 12.00 Discussion (Replies to chat interventions)

12.01 - 12.10 *Technical break*

12.10 - 12.25 **Averna M., Marengo E.**

Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX770 (FFC#12/2019, concluded)

12.26 - 12.40 **Laudanna C.**

Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test (FFC#13/2019, concluded)

12.41 - 12.55 **Pedemonte N., Cavalli A.**

Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RN5 inhibitors (FFC#9/2019, in progress)

12.56 - 13.10 **Netti P., Di Bernardo P.**

Investigating epithelial-stromal crosstalk in full thickness cystic fibrosis model on chip for evaluating novel therapeutic strategies (FFC#14/2019, in progress)

13.11 - 13.30 Discussion (Replies to chat interventions)

13.31 - 14.00 *Lunch and technical break*

### Session 3

#### CLINICAL ISSUES

Chairman: **Cipolli M.** Co-chairman: **Gangemi M.**

- 14.01 - 14.15 **Pasut G., Percudani R.**  
Therapeutic potential of a long-acting lung-specific DNase (DNase2b) for the treatment of CF (FFC#9/2018, concluded)
- 14.16 - 14.30 **Romano M., Lanuti P.**  
Identification and validation of circulating microvesicle analysis as a new ex vivo assay to monitor cystic fibrosis disease (FFC#29/2018, concluded)
- 14.31 - 14.45 **Bartoloni A., Viscoli C., Cariani L., Fiscarelli E.**  
Aspergillus pulmonary disease in cystic fibrosis (CF) patients: multicentre perspective observational study based on new diagnostic tests to evaluate the prognostic value on the CF disease (FFC#26/2018, concluded)
- 14.46 - 15.00 Discussion (Replies to chat interventions)
- 15.01 - 15.10 *Technical break*
- 15.11 - 15.25 **Palleschi A., Aliverti A.**  
Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis (FFC#27/2018, concluded)
- 15.26 - 15.40 **Terlizzi V., Padoan R., Tosco A., Claut LE.**  
Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome (FFC#30/2018, concluded)
- 15.41- 15.55 **Casciaro R., Graffigna G.**  
Patient Engagement in Cystic Fibrosis: a cross sectional multi-stakeholder study (FFC#25/2019, concluded)
- 15.46 - 16.00 Discussion (Replies to chat interventions)

### Friday, November 20<sup>th</sup>

### Session 4

#### NEW PATHS TO RESCUING MUTATED CFTR

Chairmen: **Pedemonte N.** Co-chairman: **Dehecchi C.**

- 08.31 - 08.45 **Barraja P., Scudieri P.**  
Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems (FFC#4/2018, concluded)
- 08.46 - 09.00 **Armirotti A.**  
Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF (FFC#1/2019)
- 09.01 - 09.10 Discussion (Replies to chat interventions)
- 09.11 - 09.25 **Duga S., Melfi R.**  
Small molecules modulating splicing as novel CFTR amplifier drugs (FFC#5/2019, concluded)
- 09.26 - 09.40 **Rusnati M., Fossa P., Orro A.**  
Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays (FFC#10/2019, concluded)
- 09.41 - 09.50 Discussion (Replies to chat interventions)
- 09.51 - 10.00 *Technical break*

### Session 5

#### NEW APPROACHES TO ANTIMICROBIAL TREATMENTS

Chairman: **Cirilli N.** Co-chairman: **Lorè N.**

- 10.01 - 10.15 **Pasca MR.**  
New weapons against Mycobacterium abscessus and other nontuberculous mycobacteria (FFC#19/2018, concluded)
- 10.16 - 10.30 **Cirillo DM.**  
Preclinical evaluation of liposomes carrying bioactive lipids as an immune therapeutic tool against in vitro and vivo infection with Mycobacterium abscessus (FFC#17/2019, concluded)
- 10.31 - 10.40 Discussion (Replies to chat interventions)
- 10.41 - 10.55 **Notomista E., Pizzo E.**  
In vitro and in vivo efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens (FFC#18/2018, concluded)
- 10.56 - 11.10 **Sanguinetti M., Vitali A., Iafisco M., Catalucci D.**  
Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections (FFC#20/2018, concluded)
- 11.11 - 11.30 Discussion (Replies to chat interventions)
- 11.31 - 11.50 *Coffee and technical break*

## Session 6

### INFLAMMATION IN CYSTIC FIBROSIS: AN OBSTACLE COURSE

Chairman: **Cabrini G.** Co-chairman: **Aureli M.**

- 11.51 - 12.05 **Romani L.**  
Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis (FFC#24/2018, concluded)
- 12.06 - 12.20 **Dehecchi MC., Guaragna A.**  
Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of  $\beta$ -sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-Miglustat (FFC#20/2019, concluded)
- 12.21 - 12.35 **Lampronti I., Chilin. A**  
Multi-task evaluation of TMA analogues as antiinflammatory treatments for CF lung disease (FFC#22/2019, concluded)
- 12.36 - 12.50 *Discussion (Replies to chat interventions)*
- 12.51 - 13.20 Lunch and technical break
- 13.21 - 13.35 **Antonelli G.**  
Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus–bacteria interactions in fibrosis cystic patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy (FFC#14/2018, concluded)
- 13.36 - 13.45 **Cigana C.**  
Off-target effects of CFTR-modulators in preclinical infection models (FFC#15/2018, concluded)
- 13.46 - 14.00 **Pistocchi AS.**  
Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis (FFC#23/2019, concluded)
- 14.01 - 14.15 *Discussion (Replies to chat interventions)*
- 14.15 - 14.20 Closing Remark

## FULL INDEX OF ABSTRACTS

*The presenter is underlined*

### 1. BASIC MECHANISMS FOR RECOVERY OF MUTATED CFTR

1. **Baroni D** ..... 9  
*Dissecting the rescue mechanisms mediated by CFTR correctors (FFC#3/2018. Concluded) \**
2. **Hirsch E** ..... 9  
*In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3K $\gamma$ -mediated regulation of CFTR (FFC#8/2018. Concluded) \**
3. **Gambari R, Corradini R** ..... 10  
*Revealing the microRNAs-transcription factors network in cystic fibrosis: from microRNA therapeutics to precision medicine (CF-miRNA-THER) (FFC#7/2018 concluded) \**
4. **Aureli M, Tamanini A** ..... 11  
*Development of ganglioside GM1-based therapy to improve F508delCFTR rescue approaches (FFC#2/2018. Concluded) \**
5. **Luini A, Borgatti M, Tamanini A** ..... 12  
*Targeting the signalling network controlling proteostasis and inflammation to rescue F508del-CFTR (FFC#7/2019. Concluded) \**
6. **Salvi M** ..... 13  
*Functional role of post-translational modifications in F508del correction (FFC#11/2019. Concluded - FFC#7/2020. New) \**
7. **Cozza G, Esposito S, Raia V** ..... 14  
*Restoring defective proteostasis in Cystic Fibrosis: novel strategies for F508delCFTR repair (FFC#4/2019. In progress)*
8. **Galietta LJV** ..... 15  
*Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue (FFC#6/2019. In progress)*
9. **Bertozi F** ..... 15  
*Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach (FFC#4/2020. New)*

### 2. THERAPY ORIENTED IN VITRO/EX VIVO PREDICTIVE MODELS (Therotyping)

10. **Eramo A, Lucarelli M** ..... 16  
*Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (therotyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches (FFC#12/2018, concluded. FFC#8/2020 Extension project) \**
11. **Sorio C** ..... 18  
*Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic (FFC#13/2018. Concluded) \**
12. **Frulloni L, Lucidi V, de Jonge H** ..... 18  
*Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis (FFC#6/2018. Concluded - FFC#5/2020. New) \**
13. **Averna M, Marengo E** ..... 19  
*Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX770 (FFC#12/2019. Concluded) \**
14. **Laudanna C** ..... 20  
*Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test (FFC#13/2019. Concluded) \**



<b>15. Pedemonte N, Cavalli A</b> .....	21
<i>Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNF5 inhibitors (FFC#9/2019. In progress) *</i>	
<b>16. Netti P, Di Bernardo D</b> .....	22
<i>Investigating epithelial-stromal crosstalk in full thickness cystic fibrosis model on chip for evaluating novel therapeutic strategies (FFC#14/2019. In progress)*</i>	
<b>17. Melotti M, de Jonge H, Castaldo G</b> .....	23
<i>Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators (FFC#9/2020. New)</i>	

### 3. CLINICAL ISSUES

<b>18. Pasut G, Percudani R</b> .....	24
<i>Therapeutic potential of a long-acting lung-specific DNase (DNase2b) for the treatment of CF (FFC#9/2018. Concluded) *</i>	
<b>19. Romano M, Lanuti P</b> .....	25
<i>Identification and validation of circulating microvesicle analysis as a new ex vivo assay to monitor cystic fibrosis disease (FFC#29/2018. Concluded) *</i>	
<b>20. Bartoloni A, Viscoli C, Cariani L, Fiscarelli EV</b> .....	25
<i>Aspergillus pulmonary disease in cystic fibrosis (CF) patients: multicentre perspective observational study based on new diagnostic tests to evaluate the prognostic value on the CF disease (FFC#26/2018. Concluded)*</i>	
<b>21. Palleschi A, Aliverti A</b> .....	26
<i>Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis (FFC#27/2018. Concluded) *</i>	
<b>22. Terlizzi V, Padoan R, Tosco A, Claut LE</b> .....	27
<i>Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an Italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome (FFC#30/2018, concluded. FFC#24/2020, extension project) *</i>	
<b>23. Casciaro R, Graffigna G</b> .....	28
<i>Patient Engagement in Cystic Fibrosis: a cross sectional multi-stakeholder study (FFC#25/2019. Concluded) *</i>	
<b>24. Battezzati A, Colombo C, Lucidi V, Lucanto MC, Mari A</b> .....	29
<i>Early Derangements of Glucose Tolerance in Cystic Fibrosis: Effect of CFTR Modulators (FFC#24/2019. In progress)</i>	
<b>25. Morana G</b> .....	30
<i>Standardized Ventilation Inflammation Perfusion and Structure (VIPS) MRI platform for monitoring Cystic Fibrosis Lung Disease (FFC#26/2019. In progress)</i>	
<b>26. Scaravilli V</b> .....	31
<i>Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplant (FFC#27/2019. In progress)</i>	
<b>27. Aliverti A</b> .....	32
<i>Use of multivolume MRI to assess response to CFTR modulators (FFC#21/2020. New)</i>	
<b>28. Cirilli N, Tiano L, Gesuita R</b> .....	32
<i>Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting: a translational research (FFC#22/2020. New)</i>	

### 4. NEW PATHWAYS TO RECOVER MUTATED CFTR

<b>29. Barraja P, Scudieri P, (Venturini A, Extension Project)</b> .....	33
<i>Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems (FFC#4/2018, concluded. - FFC#3/2020. Extension Project) *</i>	
<b>30. Armirotti A</b> .....	34
<i>Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF (FFC#1/2019. Concluded) *</i>	
<b>31. Duga S, Melfi R</b> .....	35
<i>Small molecules modulating splicing as novel CFTR amplifier drugs (FFC#5/2019. Concluded) *</i>	
<b>32. Rusnati M, Fossa P, Orro A</b> .....	36
<i>Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays (FFC#10/2019. Concluded) *</i>	
<b>33. Cereseto A, Arosio D</b> .....	36
<i>Harnessing CRISPR/Cas technology to revert DF508 CFTR defect (FFC#3/2019. In progress) *</i>	
<b>34. Mangoni ML</b> .....	37
<i>Frog skin-derived antimicrobial peptides as new potentiators to restore CFTR function (FFC#8/2019. In progress)</i>	
<b>35. Amato F</b> .....	38
<i>Peptide-nucleic acids as potential CFTR amplifier molecules for cystic fibrosis treatment (FFC#1/2020. New)</i>	
<b>36. Aureli M, Tamanini A</b> .....	39
<i>Lipid-based therapeutic strategies to optimize the effectiveness of innovative drugs to rescue F508del-CFTR (FFC#2/2020. New)</i>	
<b>37. Lentini L, Pibiri I</b> .....	40
<i>Validation of the distribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems (FFC#6/2020. New)</i>	

### 5. NEW APPROACHES TO ANTIMICROBIAL TREATMENTS

<b>38. Pasca MR (Makarov V, Ramon-Garcia S, Tortoli E, extension project)</b> .....	41
<i>New weapons against Mycobacterium abscessus and other nontuberculous mycobacteria (FFC#19/2018, concluded. FFC#14/2020, Extension Project.) *</i>	
<b>39. Cirillo DM</b> .....	41
<i>Preclinical evaluation of liposomes carrying bioactive lipids as an immune therapeutic tool against in vitro and vivo infection with Mycobacterium abscessus (FFC#17/2019. Concluded) *</i>	
<b>40. Notomista E, Pizzo E</b> .....	42
<i>In vitro and in vivo efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens (FFC#18/2018. Concluded) *</i>	

<b>41. Sanguinetti M, Vitali A, Iafisco M, Catalucci D</b> .....	43
<i>Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections (FFC#20/2018. Concluded) *</i>	
<b>42. Ascenzioni F, Imperi F, Botta B</b> .....	44
<i>Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens (FFC#15/2019. In progress)</i>	
<b>43. Biavasco F, Citterio B</b> .....	45
<i>Fighting Pseudomonas aeruginosa persists in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies (FFC#16/2019. In progress)</i>	
<b>44. Lleò MM</b> .....	46
<i>Investigating Achromobacter xylosoxidans pathogenicity and clinical role in CF lung infection (FFC#18/2019. In progress)</i>	
<b>45. Visca P, Sorrentino R</b> .....	46
<i>Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery of inhalable formulations to the clinic (FFC#19/2019. In progress)</i>	
<b>46. Bertoni G</b> .....	47
<i>Targeting small RNA-mediated regulation of virulence and antibiotic resistance to develop non-traditional therapeutic options against Pseudomonas aeruginosa (FFC#10/2020. New)</i>	
<b>47. Brun P, Marzaro G</b> .....	48
<i>Disrupting Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing signalling in Cystic Fibrosis patients as a new frontier for antibacterial therapy (FFC#11/2020. New)</i>	
<b>48. Fattorini L, Borroni E</b> .....	49
<i>New drug combinations against non-tuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis (FFC#12/2020. New)</i>	
<b>49. Guaragna A, De Gregorio E</b> .....	50
<i>Can old and new sweet glycomimetics act as antibacterial and antibiofilm agents in the treatment of CF lung disease infections? (FFC#13/2020. New)</i>	
<b>50. Lorè NI</b> .....	51
<i>Unravelling novel biomarkers to define the progression of Mycobacterium abscessus lung disease in cystic fibrosis (FFC#23/2020. New)</i>	
<b>51. Bragonzi A, Rossi G</b> .....	51
<i>Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis models (FFC#2/2019. New)</i>	
<b>52. Fraziano M</b> .....	52
<i>Preclinical study of a combined host- and pathogendirected approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against Mycobacterium abscessus (FFC#21/2019. New)</i>	

## 6. INFLAMMATION IN CYSTIC FIBROSIS: WAITING FOR CLINICAL APPLICATIONS

<b>53. Romani L</b> .....	53
<i>Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis (FFC#24/2018. Concluded) *</i>	
<b>54. Dehecchi MC, Guaragna A</b> .....	54
<i>Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of <math>\beta</math>-sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-miglustat (FFC#20/2019. Concluded) *</i>	
<b>55. Antonelli G</b> .....	55
<i>Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus-bacteria interactions in fibrosis cystic patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy (FFC#14/2018. Concluded) *</i>	
<b>56. Cigana C</b> .....	56
<i>Off-target effects of CFTR-modulators in preclinical infection models (FFC#15/2018. Concluded) *</i>	
<b>57. Piacentini M, Raia V</b> .....	57
<i>Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in Cystic Fibrosis (FFC#15/2020. New)</i>	
<b>58. Cellini B</b> .....	57
<i>Exploring the dual targeting of host and microbial sphingosine-1-phosphate lyase as antimicrobial strategy in cystic fibrosis (FFC#16/2020. New)</i>	
<b>59. Giovagnoli S</b> .....	58
<i>Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis (FFC#17/2020. New)</i>	
<b>60. Paroni M, Krogh Johansen H</b> .....	59
<i>Counteracting inflammation triggered by P. aeruginosa-activated lung-infiltrating Th1/17 cells: a novel approach for precision medicine in CF (FFC#18/2020. New)</i>	
<b>61. Recchiuti A, Aloisi A</b> .....	60
<i>Nanotechnology-based Resolvin D1 as Proresolving Therapy in Cystic Fibrosis: Preclinical Studies for the Delivery of Innovative Formulations to the Clinic (FFC#19/2020. New)</i>	
<b>62. Summa V, Altucci L</b> .....	61
<i>Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis (FFC#20/2020. New)</i>	
<b>63. Lampronti I, Chilin A</b> .....	62
<i>Multi-task evaluation of TMA analogues as antiinflammatory treatments for CF lung disease (FFC#22/2019. Concluded) *</i>	
<b>64. Pistocchi AS</b> .....	62
<i>Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis (FFC#23/2019. Concluded) *</i>	

# PROJECT ABSTRACTS

Projects that are presented orally at the webinar are marked with an asterisk (\*)

## BASIC MECHANISMS FOR RECOVERY OF MUTATED CFTR

### 1. Dissecting the rescue mechanisms mediated by CFTR correctors\*

**Baroni D**

Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Genova (FFC#3/2018. Concluded)



Debora Baroni, seconda da sinistra, con il gruppo di ricerca

**Background, problem, hypothesis.** Cystic fibrosis (CF) is caused by dysfunction of the CF Transmembrane conductance Regulator (CFTR), a cAMP-regulated anion channel that resides in the apical membrane of epithelial cells. Loss of CFTR function leads to defects in water, chloride, and bicarbonate transport that determines the build-up of a sticky and viscous mucus which cements on the epithelial surface of many organs, including lungs, liver, and pancreas. In the Caucasian population, the deletion of phenylalanine at position 508 of the protein (F508del) is the mutation with the greatest frequency. It causes errors in protein folding and trafficking, determining the lack of the expression of functional CFTR at the plasma membrane. In recent years some correctors, able to rescue the structural defects of the F508del-CFTR, partially increasing its expression on the plasma membrane, have been identified.

**Rationale and objectives of the project.** Despite the encouraging drug discovery results, to date no corrector mechanism of action and no corrector binding site have been clearly defined. For this reason, in this project a big effort was addressed to the identification of the binding sites of some correctors.

**Essential methods.** To achieve results, we prepared constructs codifying for different CFTR domains (segments comprising the F508 residue were produced in both wild type and mutated isoforms) and expressed them alone or together in mammalian cells. Cells preparations were incubated with different correctors (VX809, VX661, corr-4a, VX325, VX445 and two investigational molecules, an amino-arylthiazole named FCG and a derivative of VX809 termed 2a (kindly provided by professor Millo of Genoa University) to biochemically evaluate the effect of each drug on the expression and stability of each construct.

**Results.** Our results show that correctors VX809, VX661 and VX325 specifically improve the expression and the maturation of the mutant CFTR N-half (M1N1, residues 1–633). By contrast, corr4a appears to mainly influence the expression of CFTR C-half (M2N2, residues 837–1480). Ongoing experiments on correctors VX445 and FCG indicate that the NBD2 domain contains their binding site, while 2a derivative seems to bind to NBD1.

**Conclusions.** Results demonstrate not only that it is possible to identify the binding sites of available correctors but also could provide useful information for the design of better target-addressed corrector candidates, and criteria to propose the use of combinations of correctors to improve the pharmacological therapy.

### Analisi del meccanismo d'azione dei correttori della proteina CFTR

**Problema e ragioni dello studio.** La fibrosi cistica (CF) è una malattia genetica causata dalla disfunzione della proteina denominata regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), un canale anionico che risiede nella membrana apicale delle cellule epiteliali. La perdita della funzione della CFTR porta a difetti nel trasporto di acqua, cloruro e bicarbonato che determinano l'accumulo di un muco appiccicoso e viscoso che aderisce alla superficie epiteliale di molti organi, inclusi polmoni, fegato e pancreas. Nella popolazione caucasica, la delezione della fenilalanina in posizione 508 della proteina (F508del) è la mutazione con la maggiore frequenza. Essa causa errori nel ripiegamento e nel traffico della proteina, determinando la mancata espressione funzionale della CFTR a livello della membrana plasmatica. Negli ultimi anni sono stati individuati alcuni correttori in grado di recuperare i difetti strutturali della CFTR mutata, aumentandone parzialmente l'espressione sulla membrana plasmatica.

**Ipotesi e obiettivi.** Nonostante gli incoraggianti risultati della ricerca di nuovi farmaci, non si conoscono né il meccanismo d'azione né il sito di legame dei correttori ad oggi identificati. Perciò, questo progetto è stato centrato sull'identificazione dei siti di legame di alcuni correttori.

**Metodi essenziali.** Costrutti codificanti i diversi domini della CFTR (quelli in cui risiede la mutazione sono stati prodotti nelle due isoforme nativa e mutata) sono stati costruiti ed espressi, isolatamente o insieme, in cellule di mammifero. Le preparazioni cellulari ottenute sono state trattate con diversi correttori (VX809, VX661, corr-4a, VX325, VX445 e due molecole denominate, FCG e 2a (gentilmente forniteci dal professor Millo dell'Università di Genova) per valutarne biochimicamente l'effetto sull'espressione e la stabilità di ciascun costrutto.

**Risultati.** I risultati ottenuti mostrano che i correttori VX809, VX661 e VX325 migliorano in modo specifico l'espressione e la maturazione della prima metà della CFTR (M1N1, residui 1–633). Al contrario, il correttore corr4a sembra influenzare principalmente l'espressione della seconda metà della CFTR (M2N2, residui 837–1480). Esperimenti in corso sui correttori VX445 e FCG indicano che il dominio NBD2 contiene il loro sito di legame, mentre il derivato 2a sembra legarsi al dominio NBD1.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti dimostrano non solo che è possibile identificare i siti di legame dei correttori disponibili ma forniscono informazioni utili per la progettazione di correttori più specifici e bersaglio mirati e criteri per disegnare combinazioni di correttori per migliorare la terapia farmacologica.

### 2. In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3Ky-mediated regulation of CFTR\*

Uhlig A<sup>1,2</sup>, Murabito A<sup>1</sup>, Sala V<sup>1,2</sup>, Della Sala A<sup>1</sup>, Gianotti A<sup>3</sup>, Caci E<sup>3</sup>, de Poel E<sup>4</sup>, Beekman J<sup>4</sup>, Pedemonte N<sup>3</sup>, Hirsch E<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino, Italy; <sup>2</sup>Kither Biotech Srl, Torino, Italy; <sup>3</sup>Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy; <sup>4</sup>Department of Pediatric Pulmonology and the Regenerative Medicine Center Utrecht, University Medical Centrum, Utrecht, NL (FFC#8/2018. Concluded)



Emilio Hirsch, responsabile del progetto

**Background and rationale.** The underlying cause of cystic fibrosis (CF) is a mutation in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a chloride channel that is regulated by cAMP. cAMP-activated PKA phosphorylates the CFTR thus stimulating channel gating as well as trafficking to and stabilization at the plasma membrane. The clinical approval of drug combinations including CFTR correctors and potentiators highlighted the possibility of targeting the basic molecular defect of CF, although not all patients benefit from these treatments.

**Hypothesis and objectives.** We demonstrated that phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3K $\gamma$ ) restrains CFTR activation by serving as a scaffold for key enzymes of the cAMP/PKA signaling. The major aim of the proposed project is to characterize the role of PI3K $\gamma$  in regulating both CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion and channel localization at the plasma membrane in CF bronchial epithelial cells.

**Essential methods.** We previously generated a cell-permeable peptide targeting the scaffold function of PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$  mimetic peptide; PI3K $\gamma$  MP). Within this project, we assessed the ability of the PI3K $\gamma$  peptide to modulate Cl<sup>-</sup> currents in primary airway bronchial epithelial cells and intestinal organoids from both healthy individuals and patients carrying the most prevalent mutation F508del/F508del. In addition, immortalized epithelial cells were used to study the effect of the peptide on the localization of CFTR at the plasma membrane.

**Results.** We demonstrated that, although being able to significantly increase the amount of F508del-CFTR at the plasma membrane, the PI3K $\gamma$  MP does not promote short-circuit currents (ISC) in CF primary bronchial epithelial cells (pBECs) in the absence of correctors, like VX-809, indicating that the peptide does not function as a CFTR corrector itself. Accordingly, we next evaluated the ability of the peptide to increase the efficacy of approved CFTR modulators. The PI3K $\gamma$  MP was found to increase Orkambi-mediated swelling of F508del intestinal organoids by 6 folds and to augment by 2 folds the chloride currents induced by Trikafta in F508del-pBECs, demonstrating that the peptide can effectively potentiate the efficacy of CFTR modulators, including the newly approved combination Trikafta.

**Conclusions.** We validated PI3K $\gamma$  as a new pivotal regulator of the CFTR channel. Our data support the use of the cell-permeable peptide targeting the scaffold activity of PI3K $\gamma$  to potentiate the efficacy of combinations of CFTR modulators approved for patients carrying the most frequent F508del-CFTR allele. In the long term, the results of this project will eventually result in the development of new therapeutic tools to ease patient care in patients that do not or cannot fully benefit of currently available CFTR modulators.

## Caratterizzazione approfondita dei meccanismi molecolari alla base della regolazione del canale CFTR da parte dell'enzima PI3K $\gamma$

**Problema e ragioni dello studio.** La causa alla base della fibrosi cistica (FC) è una mutazione nel gene che codifica per il regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), un canale del cloro regolato dall'AMP ciclico (cAMP). La PKA attivata da cAMP fosforila il CFTR stimolandone l'apertura così come il traffico e la stabilizzazione sulla membrana plasmatica.

ca. L'approvazione nella pratica clinica di combinazioni di farmaci, inclusi correttori e potenziatori del CFTR, ha messo in evidenza la possibilità di colpire il difetto molecolare alla base della FC, sebbene non tutti i pazienti riescano a trarre beneficio da questi trattamenti.

**Ipotesi e obiettivi.** Abbiamo dimostrato che l'enzima fosfatidilinositolo 3-chinasi gamma (PI3K $\gamma$ ) limita l'attivazione del canale CFTR agendo come "piattaforma di ancoraggio" per enzimi chiave della segnalazione di cAMP/PKA. L'obiettivo principale del progetto è di caratterizzare il ruolo di PI3K $\gamma$  nella regolazione della secrezione di cloruro mediata dal CFTR e nella localizzazione del canale a livello della membrana plasmatica nelle cellule epiteliali bronchiali di pazienti affetti da FC.

**Metodi essenziali.** Recentemente, abbiamo ideato un peptide permeabile alle cellule in grado di inibire la funzione non chinasi di PI3K $\gamma$  (peptide mimetico di PI3K $\gamma$ ; PI3K $\gamma$  MP). In questo progetto, abbiamo valutato l'abilità del peptide di PI3K $\gamma$  di modulare le correnti di cloruro in cellule epiteliali bronchiali primarie e in organoidi intestinali derivati sia da individui sani che da pazienti portatori della mutazione più diffusa F508del/F508del. Inoltre, cellule epiteliali immortalizzate sono state utilizzate per studiare l'effetto del peptide sulla regolazione della localizzazione del CFTR sulla membrana plasmatica.

**Risultati.** Abbiamo dimostrato che, sebbene il PI3K $\gamma$  MP sia in grado di aumentare significativamente la quantità di F508del-CFTR sulla membrana plasmatica, non promuove le correnti di cloruro in cellule epiteliali bronchiali primarie di paziente con FC in assenza di correttori, come VX-809, indicando che il peptide non funziona come un correttore del CFTR. Successivamente, abbiamo valutato la capacità del peptide di potenziare l'efficacia dei modulatori del canale CFTR già approvati. Il peptide derivato da PI3K $\gamma$  ha mostrato di potenziare di sei volte l'effetto mediato da Orkambi negli organoidi intestinali F508del e di aumentare di due volte le correnti di cloruro indotte da Trikafta in F508del-pBECs. Questo dimostra come il peptide può effettivamente potenziare l'efficacia dei modulatori del canale CFTR, inclusa la combinazione recentemente approvata Trikafta.

**Conclusioni.** Abbiamo dimostrato il ruolo cardine di PI3K $\gamma$  nella regolazione del canale CFTR. I nostri dati supportano l'uso del peptide, capace di inibire la funzione non chinasi di PI3K $\gamma$ , per potenziare l'efficacia delle combinazioni approvate di modulatori del canale CFTR per i pazienti portatori dell'allele F508del-CFTR.

In una prospettiva a lungo termine, i risultati di questo progetto porteranno allo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici mirati a migliorare la cura dei pazienti che non beneficiano o non possono beneficiare pienamente dei modulatori del canale CFTR attualmente disponibili.

## 3. Revealing the microRNAs-transcription factors network in cystic fibrosis: from microRNA therapeutics to precision medicine (CF-miRNA-THER) \*

Gambari R<sup>1</sup>, Finotti A<sup>1</sup>, Gasparello J<sup>1</sup>, Fabbri E<sup>1</sup>, Cabrini G<sup>2</sup>, Dehecchi MC<sup>2</sup>, Tamanini A<sup>2</sup>, Sultan S<sup>1</sup>, Borgatti M<sup>1</sup>, Cipolli M<sup>3</sup>, Rozzi A<sup>4</sup>, Neri M<sup>4</sup>, Corradini R<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Sciences and Biotechnology, Ferrara, Italy; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pathology - University Hospital of Verona, Italy; <sup>3</sup>Cystic Fibrosis Center, University Hospital of Verona, Italy; <sup>4</sup>Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Italy. (FFC#7/2018.Concluded)

**Background and rationale.** CFTR regulation by microRNAs (miRNAs) is present in cystic fibrosis (CF). Modulation of miRNAs can be achieved with pre-miRNAs, antagomiRNA and masking molecules interfering with miRNA/mRNA interactions.

**Hypothesis and objectives.** (a) Characterization of key miRNAs regulating CFTR and CFTR modulators; (b) identification of mRNA targets of CF-associated miRNAs (including transcription factors





Roberto Gambari (a sx), responsabile del progetto, e Roberto Corradini, dell'unità partner

controlling CFTR); (c) studies on changes of the gene expression in CF (including CFTR activation) using antagomiRNA peptide nucleic acids (PNAs); (d) combined treatments using CFTR correctors and potentiators; (e) development of miRNA-masking PNAs; (f) characterization of miRNAs differentially present in body fluids of CF patients.

**Essential methods.** Next Generation sequencing, RT-qPCR and digital RT-ddPCR, Western blotting.

**Results.** Peptide Nucleic Acids (PNAs against miR-145-5p, miR-494-3p, miR-101-3p, all targeting CFTR mRNA) induced increase of CFTR in Calu-3 cells. An increase of CFTR was obtained with a PNA against miR-335-5p, targeting the CFTR modulator NHERF1 and by PNAs against miR-96-5p and miR-183-5p (both targeting ezrin mRNA). Specific and efficient PNA masking the miR-145-5p binding sites was demonstrated to increase CFTR. These PNA-based CFTR modifiers were studied in combination with CFTR potentiators and correctors. For example, maximum levels of CFTR increase were achieved in CFBE-41o-WT and CFBE-F508 by combining the miR145-maskingPNA with VX809 and VX770. In addition, the miR145-maskingPNA/VX809/VX770 combination was the most effective in stimulating CFTR-mediated chloride efflux in the CFBE41o- F508del CFTR YFP cell line. We have studied by NGS the global effects on the miRNome of treatments with PNA-a101, PNA-a335 and PNA-a145 demonstrating selective effects of the employed PNAs. We have concluded the characterization of novel delivery systems for PNAs and pre-miRNAs based on (a) porous silicon nanoparticles and (b) a macrocyclic multivalent tetraargininocalix[4]arene carrier. Heterogeneity of miRNA profile was found in plasma samples from CF patients, suggesting personalized strategy for miRNA therapy.

**Conclusions.** The major output of CF-miRNA-THER is the identification of miRNA targeting in translational medicine, with the objective of modifying gene expression of cystic fibrosis cells and, in particular, of increasing stability/expression of the CFTR protein. This therapeutic goal is very important for the treatment of cystic fibrosis.

## Caratterizzazione del Network microRNA-fattori di trascrizione in fibrosi cistica: dalla "terapia microRNA" alla medicina di precisione (CF-miRNA-THER)

**Ragioni dello studio.** La regolazione dell'espressione di CFTR da parte dei microRNA (miRNA) è importante in fibrosi cistica (CF). La modulazione dei miRNA può essere ottenuta con pre-miRNA, antagomiRNA e molecole capaci di mascherare i siti di legame dei modulatori e interferire con le interazioni miRNA/mRNA.

**Ipotesi e obiettivi.** (a) Caratterizzazione di miRNAs che regolano CFTR e modulatori di CFTR; (b) identificazione di mRNA bersaglio di miRNA associati a CF (compresi fattori di trascrizione che regolano CFTR); (c) studi delle modifiche dell'espressione genica in CF (compreso l'attivazione di CFTR) usando acidi peptido-nucleici (PNA) antagomiRNA; (d) trattamenti combinati basati su correttori e potenziatori di CFTR; (e) sviluppo di PNA "miRNA-masking"; (f) caratterizzazione di miRNA differenzialmente presenti nei fluidi biologici di pazienti CF.

**Metodi essenziali.** Sequenziamento del trascrittoma, RT-qPCR and digital RT-ddPCR, Western blotting.

**Risultati preliminari.** PNA contro miR-145-5p, miR-494-3p e miR-101-3p (tutti in grado di interagire con il CFTR mRNA) hanno indotto l'aumento di CFTR in cellule Calu-3. L'aumento di CFTR è stato ottenuto con un PNA contro miR-335-5p, specifico per il modulatore CFTR NHERF1 e con PNA contro miR-96-5p e miR-183-5p (entrambi regolanti l'mRNA ezrin). Abbiamo dimostrato che un PNA che maschera siti di legame di miR-145-5p presenti nell'mRNA CFTR aumenta il CFTR. Questi modificatori di CFTR basati su PNA sono stati studiati in combinazione con potenziatori e correttori. Ad esempio, i livelli massimi di aumento di CFTR sono stati raggiunti in cellule CFBE-41o-WT e CFBE-F508 combinando il miR145-maskingPNA con VX809 e VX770. Inoltre, la combinazione miR145-maskingPNA/VX809/VX770 è stata la più efficace nello stimolare l'efflusso di cloruro mediato da CFTR nella linea cellulare CFBE41-F508del CFTRYFP. Abbiamo studiato con NGS gli effetti sul miRNoma di trattamenti con PNA-a101, PNA-a335 e PNA-a145, dimostrando che effetti dei PNA sono selettivi. Abbiamo concluso la caratterizzazione di nuovi sistemi di veicolazione per PNA e pre-miRNA basati su (a) nanoparticelle di silicio poroso e (b) il carrier macrociclico multivalente tetraargininocalix[4]arene. Eterogeneità del pattern dei miRNA è stata riscontrata in campioni di plasma di pazienti CF, suggerendo una strategia personalizzata per la terapia con miRNA.

**Conclusioni.** La principale conclusione di CF-miRNA-THER è che il targeting di miRNA è utile per modificare l'espressione genica di cellule CF (e in particolare per aumentare la stabilità/espressione dell'mRNA CFTR). Questo obiettivo terapeutico è molto importante per il trattamento della fibrosi cistica.

## 4. Development of ganglioside GM1-based therapy to improve F508delCFTR rescue approaches\*

Tamanini A<sup>2</sup>, Loberto N<sup>1</sup>, Mancini G<sup>1</sup>, Bassi R<sup>1</sup>, Valsecchi M<sup>1</sup>, Dehecchi MC<sup>4</sup>, Santangelo A<sup>2</sup>, Prandini P<sup>2</sup>, Pedemonte N<sup>3</sup>, Cabrini G<sup>4</sup>, Aureli M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Sezione di Patologia Molecolare, UOC Laboratorio Analisi (Sede di Borgo Trento), Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona; <sup>3</sup>U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova; <sup>4</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università di Verona (FFC#2/2018. Concluded)



Massimo Aureli (a sx), responsabile del progetto, e Anna Tamanini, dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** The most common CFTR mutation, F508del, affects the protein trafficking and stability in the plasma membrane (PM), as well as the channel open probability. Many pharmacological agents have been designed to rescue the F508del-CFTR function including the combination of lumacaftor-ivacaftor (Orkambi®). Nevertheless, only modest improvements in lung function have been observed after treatment with Orkambi® in CF patients homozygous for F508del-CFTR, likely due to defects in protein stabilization at the PM, condition further impaired by P. aeruginosa infections. For this reason, a new challenge to ameliorate the efficacy of correctors and potentiators is to find new strategies to increase the PM stability of F508del-CFTR.

**Rationale and objectives of the project.** In CF bronchial epithelial cells, the absence of CFTR is accompanied by an alteration in the PM architecture in term of lipids and scaffolding proteins composition. Since among lipids, the family of sphingolipids plays a crucial role in the organization of specific lipidic domains that contains CFTR, we investigated whether the restoration of correct GM1 levels could be adjuvant to increase the effectiveness of Orkambi® therapy in term of F508del-CFTR rescue.

**Essential methods.** CF bronchial epithelial cells were fed with the sphingolipid-monosialo-ganglioside GM1 in combination with CFTR modulators to evaluate the expression of F508del-CFTR and of its scaffolding proteins. Photolabelling experiments were used to study the GM1 and CFTR interaction. CFTR function was studied by using YFP fluorescence measurements of iodide influx and by Ussing chamber on CF primary bronchial cells.

**Results.** We found that: i) CF primary bronchial cells are characterized by a reduced content of GM1 and cholesterol ii) GM1 and WT-CFTR or rescued F508del-CFTR reside in the same PM compartment; iii) the chronic treatment of CF bronchial epithelial cells with potentiator VX770 reverts the effect of the corrector VX809 in terms of rescued F508del-CFTR protein expression, CFTR scaffolding proteins content and lipid composition; iv) the exogenous administration of GM1 reduces the negative effect of potentiator VX770 and of *P. aeruginosa* infection on F508del-CFTR PM stability; vi) GM1 improves CFTR channel activity in CF cells treated with CFTR modulators.

**Conclusions.** Taken together, these results demonstrate that GM1 plays an active role on the stability and function of rescued F508del-CFTR and that could be considered a putative candidate for an innovative therapeutic option for CF patients.

## Stabilizzazione della proteina F508-del CFTR sulla membrana mediante ganglioside GM1

**Problema e Ragioni dello studio.** La CFTR con mutazione F508del è una proteina che non funziona correttamente. Per correggerne il difetto è necessario l'uso combinato di molecole in grado di indurre la normale maturazione (correttori), attivarne la funzione (potenziatori) e stabilizzarla a livello della membrana plasmatica (MP). La nuova combinazione, lumacaftor (VX809) – ivacaftor (VX770) [Orkambi®] ha però dato benefici minimi nei pazienti, probabilmente perché incapace di stabilizzare la CFTR mutata a livello della MP, condizione ulteriormente compromessa dalle infezioni da *P. aeruginosa*. Pertanto, risulta urgente la necessità di sviluppare nuovi approcci terapeutici capaci di aumentare la stabilità in MP della CFTR.

**Ipotesi ed obiettivi.** Nella MP delle cellule bronchiali, la proteina CFTR è localizzata in particolari aree organizzate dai ganglioside GM1. In modelli FC la mancanza di CFTR comporta una rimodulazione dell'architettura della MP sia in termini di contenuto lipidico che di proteine accessorie a CFTR. Il nostro obiettivo è quindi quello di investigare se il ripristino della corretta composizione lipidica, in particolare per il deficit nel ganglioside GM1, possa aumentare l'efficienza di correttori e potenziatori nel recupero funzionale della CFTR con mutazione F508del.

**Metodi essenziali.** Il GM1 è stato aggiunto a cellule epiteliali bronchiali FC in combinazione con il correttore VX809 e il potenziatore VX770 ed è stata studiata l'espressione e la funzione di CFTR e il contenuto lipidico di membrana. Inoltre, mediante l'utilizzo di sonde radioattive, abbiamo studiato la localizzazione del GM1 e di CFTR a livello della MP.

**Risultati.** Abbiamo dimostrato che: i) le cellule primarie bronchiali da paziente FC sono caratterizzate da un ridotto contenuto di GM1, ii) il GM1 e la proteina CFTR localizzano nella stessa porzione della MP, iii) il VX770 oltre a ridurre l'effetto del VX809 altera anche il contenuto lipidico della MP, iv) l'aggiunta del ganglioside GM1 riduce notevolmente l'effetto negativo del VX-770 e dell'infezione da *P.aeruginosa* aumentando la stabilità della proteina in membrana.

**Conclusioni.** I risultati indicano che il GM1, in cellule respiratorie FC, funziona come adiuvante per la terapia con Orkambi®. Essendo il GM1 una molecola già in uso per la cura di altre patologie,

questo studio potrebbe rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per migliorare l'efficacia dei trattamenti nei pazienti con FC.

## 5. Targeting the signalling network controlling proteostasis and inflammation to rescue F508del-CFTR\*

Luini A<sup>1</sup>, Borgatti M<sup>2</sup>, Tamanini A<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Biochimica delle Proteine, Dip. Scienze Biomediche CNR, Napoli;

<sup>2</sup>Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara;

<sup>3</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Lab. di Patologia Molecolare, UOC Lab. Analisi (FFC#7/2019. Concluded)



Alberto Luini, responsabile del progetto

**Background.** A pulmonary inflammatory process in CF patients is characterized by the presence of high number of neutrophils, which release oxygen free radicals, proteases and other products that cause pulmonary obstruction and airway damage. An increasing number of evidences, including our own, suggests that inflammatory processes act in a vicious circle to amplify themselves and also enhance the degradation of F508delCFTR, the misfolded mutant protein present in most CF patients.

**Hypothesis and objectives.** We propose that inflammation enhances degradation of F508delCFTR, reduces the availability of F508delCFTR for pharmacochaperones to act and thus compromises the effectiveness of corrector drugs in patients. We propose to: **a.** delineate signaling pathways regulating infection/inflammation induced degradation of F508delCFTR; **b.** target these signaling pathways to overcome this enhanced degradation, thus allowing effective rescue by "correctors" and also study how these signaling pathways contribute to exacerbation of inflammation that is common in CF patients.

**Results.** We found the inflammatory mediator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to be a potent controller of F508del-CFTR proteostasis. Treatment of bronchial epithelial CFBE with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to a strong decrease in F508del-CFTR levels. Further, we also found the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment reduced F508del-CFTR that is rescued by VX-809 treatment in both CFBE and primary bronchial epithelial cells. To understand the molecular pathways by which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> controls F508del-CFTR proteostasis, we knocked down kinases involved in stress activated MAPK pathway that is activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We found reducing the levels of MLK3 kinase and BAG3 strongly rescued H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced reduction in F508del-CFTR levels. Thus, targeting these kinase pathways is a potent target for rescuing F508del-CFTR and these findings have important therapeutic implications.

**Conclusions.** By proposing and validating a novel link between inflammation and proteostasis, this project encapsulates the mission of CF foundation to develop innovative drug treatment for CF.

## Coinvolgimento della rete di segnalazione che controlla la proteostasi e l'infiammazione per salvare F508del-CFTR



**Background.** Un processo infiammatorio polmonare nei pazienti CF è caratterizzato dalla presenza di un elevato numero di neutrofili, che rilasciano radicali liberi dell'ossigeno, proteasi e altri prodotti che causano ostruzione polmonare e danni alle vie aeree. Un numero crescente di prove, inclusa la nostra, suggerisce che i processi infiammatori agiscono in un circolo vizioso per amplificarsi e anche migliorare la degradazione di F508delCFTR, la proteina mutante mal ripiegata presente nella maggior parte dei pazienti CF.

**Ipotesi e obiettivi.** Proponiamo che l'infiammazione aumenti la degradazione di F508delCFTR, riduca la disponibilità di F508delCFTR affinché i farmacochaperoni agiscano e quindi comprometta l'efficacia dei farmaci correttori nei pazienti. Ci proponiamo di: a. delineare le vie di segnalazione che regolano la degradazione indotta da infezione / infiammazione di F508delCFTR; b. indirizzare questi percorsi di segnalazione per superare questo degrado accresciuto, consentendo così un salvataggio efficace da parte dei "correttori" e c. studiare anche come queste vie di segnalazione contribuiscano all'esacerbazione dell'infiammazione che è comune nei pazienti CF.

**Risultati.** Abbiamo scoperto che il mediatore infiammatorio  $H_2O_2$  è un potente controllore della proteostasi F508del-CFTR. Il trattamento della CFBE epiteliale bronchiale con  $H_2O_2$  ha portato a una forte diminuzione dei livelli di F508del-CFTR. Inoltre, abbiamo anche scoperto che il trattamento con  $H_2O_2$  riduce F508del-CFTR, che viene salvato dal trattamento con VX-809 sia in CFBE che nelle cellule epiteliali bronchiali primarie. Per comprendere le vie molecolari attraverso le quali  $H_2O_2$  controlla la proteostasi F508del-CFTR, abbiamo abbattuto le chinasi coinvolte nella via MAPK attivata da stress per l'azione di  $H_2O_2$ . Abbiamo riscontrato che la riduzione dei livelli di chinasi MLK3 e BAG3 ha fortemente recuperato la riduzione indotta da  $H_2O_2$  nei livelli di F508del-CFTR. Pertanto, il targeting di queste vie chinasi è un potente bersaglio per il salvataggio di F508del-CFTR e questi risultati hanno importanti implicazioni terapeutiche.

**Conclusioni.** Proponendo e convalidando un nuovo collegamento tra infiammazione e proteostasi, questo progetto racchiude la missione della Fondazione Ricerca FC di sviluppare un trattamento farmacologico innovativo per la FC.

## 6. Functional role of post-translational modifications in F508del correction\*

D'Amore C, Borgo C, Cesaro L, **Salvi M**

Department of Biomedical Sciences, University of Padova (FC#11/2019. Concluded. FFC#7/2020, Extension Project)



Mauro Salvi (secondo da sx), responsabile del progetto, con i collaboratori

**Background, problem, hypothesis.** Deletion of phenylalanine at position 508 (F508del) in CFTR is the most frequent mutation causative of Cystic Fibrosis (CF). F508 deletion is responsible for defective folding and processing of CFTR, which fails to traffic to the plasma membrane (PM) and causes the majority of CFTR protein to be retained in the endoplasmic reticulum. Recently it has been iden-

tified a number of posttranslational modifications (PTMs) associated with the maturation of CFTR. A subset of these PTMs, collectively named "PTM code" was suggested to be particularly relevant in the maturation of F508del CFTR. CK2 has been suggested as the kinase responsible for the phosphorylation of the PTM code and we have demonstrated that CK2 should not be inhibited to favour F508del correction. However, it is not yet established if these posttranslational modifications are a consequence of the correction or are required for channel maturation. Moreover, the identification of this PTM code suggests that methylation could be an unexplored posttranslational mechanism for F508del functional rescue.

**Rationale and objectives of the project.** The Project objectives aim to understand if the PTM code is required for the F508del-CFTR functional recovery and to highlight the role of protein methylation in F508del-CFTR rescue.

**Essential Methods.** F508del CFTR expression plasmid has been mutated in the PTM code. Mutants have been transfected in human CF bronchial cells (CFBE). F508del-CFTR-mutants maturation has been assayed by western blot after the addition of a combination of correctors (VX-445 and VX-661). The activity of F508del-CFTR mutants has been assayed by SPQ. All human demethylases have been downregulated by transfection of at least two different siRNA in the presence or absence of a corrector in CFBE stably overexpressing F508del-CFTR. Channel maturation has been assayed by western blot, while its functional recovery has been assessed by the halide sensitive YFP assay.

**Results.** This mutational study led us to show that F508del-CFTR correction is not affected by the single amino acid mutations of the PTM code. Moreover, we have mutated simultaneously all the PTM code and the multiple mutant can be still corrected at a similar extent of the F508del. Our results strongly support that the recently identified PTM code is not required for F508del-CFTR correction and suggest that its modulation does not represent a valuable pharmacological approach. In the perspective that preserving the F508del-CFTR methylation can favour its maturation, we have reduced the expression one-by-one of all human demethylases and the maturation of F508del-CFTR in presence or absence of a corrector has been assayed. We have identified three demethylases whose downregulation stimulates F508del-CFTR recovery induced by correctors.

**Project extension (FFC#7/2020).** Despite the lack of a functional role of the PTM code in F508del-CFTR correction, it is still open the possibility that other PTMs modulated during the CFTR maturation can have a role in the channel trafficking. Moreover, the results obtained during our one-year pilot project show that protein methylation may affect, directly or indirectly, F508del-CFTR correction. In the second year, we have planned to investigate more in depth the mechanism by which methylation affects F508del maturation and its potential crosstalk with other modifications.

## Ruolo di modifiche post-traduzionali nel recupero funzionale di F508del CFTR.

**Problema e ragioni dello studio.** La delezione di un singolo aminoacido nella posizione 508 (F508del) di CFTR è la più frequente mutazione che causa la Fibrosi Cistica. La delezione di F508 è responsabile di un ripiegamento non corretto della proteina che porta alla sua ritenzione nel reticolo endoplasmatico. Recentemente sono state identificate un certo numero di nuove PTMs (Modifiche post-traslazionali o post-traduzionali, che avvengono cioè dopo la sintesi della proteina CFTR, ndr) associate con la maturazione del canale, e in particolare un gruppo di queste PTMs, chiamato "PTM code" è stato suggerito essere particolarmente rilevante nel recupero funzionale di F508del-CFTR. Alcune evidenze sperimentali indicano la CK2 quale la chinasi responsabile della fosforilazione di tre siti nel "PTM code" e, recentemente, abbiamo dimostrato come CK2 non debba essere inibita per favorire la maturazione di F508del-CFTR. Tuttavia, non è stato chiarito se la presenza di questo PTM code sia una conseguenza di un recupero funzionale del F508del indotto da correttori, o una *conditio sine qua non* per il ripristino funzionale del canale. Inoltre, l'identifica-

zione del "PTM code" suggerisce che la metilazione possa essere una modifica post-traduzionale la cui regolazione abbia un ruolo importante nella maturazione di F508del-CFTR.

**Ipotesi e Obiettivi.** Scopo di questo progetto è capire il ruolo del "PTM code" e più in generale il ruolo della metilazione proteica nel recupero funzionale di F508del-CFTR.

**Metodi essenziali.** I siti modificati nel "PTM code" sono stati mutati nel cDNA di un plasmide esprime F508del. I mutanti sono stati trasfettati in cellule umane bronchiali CF (CFBE). La maturazione dei mutanti dopo l'aggiunta di una combinazione di correttori (VX-445 e VX-661) è stata quantificata mediante western blot e il recupero funzionale mediante SPQ. Tutte le demetilasi umane sono state silenziate mediante la trasfezione di almeno due differenti siRNA in presenza o assenza di un correttore del CFTR in cellule CFBE overesprimenti F508del-CFTR. La maturazione di F508del è stata monitorata mediante western blot e il recupero funzionale mediante il saggio HS-YFP.

**Risultati.** I nostri risultati mostrano che la correzione di F508del non è compromessa, né favorita da singole mutazioni del "PTM code". Inoltre, abbiamo mutato simultaneamente tutto il "PTM code" e il mutante multiplo può ancora essere corretto similmente al F508del non mutato. I nostri risultati sembrano indicare che il recentemente identificato "PTM code" non sia richiesto per la correzione di F508del-CFTR. Per identificare le demetilasi coinvolte nella regolazione di F508del-CFTR abbiamo silenziato, una per una, tutte le demetilasi umane e la maturazione di F508del in presenza e in assenza di un correttore è stata quantificata mediante western blot e mediante il saggio di HA-YFP. Sono state identificate tre demetilasi la cui riduzione di espressione favorisce il recupero funzionale di F508del-CFTR indotto da correttori.

**Estensione del progetto (FFC#7/2020).** Nonostante i nostri risultati dimostrino che il PTM code non è coinvolto nella correzione di F508del, non si può escludere che altre PTMs, dimostrate variare durante la maturazione del CFTR, possano essere coinvolte nella regolazione del traffico intracellulare di CFTR. Siamo comunque riusciti a dimostrare che preservare la metilazione proteica è importante per la maturazione di F508del. Nel secondo anno abbiamo programmato di investigare in maniera dettagliata il/i meccanismi attraverso i quali la metilazione possa regolare la maturazione di F508del.

## 7. Restoring defective proteostasis in Cystic Fibrosis: novel strategies for F508del-CFTR repair

Esposito S<sup>1</sup>, Vilella VR<sup>1</sup>, Ottaviani D<sup>2</sup>, Ferrari E<sup>1,3</sup>, Monzani R<sup>1,3</sup>, Venerando A<sup>4</sup>, Tosco A<sup>5</sup>, Castaldo A<sup>5</sup>, Sepe A<sup>5</sup>, Cimbalo C<sup>5</sup>, Rossetto M<sup>2</sup>, Bosello Travain V<sup>2</sup>, Roveri A<sup>2</sup>, Miotto G<sup>2</sup>, Maiorino M<sup>2</sup>, Ursini F<sup>2</sup>, Raia V<sup>5</sup>, Cozza G<sup>2</sup>

<sup>1</sup>European Institute for Research in Cystic Fibrosis (IERFC), San Raffaele Institute, Milan, Italy; <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, University of Padua, Italy; <sup>3</sup>Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, 28100, Italy; <sup>4</sup>Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Italy; <sup>5</sup>Department of Translational medical sciences, University of Naples Federico II, Regional Cystic Fibrosis Care Unit, Naples, Italy (FFC#4/2009. In progress)

**Background, problem, hypothesis.** Cystic Fibrosis (CF) is a life-shortening genetic disorder, caused by mutations of the ion channel CFTR. The most common F508delCFTR mutant is unable to traffic to and reside at the plasma membrane (PM). Currently, CFTR-repairing therapies are available for F508delCFTR. Our alternative approach aims at targeting the derailed CF intracellular environment, through a combination of drugs able to inhibit TG2 activity, specific protein kinases and modulate the nuclear factor Nrf2.

**Rationale and objectives of the project.** We aim to 1) refine new targets as novel therapeutic strategy in CF by exploiting a network of *in silico* and experimental approaches; 2) validate the efficacy of novel drug candidates in pre-clinical CF models.



Giorgio Cozza (al centro) e le ricercatrici partner del progetto (V. Raia a sx, S. Esposito a dx)

**Essential Methods.** We used: A) *in silico* approaches to identify novel chemical entities able to interact with new protein targets; B) *in vitro* and *in cell* methodologies to validate the best candidates from A; C) *in vivo* validation into appropriate mouse models.

**Results.** A) Identification of novel TG2 inhibitors. We have identified novel promising compounds able to inhibit TG2. These molecules are able to restore CFTR function equally to VX809 (>70%), in some cases at a concentration more than 10 fold lower, in both CFBE410-cells and in *ex vivo* cells collected by nasal brushing from CF patients. Moreover, promising results were obtained by studying the combination of these molecules thus confirming that i) the rescued channel resides at the PM; ii) Beclin 1-dependent autophagy is restored; iii) inflammation biomarkers are reduced. B) Identification of novel modulators of protein kinases and Nrf2. By applying our discovery strategies against our target models, we have identified and characterized two approved pharmaceutical entities able to restore F508del-CFTR function in CFBE410-cells. These molecules have been prioritized for *in vivo* validation. C) Evaluation of our novel strategy against other class II mutations. Besides F508delCFTR, other class II mutations are unlikely to benefit from the existing therapy. On this respect, we have successfully validated our approach against N1303K mutation.

**Conclusions.** The novel compounds identified represent a new frontier for the treatment of Cystic Fibrosis, by a) clarifying the roles of several other target proteins in CF, despite from the F508delCFTR itself; b) giving the opportunity to be translated to other class II mutations where no effective therapies are actually available; c) paving the way for novel clinical studies with single drug candidates or a combination of them able to improve the life of CF patients.

## Ripristino della proteostasi difettiva in fibrosi cistica: nuove strategie per il recupero di CFTR-F508del

**Problema e ragioni dello studio.** La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia genetica a prognosi infausta, causata da mutazioni della proteina CFTR. La proteina portatrice della mutazione più comune, F508delCFTR, non è in grado di stationare a livello della membrana plasmatica (MP). Attualmente sono disponibili terapie per i pazienti omozigoti ma anche eterozigoti per la F508del. Il nostro approccio alternativo mira a migliorare il compartimento intracellulare che causa la bassa espressione del CFTR sulla superficie cellulare, attraverso la combinazione di molecole in grado di inibire l'attività di TG2 e di specifiche proteine chinasi e modulare il fattore nucleare Nrf2.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro progetto ha l'obiettivo di 1) definire nuovi target terapeutici nella FC utilizzando un network di approcci computazionali e sperimentali; 2) validare l'efficacia di nuove molecole candidate in modelli preclinici di FC.

**Metodi essenziali.** A) Approcci computazionali per identificare nuove molecole capaci di interagire con i nuovi target proteici. B) Metodologie *in vitro* e in cellule per validare i migliori candidati del punto A). C) Validazione *in vivo* in appropriati modelli murini.

**Risultati.** A) Identificazione di nuovi inibitori del TG2. Abbiamo identificato una serie di nuovi promettenti composti in grado di inibire la proteina TG2. Queste molecole sono in grado di ripristinare la funzione CFTR in maniera paragonabile al VX809 (> 70%), in alcuni



casi a una concentrazione più di 10 volte inferiore, sia in modelli cellulari (CFBE41o-), sia ex vivo in cellule derivate da brushing nasale di pazienti CF. Inoltre, risultati promettenti sono stati ottenuti studiando la combinazione di queste molecole confermando che i) il canale recuperato risiede nella MP; ii) il ripristino del marcatore di autofagia Beclin1; iii) la riduzione dei marker di infiammazione.

B) Identificazione di nuovi modulatori di protein chinasi e Nrf2. Applicando la nostra strategia di identificazione di nuove molecole verso i bersagli selezionati durante il progetto, abbiamo identificato e caratterizzato alcuni farmaci approvati in grado di recuperare la funzione del F508delCFTR in cellule CFBE41o-. Queste molecole hanno avuto la priorità per la convalida *in vivo*. C) Valutazione della nostra nuova strategia contro altre mutazioni di classe II. Al di là di F508delCFTR, è poco probabile che altre mutazioni di classe II traggano beneficio dalla terapia esistente. A questo proposito, abbiamo convalidato con successo il nostro approccio alla mutazione N1303K.

**Conclusioni.** I composti identificati rappresentano una nuova frontiera per il trattamento delle FC, a) chiarendo il ruolo di altre proteine target nella FC, al di là di F508delCFTR, b) fornendo la prospettiva di essere traslati in altre mutazioni di classe II dove non sono disponibili terapie efficaci; c) aprendo la strada a nuovi studi clinici con singoli farmaci o una combinazione di essi in grado di migliorare la vita dei malati CF.

## 8. Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue

Musante I, Renda M, Borrelli A, Guidone D, Genovese M, Venturini A, Galiotta LJV

Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM, Pozzuoli, Italy) (FFC#6/2019, In progress)



Luis Galiotta, responsabile del progetto

**Background.** F508del, the most frequent mutation in cystic fibrosis (CF), impairs the folding and stability of the CFTR chloride channel. Treatment with first generation correctors, such as VX-809, does not impede that a significant fraction of F508del-CFTR is eliminated by cell quality control mechanisms based on ubiquitination and proteasome/lysosome-dependent degradation.

**Rationale and objectives of the project.** Our proposal aims at the identification of deubiquitinases (DUBs) and ubiquitin ligases (UBLs) that control mutant CFTR degradation. We also aim at the identification of pharmacological strategies to improve the rescue of mutant CFTR by either blocking the cell mechanisms involved in CFTR degradation or by directly targeting the CFTR protein itself.

**Essential Methods.** We use small molecules and gene silencing to identify the proteins that are involved in F508del-CFTR processing in order to find pharmacological treatments with enhanced rescue ability. We are also using single cell RNA sequencing to profile gene expression in airway epithelial cells with the specific aim to clarify the transcriptome of ionocytes in which CFTR is specifically expressed.

**Results.** Using gene silencing by siRNA transfection, we have

identified a panel of DUBs (USP13, USP15, UCHL1) and UBL (HUWE1) that influence F508del-CFTR rescue by corrector VX-809. We are testing pharmacological agents (proteostasis modulators) with the potential ability to modulate these mechanisms as well as combination of CFTR correctors belonging to different chemical and functional classes. When tested in primary airway epithelial cells, the most effective treatments appear to specifically improve F508del-CFTR trafficking in FOXI1-positive cells, i.e. ionocytes.

**Conclusions.** So far, combinations of correctors having complementary mechanisms of action appear to be the most effective maneuvers on F508del-CFTR expression and function compared to proteostasis modulators. It has to be defined whether the efficacy of corrector combinations is still limited to some extent by protein degradation mechanisms.

## Identificazione di deubiquitinasi e ubiquitina-ligasi che influenzano la correzione della proteina CFTR mutata

**Problema e ragioni dello studio.** La mutazione più frequente nei pazienti con fibrosi cistica (FC) è F508del, che provoca un grave difetto di stabilità e maturazione della proteina CFTR. Per il trattamento dei pazienti con F508del sono a disposizione dei farmaci, chiamati correttori, la cui efficacia può essere però limitata da processi cellulari che provocano la degradazione della proteina mutata.

**Ipotesi e obiettivi.** La nostra ipotesi è che la proteina CFTR con F508del, nonostante il trattamento con correttori, sia in parte eliminata a causa di proteine intracellulari chiamate ubiquitina-ligasi (UBL). Le UBL agiscono da controllori; riconoscono la proteina CFTR con la mutazione F508del e attaccano ad essa l'ubiquitina, una specie di etichetta molecolare che ne determina l'eliminazione. Esistono anche proteine con azione contraria. Queste sono le deubiquitinasi (DUB), ne esistono circa 100, che rimuovono l'ubiquitina salvando le proteine dalla degradazione. Il nostro obiettivo è di identificare le UBL e le DUB che controllano il destino della proteina CFTR mutata. Al tempo stesso cerchiamo composti chimici che possono recuperare la funzione della proteina CFTR, agendo su UBL/DUB o direttamente sulla proteina CFTR stessa.

**Metodi essenziali.** Per il nostro studio utilizziamo cellule in coltura che sono state modificate in maniera da esprimere la proteina CFTR con la mutazione F508del. Su queste cellule valutiamo l'effetto del silenziamento di geni corrispondenti a UBL e DUB e l'effetto di composti chimici con attività correttiva. Esperimenti di verifica vengono poi condotti su cellule epiteliali delle vie aeree di pazienti FC.

**Risultati.** Abbiamo identificato un piccolo pannello di DUB e di UBL che, se opportunamente modulate mediante silenziamento, mostrano di cambiare la funzione della proteina CFTR mutata. Stiamo verificando la possibilità di mimare questi effetti con composti chimici. Tali composti potrebbero essere associati a correttori per ottenere effetti "terapeutici" additivi o sinergici.

**Conclusioni.** I nostri risultati potranno favorire lo sviluppo di strategie per migliorare l'efficacia di trattamenti farmacologici per la proteina con F508del e altre mutazioni simili. Si può infatti ipotizzare lo sviluppo di farmaci mirati che, promuovendo l'attività di DUB e/o inibendo l'attività di UBL, avranno l'effetto desiderato di proteggere la CFTR mutata favorendo l'azione dei correttori.

## 9. Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach

Bertozzi F

Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova (FFC#4/2020, New)

**Background, problem, hypothesis.** Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease characterized by an impairment in the synthesis or



Fabio Bertozzi, responsabile del progetto

function of CF transmembrane conductance regulator (CFTR) anion channel, caused by mutations in CFTR gene. In the framework of the project "Task Force for Cystic Fibrosis (TFCF)", funded by the Italian CF Foundation, our group discovered ARN23765, a CFTR corrector with a sub-nanomolar potency in rescuing the function of mutant CFTR in primary human bronchial epithelial cells from F508del/F508del CF patients. Despite the validated pharmacological effects, the mechanism of action of ARN23765 has not yet been defined. CFTR correctors may act by directly binding to F508del-CFTR or by modulating the activity of other proteins involved in the cell quality control system or the protein trafficking machinery.

**Rationale and objectives of the project.** The primary aim of our project is to unveil the biological target(s) and the mechanism of action of ARN23765 by Photo-Affinity Labeling (PAL) studies. Furthermore, the identification of proteins unrelated to the known CFTR-interacting proteins, i.e., off-targets, will be an important finding since it will help predict the potential side effects of the compound.

**Essential methods.** We will synthesize chemical probes structurally related to ARN23765, featuring both a photo-reactive moiety and a chemical group for the ligation to a reporter molecule. After incubation of the probes with cells expressing F508del-CFTR, the photo-reactive moiety will be activated by UV light to generate highly reactive species that cross-link to bio-molecules in close proximity (likely the protein binding partners). The reporter molecule will enable detection and isolation of adducts for target(s) identification analysis by mass spectrometry. The results will be supported by bio-imaging studies investigating probe's localization within cells and possibly its co-localization with selected identified target(s).

**Results.** We synthesized ARN23765-like photo-affinity probes featuring key-reactive groups needed for photo cross-linking and reporter conjugation by bio-orthogonal ligation. Chemical probes showed a good activity in rescuing F508del-CFTR function in a cell-based assay and led to the detection of protein bands, representing possible targets, in PAL experiments in cell lysates.

**Conclusions.** The results of this project will help elucidating the molecular bases of CFTR rescuing induced by correctors. This may lead to new pharmacological targets for the personalized management of CF and could pave the way to the design of compounds with improved activity and safety.

## Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso una tecnica di marcatura indotta da foto-attivazione

**Problema e ragioni dello studio.** La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica caratterizzata dalla compromissione della sintesi o della funzione della proteina CFTR, causata da mutazioni nel gene che la codifica. All'interno del progetto "Task Force for Cystic Fibrosis (TFCF)", finanziato dalla Fondazione Ricerca FC, il nostro gruppo ha scoperto ARN23765, un correttore di F508del-CFTR, che ha mostrato un'elevata potenza nel ripristinare la funzione della proteina mutata in cellule epiteliali bronchiali primarie da pazienti F508del/F508del. Tuttavia, il meccanismo d'azione di ARN23765 non è stato ancora identificato. Infatti, i correttori di CFTR possono agire legandosi direttamente a F508del-CFTR o modulando l'attività di altre proteine coinvolte nel sistema di controllo cellulare.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo del nostro progetto è identificare possibili bersagli biologici e il meccanismo d'azione di ARN23765 attraverso un approccio biochimico di marcatura indotta da foto-attivazione, noto come PAL. Inoltre, l'eventuale scoperta di proteine bersaglio non direttamente correlate a CFTR sarà di aiuto nell'identificazione di potenziali effetti collaterali del composto.

**Metodi essenziali.** Per perseguire il nostro studio, sintetizzeremo sonde chimiche strutturalmente correlate a ARN23765, caratterizzate da una parte fotoreattiva e da un gruppo a cui legare un marcatore molecolare. La parte fotoreattiva sarà attivata dalla luce UV per generare specie altamente reattive che si legheranno alle biomolecole in stretta vicinanza, mentre il marcatore molecolare ne consentirà il successivo rilevamento. Le sonde chimiche saranno impiegate in esperimenti di foto-attivazione che, combinati con studi di proteomica, consentiranno l'identificazione di possibili proteine bersaglio in cellule che esprimono F508del-CFTR. Tali risultati saranno supportati da studi di microscopia per identificare la localizzazione della sonda all'interno delle cellule.

**Risultati.** Al momento sono state sintetizzate alcune sonde chimiche con struttura simile a ARN23765. Questi composti hanno mostrato una buona attività biologica nel recupero della funzionalità di F508del-CFTR in un saggio cellulare e hanno portato alla rilevazione di possibili proteine bersaglio, in esperimenti di PAL condotti in lisati cellulari.

**Conclusioni.** I risultati del progetto potrebbero contribuire a chiarire le basi molecolari del recupero di funzionalità di CFTR indotto dai correttori. Ciò potrebbe aprire la strada all'identificazione di nuovi bersagli molecolari per il trattamento di FC, contribuendo ad un ulteriore passo avanti nell'approccio personalizzato alla cura della FC.

## THERAPY ORIENTED IN VITRO/EX VIVO PREDICTIVE MODELS (Therotyping)

### 10. Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (therotyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches\*

Eramo A<sup>1</sup>, Lucarelli M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare,

<sup>2</sup>Università La Sapienza, Dip. di Medicina Sperimentale (FFC#12/2018, Concluded. FFC#8/2020, Extension project)

**Background, problem, hypothesis.** The F508del CFTR pathogenic variant is deeply investigated for specific modulatory therapies. In contrast, most of the rare pathogenic variants, are poorly characterized and remain orphan of specific therapies. Identification of specific mutational types responding to specific therapy ("therotyping"), might lead to personalized therapies for orphan patients. As patients with rare genotypes have scarce access to clinical trials, valuable in vitro models may be precious.

**Rationale and objectives of the project.** We proposed to ex-



Adriana Eramo, responsabile del progetto, e Marco Lucrelli dell'unità partner

*pand airway epithelial stem cells (AESC) from nasal epithelia of CF patients with different CFTR gene defects, through the highly efficient "culture reprogramming condition" (CRC) methodology, and to generate AESC-derived disease models in vitro of respiratory tissue, to test the response of different genetic variants to clinical therapeutics and predict drug efficacy (theratyping). Another aim was to test the efficacy of an upgraded CFTR gene editing approach based on Small Fragment Homologous Replacement (SFHR).*

**Essential methods.** AESC generated 3 models of respiratory tissue suitable for functional CFTR activity assays: i) differentiated 2D monolayers for biochemical evaluation of CFTR mRNA and protein; ii) 3D organoids for forskolin-induced swelling (FIS); iii) Air Liquid Interface (ALI) culture of respiratory tissue for fluid re-adsorption and current measurements. The SFHR-based correction of AESC was evaluated by an original droplet digital PCR (ddPCR) protocol.

**Results.** We banked and fully validated AESC cultures derived from patients and carriers with 24 different genotypes and optimized AESC-based CF models for evaluation of residual or drug-corrected CFTR activity. F508del homozygotes responded partially to Orkambi and Symdeco, while Trikafta induced a strong increase of CFTR activity (prominent CFTR protein correction and significant FIS of organoids). In all heterozygotes tested, carrying F508del and a different mutation with no or unknown function, CFTR activity was poorly increased by Orkambi or Symdeco, while, also in this case, Trikafta proved more promising. The rare genotypes tested so far, lacking F508del mutation, did not show promising response to Orkambi or Symdeco, while their response to Trikafta is under final investigation. For gene editing evaluation, an original protocol of ddPCR was setup. It showed able to detect 1 wild type copy among 20000 F508del mutated copies of CFTR gene. A modulation of correction efficiency by DNA hypomethylation was evidenced.

**Conclusions.** AESC-based *in vitro* models of CF, derived from patient nasal brushing, proved highly suitable for theratyping, allowing quantitative and complementary assays to achieve reliable results on CFTR variants response to modulators. Our approaches represents a powerful tool to predict response to specific therapies for patients with rare mutations constituting powerful *in vitro* surrogates of clinical trials for personalized therapy, both at pharmacologic and gene level.

**Extension Project (FFC#8/2020).** During the one-year extension project, we will extend the case series to additional CF patients: F508del homozygotes, F508del carriers, different rare genotypes with an unknown response to clinically approved modulatory therapies. We will derive, from nasal airway epithelium, CF-CRC-AESC cultures and organoids for theratyping. The therapeutic response to Orkambi, Symdeco and Trikafta will be tested. Also an amplificatory and ionocyte-inducing experimental therapy (based on DNA hypomethylation) will be tested. At the end of the extension, at least 31 rare genotypes (12 from the previous project and 19 from the extension) will be characterized for their response to the already clinically approved and experimental therapies. The possibility to easily perform theratyping in virtually each CF patient, using CF-CRC-AESC cultures and organoids, is of great translational impact, with particular relevance for patients with rare CFTR variants. Patients showing

*an in vitro response could benefit from the treatment as soon as the theratyping will be an approved approach also in Europe.*

## **Generazione di colture di cellule staminali delle vie aeree condizionalmente riprogrammate dall'epitelio nasale di pazienti con fibrosi cistica: valutazione della risposta a farmaci modulatori di CFTR e correlazione con il profilo genetico (theratyping) e ripristino della funzione del CFTR mediante approcci di modificazione genica**

**Problema e ragioni dello studio.** Solo per alcune delle numerosissime varianti patogenetiche del gene CFTR (tra le quali la F508del), della fibrosi cistica (FC) sono stati introdotti trattamenti terapeutici specifici, mentre i pazienti con mutazioni più rare rimangono tuttora orfani di terapie mirate. Questi pazienti, che non hanno accesso a studi clinici a causa della loro scarsità, potrebbero beneficiare di innovativi modelli di malattia *in vitro* adeguati per studi farmacologici o, in futuro, terapie geniche.

**Ipotesi e obiettivi.** Obiettivo di questo progetto è l'allestimento di modelli di FC, ottenibili per ogni singolo paziente grazie alla metodica del "conditional reprogramming" che consente di espandere cellule staminali epiteliali respiratorie (AESC) dal brushing nasale e di allestire diversi modelli, che riproducono il tessuto respiratorio del paziente, molto adatti per test farmacologici. Inoltre, ci proponiamo di valutare un innovativo approccio di correzione genica per "gene editing".

**Metodi essenziali.** Le AESC sono state utilizzate per ottenere: i) colture 2D di cellule respiratorie per studi biochimici di RNA e proteina CFTR; ii) organoidi 3D per studi funzionali di attività del CFTR (rigonfiamento indotto dalla forskolina, FIS) ed infine iii) colture in una particolare modalità ("ALI-culture") che riproducono il tessuto respiratorio, adatte a studi di riassorbimento di fluidi e misura di potenziali. L'approccio di terapia genica viene valutato mediante un innovativo sistema di "droplet digital PCR".

**Risultati.** Sono state ottenute, bancate e validate colture di AESC da pazienti e portatori con diverse varianti patogenetiche del CFTR, e sono stati da esse allestiti i modelli per le valutazioni funzionali, farmacologiche e di correzione genica. Gli omozigoti F508del hanno mostrato una moderata risposta a Orkambi e Symdeco, mentre Trikafta ha determinato un notevole incremento dell'attività di CFTR. Nei genotipi eterozigoti (F508del/mutazione senza funzione residua o con funzione ignota) solo Trikafta ha indotto un relativo incremento dell'attività del CFTR. I genotipi rari analizzati finora non hanno mostrato risposta soddisfacente ad Orkambi o Symdeco, e l'efficacia di Trikafta è al momento in corso di valutazione. L'innovativo saggio messo a punto per la valutazione della correzione genica è risultato in grado di misurare la presenza di una singola copia sana tra 20000 copie mutate di F508del.

**Conclusioni.** I modelli *in vitro* di FC sviluppati in questo progetto, basati sulle AESC ottenute dall'epitelio nasale dei pazienti, risultano molto adeguati per i test farmacologici su genotipi con diverse mutazioni di CFTR e consentono l'utilizzo di approcci quantitativi di valutazione della funzione residua del CFTR e della risposta a modulatori di utilizzo clinico o innovativi per ogni variante anche rara del gene (theratyping). L'approccio utilizzato costituisce un prezioso sostituto *in vitro* di studi clinici, ove questi non siano perseguibili, in direzione della terapia personalizzata, sia farmacologica che genica.

**Estensione del progetto (FFC#8/2020).** Nel corso del progetto di estensione amplieremo il precedente studio con ulteriori pazienti con FC: omozigoti F508del, portatori F508del, con diversi genotipi rari con risposta terapeutica non nota alle terapie modulatorie già in uso. La risposta terapeutica verrà valutata sia nelle cellule sia negli organoidi CF-CRC-AESC mediante saggi funzionali e correlata al genotipo del CFTR per predire la risposta terapeutica nel paziente ("theratyping"). Al termine dell'anno di estensione del progetto, sarà stata valutata la risposta terapeutica cellulare di almeno 31 genotipi rari (12 dal precedente progetto e 19 dall'estensione). La possibilità



di ottenere grandi quantità di cellule e organoidi CF-CRC-AESC dalle vie aeree superiori di pazienti con FC apre la possibilità di valutare la risposta terapeutica per ciascun paziente. Ciò è di grande impatto traslazionale, in particolare per i pazienti con mutazioni rare. I pazienti che mostreranno una risposta cellulare potranno beneficiare del relativo trattamento terapeutico non appena questa procedura sarà approvata per uso clinico anche in Europa.

## 11. Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic\*

**Sorio C**

Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona (FFC#13/2018. Concluded)



Claudio Sorio, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** Organoids from airways and GI tract are gaining importance in CF as new research tool with remarkable basic and translational potential for assessing the efficacy of new therapies and provide personalized therapies for CF subjects, being functional expression of individual genomes.

**Rationale and objectives of the project.** We aim to develop a personalized medicine platform for CF patients through the collection, expansion, storage and analysis of organoids derived from individual patients.

**Essential methods.** Sixty CF patients have been enrolled and rectal biopsies were collected to obtain human rectal organoids from intestinal crypts (colonoids). Drugs active on CFTR function were tested on 3D culture system by Forskolin Induced Swelling (FIS) assay and Isc measurement after an overnight incubation with correctors (VX-809 3  $\mu$ M or VX-661 5  $\mu$ M) and/or stabilizer (VX-445 2  $\mu$ M) and an acute simultaneous treatment with cAMP agonist and VX-770. Live cell microscopy (EVOS Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific) and Ussing chambers were utilized for FIS and Isc assays respectively.

**Results.** We developed organoids from 47 CF individuals (success rate 78%), including all the mutation classes. We performed FIS assay and Isc measurement for CFTR functional evaluation, western blot and immunofluorescence for evaluation of CFTR protein expression and subcellular localization. As a proof of principle, we evaluated drug response in a very rare genotype W57G/A234D<sup>1</sup> (full paper submitted) and tested experimental compounds in patients carrying the following genotypes: G542X/G85E; R1162X/R1162X, 2183AA>G/ c.1584+18672bpA>G, F508del/F508del.

**Conclusions.** We have successfully set the procedures for collection, development and analysis of colonoids from patients recruited at two national sites. We derived colonoids and preliminary described for the first time the response of a rare combination of CFTR genotypes to CFTR modulators and tested innovative drugs on selected genotypes. The personnel trained and the platform we developed are suited for 1) testing experimental drugs on selected genotypes from the available depository; 2) developing new organ-

oids from different tissue source; 3) providing therapy service for the CF community or companies (pending availability of dedicated instruments and manifestation of interest).

## Analisi di organoidi intestinali per la predizione della risposta a potenziatori e correttori di CFTR utilizzati in clinica

**Problema e ragioni dello studio.** Gli organoidi derivanti dalle vie respiratorie e dal tratto gastrointestinale stanno ottenendo rilevanza nell'ambito della fibrosi cistica (FC) in quanto nuovo strumento di ricerca con un notevole potenziale sia a livello base che traslazionale per valutare l'efficacia di nuove terapie e per garantire terapie personalizzate a pazienti FC, essendo espressione funzionale del genoma dei singoli pazienti.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro gruppo punta a sviluppare una piattaforma di medicina personalizzata per pazienti FC attraverso raccolta, espansione, conservazione e analisi dei loro organoidi

**Metodi essenziali.** Sono stati arruolati sessanta pazienti FC e sono state raccolte biopsie rettali per ottenere organoidi rettali umani dalle cripte intestinali (colonoidi). I farmaci che agiscono sulla funzione del CFTR sono stati valutati in un sistema di culture 3D tramite il test del rigonfiamento indotto da Forskolina (Forskolin Induced Swelling-FIS) e la misurazione Isc al termine di un'incubazione con correttori (VX-809 3  $\mu$ M or VX-661 5  $\mu$ M) e/o stabilizzatori (VX-445 2  $\mu$ M) e un trattamento simultaneo acuto con l'agonista di cAMP e VX-770. Microscopia vitale (EVOS Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific) e camere di Ussing sono state utilizzate rispettivamente per i test FIS e Isc.

**Risultati.** Abbiamo sviluppato organoidi da 47 pazienti FC, includendo tutte le classi di mutazione. Abbiamo effettuato il test FIS e le misurazioni Isc per una valutazione funzionale del CFTR, western blot e immunofluorescenza per la valutazione dell'espressione della proteina CFTR e la sua localizzazione subcellulare in pazienti selezionati. Come dimostrazione di fattibilità, abbiamo valutato la risposta ai farmaci nel raro genotipo W57G/A234D<sup>1</sup> (articolo completo sottomesso) e abbiamo valutato alcuni componenti sperimentali in pazienti portatori dei seguenti genotipi: G542X/G85E; R1162X/R1162X, 2183AA>G/ c.1584+18672bpA>G<sup>2</sup>, F508del/F508del.

**Conclusioni.** Abbiamo messo a punto con successo le procedure per la raccolta, lo sviluppo e l'analisi di colonoidi da pazienti reclutati in due siti nazionali. Abbiamo ricavato colonoidi e descritto (in via preliminare) per la prima volta la risposta di una rara combinazione di genotipi CFTR ai modulatori di CFTR. Abbiamo valutato sui genotipi selezionati delle nuove molecole sperimentali. Gli operatori e la piattaforma che abbiamo sviluppato sono potenzialmente in grado di 1) valutare molecole su genotipi selezionati dalla banca tissutale disponibile; 2) sviluppare nuovi organoidi da diversi tessuti; 3) fornire un servizio di "teratizzazione" per la comunità FC o per ditte specializzate (per questi aspetti, compatibilmente con disponibilità di strumenti dedicati e ad una manifestazione di interesse).

## 12. Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis\*

**Frulloni L<sup>1</sup>, de Jonge H<sup>2</sup>, Lucidi V<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina, Div. Gastroenterologia; <sup>2</sup>Erasmus University Medical Center; <sup>3</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Centro Fibrosi Cistica (FFC#6/2018, concluded. FFC#8/2020, Extension Project)

**Background, problem, hypothesis.** CFTR mutations are involved in CF and also in idiopathic pancreatitis (IP) disease but, the role of CFTR function in IP and its repairment is still unclear. The dif-



Luca Frulloni (a sx), responsabile del progetto, e i partner Hugo de Jonge e Vincenzina Lucidi

difficulty of diagnosing IP resides in the lack of direct measurement of  $\text{HCO}_3^-$  transport in CFTR expressing epithelia by currently in vivo and ex vivo CFTR bioassays. CFTR mutations detected in patients affected by pancreatitis are supposed to be involved in ion transport defects, in particular  $\text{HCO}_3^-$  transport that are clinically relevant and potential targets of CFTR modulators.

**Rationale and objectives of the project.** Conclude FFC#6/2018 project by: 1) Investigating Pancreatitis-associated genes by genome sequencing; 2) Evaluating CFTR function; 3) Assessing if novel CFTR modulator drugs, known to restore chloride transport in CF in a mutation-specific manner, can potentially restore the  $\text{HCO}_3^-$  transport.

**Essential Methods.** Patients will be tested for intestinal CFTR-dependent chloride and bicarbonate ions transport in undifferentiated human colonoids grown as monolayers (2D) on Transwell filters and by ICM (rectal biopsies). Sequencing of CFTR and of genes coding for pancreatitis-associated genes will be performed by NGS. CFTR function tested by standardized methods such as GCST, NPD and ICM (according to ECFs SOPs) will be correlated with clinical data.

**Results.** We measured CFTR activity in vivo and established that  $\text{Isc}$ 's measured in 2D organoids are proportional to CFTR activity, whereas in rectal biopsies or in the swelling assay ("FIS") of 3D organoids the current/swelling reaches a plateau at ~20% of the CFTR channel density in WT colonocytes. Furthermore long-term testing (20h) of CFTR folding correctors showed highly reproducible results in 2D organoids and anion secretory currents were blocked completely by CFTR inhibitors, arguing against a contribution of non-CFTR anion channels. Six additional rectal biopsies from pediatric IP patients are planned and we already developed 3 more colonoids (in addition to 15 already available for testing). New mutations were identified by NGS. CFTR-modulators approved to treat CF patients will be used to evaluate their capacity for restoring proper bicarbonate secretion.

**Conclusions.** During the first two years we reproduced colonoids and set up all the relevant procedures.

**Extension Project (FFC#8/2020).** Functional in vitro tests are now ongoing for 15 colonoids and 9 additional samples are in culture or planned, with the extension project.

## Valutazione e correzione farmacologica delle anomalie nel trasporto di bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e muco in biopsie intestinali e negli organoidi di pazienti FC

**Problema e ragioni dello studio.** Mutazioni del gene CFTR sono coinvolte nella pancreatite idiopatica (PI), con un ruolo da chiarire anche per la mancanza di una misurazione diretta, sia in vivo che ex vivo, del trasporto di  $\text{HCO}_3^-$  negli epitelii che esprimono CFTR che potrebbe essere difettoso ed un possibile bersaglio farmacologico.

**Ipotesi e obiettivi.** Concludere il progetto FFC#6/2018 mediante l'identificazione in questi pazienti della presenza di mutazioni legate alla funzione pancreatica e la valutazione della capacità dei modulatori di CFTR di ripristinare il trasporto del bicarbonato.

**Metodi essenziali.** Analisi del trasporto CFTR-dipendente,

di  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$  in colonoidi umani cresciuti in monostrato su filtri Transwell e mediante ICM (biopsie rettali). Il sequenziamento del CFTR e dei geni associati a pancreatite sarà effettuato mediante NGS. La funzione CFTR valutata con metodi standardizzati come GCST, NPD e ICM (secondo ECFs SOPs) sarà correlata ai dati clinici.

**Risultati.** Abbiamo stabilito che le correnti misurate negli organoidi cresciuti in 2D risultano essere proporzionali all'attività di CFTR, anche in organoidi non-CF (WT), mentre nelle biopsie rettali e nel saggio di rigonfiamento (FIS) degli organoidi che crescono in 3D esso raggiunge un plateau a circa il 20% della densità del canale CFTR nei campioni WT. Inoltre, abbiamo dimostrato che il trattamento a lungo termine con correttori di CFTR mostra risultati molto riproducibili negli organoidi 2D e le correnti di secrezione sono state completamente inibite da inibitori specifici del canale CFTR, suggerendo che non vi è contributo da parte di altri canali anionici. Abbiamo in programma la raccolta di ulteriori 6 biopsie rettali da pazienti pediatriche affetti da IP e abbiamo in coltura 3 nuovi colonoidi. Nuove mutazioni sono state identificate tramite NGS. La misurazione della corrente anionica in filtri 2D dei colonoidi è in corso per valutare il contributo delle varianti CFTR sul difetto di trasporto degli ioni. I modulatori CFTR approvati per il trattamento dei pazienti CF verranno utilizzati per valutare la loro capacità di correggere la secrezione di  $\text{HCO}_3^-$ .

**Conclusioni.** Nel corso dei primi 2 anni abbiamo prodotto colonoidi e messo a punto tutte le procedure necessarie.

**Estensione di Progetto (FFC#8/2020)** Le misurazioni funzionali in vitro sono attualmente in corso per 15 colonoidi e sono previste per ulteriori 9, attualmente in corso di sviluppo o programmati.

## 13. Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX770\*

Franchi A<sup>1</sup>, Pedrazzi M<sup>1</sup>, Castellani C<sup>2</sup>, Casciaro R<sup>2</sup>, Cresta F<sup>2</sup>, Patrone M<sup>3</sup>, Manfredi M<sup>4</sup>, Marengo E<sup>3</sup>, Aversa M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DIMES, University of Genova; <sup>2</sup> Hospital, IRCSS G.Gaslini, Genova; <sup>3</sup> DISIT, University of Piemonte Orientale; <sup>4</sup> DiMeT, University of Piemonte Orientale (FFC#12/2019. Concluded)



Monica Aversa, responsabile del progetto, e Emilio Marengo, dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Our previous studies suggested that CFTR activity could be assayed in leukocytes from healthy donor as well as from CF patients in order to monitor the channel activity before and during therapy. However, the only CFTR assay is not sufficiently informative about leukocyte functions related to channel activity. Shotgun proteomic analysis is a powerful technique that is able to identify and quantify thousands of proteins in a biological sample. Several researchers, by using a proteomic approach, have already demonstrated that some protein networks are significantly altered by CF and also that new altered proteins, not previously known, are related to CF.



**Rationale and objectives.** The goal of our study was to identify specific proteomic profiles, related to a restored CFTR activity in CF leukocytes following *ex vivo* VX-770-treatment, in order to identify biomarkers related to the efficacy of the therapy.

**Essential methods.** We used PBMCs and/or monocytes, isolated from patients carrying class III gating mutations and non-gating mutation with residual functioning CFTR eligible for Ivacaftor therapy, to perform both CFTR activity assay, by using HS-YFP method, and proteomic analyses through nano-LC chromatography and high-resolution mass spectrometry.

**Results.** A total of 1545 proteins were identified and quantified across all samples. Our results show that this approach was able to identify specific leukocytes proteomic profiles related to a restored CFTR activity following the VX770 cells treatment. Particularly, the bioinformatic analysis evidenced two pathways that are specifically down-regulated: leukocyte transendothelial migration and regulation of actin cytoskeleton. A defect of monocyte adhesion, which plays key role in immune responses and inflammation, was already observed in patients with CF. Moreover, the involvement of actin cytoskeleton is directly correlated to the restoration of CFTR function. In fact, the interaction of CFTR with the actin cytoskeleton has been already recognized and actin disruption has been shown to both potentiate and inhibit CFTR activity depending on the experimental conditions. Interestingly, these two pathways were not involved in the analysis of non-responder patients.

**Conclusions.** These analyses will be used to correlate biochemical, molecular and pathway changes to CFTR activity in order to identify a biomarker signature that can give us early information on the restoration of a correct cellular function and therefore on the effectiveness of a therapy. We think that the identification of biochemical markers, associated with drug response in a readily available source of primary cells, could be of relevance to CF Foundation mission, for the possibility of evaluation/prediction of the efficacy of new therapies targeting the defect of Cl<sup>-</sup> transport.

## Approccio proteomico per l'identificazione di nuovi biomarcatori leucocitari correlati al recupero di attività di CFTR dopo trattamento *ex vivo* con VX-770

**Problema e ragioni dello studio.** Da studi precedenti abbiamo dimostrato che è possibile distinguere nei leucociti umani il funzionamento normale di CFTR da quello difettoso come anche monitorare l'effetto di ivacaftor sull'attività di CFTR in leucociti di pazienti con mutazione G1349D/F508del. Tuttavia, la sola attività del canale CFTR non è sufficiente per poter valutare in modo accurato l'effetto della terapia sul paziente. A questo proposito è necessario ottenere informazioni sulle funzioni leucocitarie correlate all'attività del canale. L'analisi proteomica shotgun è una potente tecnica in grado di identificare e quantificare migliaia di proteine in un campione biologico. Diversi ricercatori, utilizzando un approccio proteomico, hanno già dimostrato che alcuni network proteici sono significativamente alterati a causa della fibrosi cistica.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare gli specifici profili proteomici correlati al recupero di CFTR funzionale in leucociti FC dopo trattamento *ex vivo* con VX-770, al fine di identificare biomarcatori correlati all'efficacia della terapia.

**Metodi essenziali.** Abbiamo utilizzato leucociti o più specificamente monociti, isolati da prelievi di sangue di pazienti con mutazioni di classe III e IV con difetto di gating e non gating con funzione residua di CFTR, tutti potenziali candidabili per la terapia con Ivacaftor, e li abbiamo trattati con VX-770. Quindi abbiamo eseguito sia il test dell'attività di CFTR, utilizzando il metodo HS-YFP, sia le analisi proteomiche tramite nano-Cromatografia LC e spettrometria di massa ad alta risoluzione.

**Risultati.** Dall'analisi proteomica abbiamo identificato un totale di 1545 proteine e siamo stati in grado di identificare specifici profili proteomici leucocitari correlati al recupero di attività di CFTR, in seguito al trattamento con VX770. In particolare, l'analisi bioinformatica ha evidenziato che varie proteine appartenenti a

due pathways intracellulari, quali la migrazione transendoteliale leucocitaria e la regolazione dell'actina citoscheletrica, che diminuiscono in modo significativo solo in quelle cellule in cui veniva recuperata l'attività del canale CFTR dopo trattamento con VX-770. Questi dati sono supportati da dati già presenti in letteratura in cui un difetto di adesione dei monociti era stato osservato in pazienti con FC. Inoltre, il coinvolgimento dell'actina citoscheletrica è direttamente correlato al ripristino della funzione CFTR.

**Conclusioni.** Queste analisi ulteriormente approfondite e validate nell'ambito dei cambiamenti biochimici e molecolari individuati in correlazione all'attività di CFTR hanno come obiettivo l'identificazione di un marcatore che possa darci informazioni tempestive sul ripristino di una corretta funzione cellulare e quindi sull'efficacia di farmaci modulatori di CFTR.

## 14. Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test\*

### Laudanna C

Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona (FFC#13/2019. Concluded)



Carlo Laudanna, responsabile del progetto di ricerca

**Background and rationale.** Lung inflammation is a major cause of decline in respiratory function in patients with cystic fibrosis (CF). The accumulation of neutrophilic granulocytes (PMNs) in the inflamed lung depends on integrin activation. Recently, we found that CFTR regulates the activation of integrins in monocytes. Integrin activation is defective in CF monocytes, leading to an unbalanced recruitment of phagocytes into the lung parenchyma, with exacerbated accumulation of PMNs. The discovery identifies CF as a new type of leukocyte adhesion defect disease (LAD-IV), indicating that a LAD background characterizes the pathogenesis of CF.

**Hypothesis.** Restoration of CFTR function by specific drugs restores LFA-1 activation in CF monocytes. Therefore, quantification of LFA-1 activation in monocytes constitutes a marker of CFTR activity and can be exploited to monitor the efficacy of CFTR correcting drugs.

**Objective.** To demonstrate that the measurement of LFA-1 activation in monocytes can be used to monitor the outcome of patient treatments with the corrective drugs TRIFAKTA and SYMKEVI.

**Patients, materials and methods.** Peripheral blood from CF patients selected for type II or III mutations before and after therapy. Monoclonal antibodies that detect low-intermediate and high affinity conformational epitopes of LFA-1. Activation of LFA-1 induced with chemotactic factors. Quantification of LFA-1 activation is measured by flow cytometry and adhesion assays.

**Results.** We analysed 31 CF patients treated with TRIFAKTA or SYMKEVI. The results show that in monocytes isolated from 23 out of 25 patients treated with TRIFAKTA and from 5 out of 6 patients treated with SYMKEVI, the therapy was able to correct the LFA-1 activation defect, measured as both affinity induction and adhesion. The affinity measure was more reproducible. Furthermore, the preliminary analysis of the change in respiratory capacity (FEV<sub>1</sub>) shows that its recovery is significantly greater ( $p = 0.04$ ) in the group that presented

LFA-1 affinity correction ( $6.5 \pm 7$ ,  $n = 7$ ) compared to the group that did not show correction ( $2.3 \pm 2$ ,  $n = 6$ ). Notably, the reduction in the concentration of chlorine in sweat in the two groups, on the other hand, is entirely comparable.

**Conclusion.** The data show the correspondence between correction of the CFTR defect and correction of LFA-1 activation defect in CF patients and that the correction of the integrin defect appears to be associated with a greater recovery of FEV<sub>1</sub>, compared to the evaluation of the concentration of chlorine in sweat. The data, therefore, support that the measurement of monocyte LFA-1 activation can be used as a test to monitor the effectiveness of CF treatments.

## Attivazione integrinica monocitaria come test di valutazione di farmaci per la Fibrosi Cistica

**Premesse.** L'infiammazione polmonare è una delle principali cause di declino della funzione respiratoria nei pazienti con fibrosi cistica (CF). L'accumulo dei granulociti neutrofili (PMN) nel polmone infiammato dipende dall'attivazione delle integrine. Recentemente, abbiamo scoperto che CFTR regola l'attivazione delle integrine nei monociti. L'attivazione integrinica è difettiva nei monociti CF; questo provoca un reclutamento squilibrato dei fagociti nel parenchima polmonare, con accumulo esacerbato di PMNs. La scoperta identifica la CF come un nuovo tipo di malattia da difetto di adesione dei leucociti (LAD-IV), indicando che un contesto LAD caratterizza la patogenesi della fibrosi cistica.

**Ipotesi.** Il recupero della funzione di CFTR mediante farmaci specifici ripristina l'attivazione dell'integrina LFA-1 nei monociti CF. Pertanto, la quantificazione dell'attivazione di LFA-1 nei monociti costituisce un marcatore dell'attività di CFTR e può essere sfruttata per monitorare l'efficacia dei farmaci che correggono la CFTR.

**Obiettivi.** Dimostrare che la misurazione dell'attivazione di LFA-1 nei monociti può essere utilizzata per monitorare l'esito dei trattamenti dei pazienti con i farmaci correttivi TRIFAKTA e SYMKEVI.

**Pazienti, materiali e metodi.** Sangue periferico da pazienti CF selezionati per mutazioni di tipo II o III, prima e dopo la terapia. Anticorpi monoclonali che rilevano epitopi conformazionali di bassa intermedia ed alta affinità di LFA-1. Attivazione di LFA-1 indotta con fattori chemiotattici. La quantificazione dell'attivazione di LFA-1 viene misurata mediante citometria a flusso e saggi di adesione.

**Risultati.** Abbiamo analizzato 31 pazienti CF trattati con TRIFAKTA oppure con SYMKEVI. I risultati mostrano che in monociti isolati da 23 pazienti su 25 trattati con TRIKAFKTA e da 5 pazienti su 6 trattati con SYMKEVI, la terapia è stata in grado di correggere il difetto di attivazione di LFA-1, misurato sia come induzione di affinità che di adesione. La misura dell'affinità è risultata più riproducibile. Inoltre, l'analisi preliminare della variazione di capacità respiratoria (FEV<sub>1</sub>) mostra che il suo recupero è significativamente maggiore ( $p = 0,04$ ) nel gruppo che ha presentato correzione di affinità di LFA-1 ( $6,5 \pm 7$ ,  $n=7$ ) rispetto al gruppo che non ha presentato correzione ( $2,3 \pm 2$ ,  $n=6$ ). Da notare che la riduzione della concentrazione di cloro nel sudore nei due gruppi è, invece, del tutto sovrapponibile.

**Conclusioni.** I dati mostrano la corrispondenza fra correzione del difetto di CFTR e correzione del difetto di attivazione di LFA-1 in pazienti CF e che la correzione del difetto integrinico appare associato ad un maggiore recupero di FEV<sub>1</sub> rispetto alla valutazione della concentrazione di cloro nel sudore. I dati, quindi, supportano che la misurazione dell'attivazione di LFA-1 nei monociti può essere utilizzato come test per monitorare l'efficacia dei trattamenti in CF.

## 15. Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNFS inhibitors\*

Sondo E<sup>1</sup>, Cresta F<sup>2</sup>, Tomati V<sup>1</sup>, Capurro V<sup>1</sup>, Pastorino C<sup>1</sup>, Pesce E<sup>1</sup>, Brusa I<sup>3</sup>, Roberti M<sup>4</sup>, Bertozzi F<sup>5</sup>, Bandiera T<sup>5</sup>, Cavalli A<sup>3</sup>, Galletta LJV<sup>6</sup>, Castellani C<sup>2</sup>, Pedemonte N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, <sup>2</sup>UOSD Centro Fibrosi Cistica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, <sup>3</sup>Computational and Chemical Biology, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, <sup>4</sup>Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, <sup>5</sup>D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, <sup>6</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli, NA. (FFC#9/2019. In progress)



Nicoletta Pedemonte, responsabile del progetto, e Andrea Cavalli dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Mutations associated to cystic fibrosis can be classified in different classes according to the mechanisms through which they cause CFTR loss of function. Research has focused on identifying modulator drugs able to restore CFTR function. Ivacaftor (Kalydeco), Lumacaftor/Ivacaftor (Orkambi), Tezacaftor/Ivacaftor (Symdeko/Symkevi), and Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (Trikafta/Kaftrio) have been FDA-approved to treat CF patients with selected CFTR mutations. However, many CF patients (approx. 30% in Italy) carry mutations not included in the ones for which CFTR-modulating drugs have been developed, defined as "orphan mutations", having unknown sensitivity to CFTR modulators.

**Rationale and objectives of the project.** Our study aims to use patients' nasal cells to assess their responsiveness to the different treatments, i.e. defining their "theratype", with the aim of providing each patient with the best therapeutic option available. A second reason for our study is the increasing number of CFTR pharmacological modulators (correctors, potentiators) that are in preclinical development or in clinical trials.

**Essential methods.** Nasal epithelial cells (including basal stem cells) are collected by a minimally invasive nasal brushing, and cultured using established methodologies. Primary cell culture-based models are used to study CFTR expression and evaluate CFTR activity and its possible changes due to therapeutic interventions in individual patients.

**Preliminary results.** We have already established primary cultures of nasal epithelial cells collected from 27 patients bearing orphan mutations, such as, for example, P5L, G85E, N1303K, I556V, T1036I, G622D, V317A, R1066C. Electrophysiological and biochemical studies are ongoing to characterize the molecular defect caused by the mutations under investigation, and their responsiveness to already approved CFTR modulators, as well as to compounds still in preclinical phases, including RNFS inhibitors. In parallel, each single mutation is also studied in heterologous expression systems to gain further knowledge on its maturation and function. The in vitro studies clearly demonstrate that selected patients could benefit from treatment with ivacaftor or ivacaftor plus correctors.

**Conclusions.** The nasal brushing-derived primary culture models are a powerful tool to understand the mechanisms of CF mutations and to define the responsiveness of orphan mutations to CFTR modulators. In addition, this study will also help to predict the most responsive patients for each treatment, facilitating future clinical trials in which patients will be selected according to their predicted theratype. In this way, promising compounds can be prioritized for a faster and theratype-specific development and approval.



## Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani: caratterizzazione della risposta ai modulatori di CFTR

**Problema e ragioni dello studio.** Le mutazioni che causano fibrosi cistica possono essere suddivise in diverse classi a seconda del meccanismo attraverso il quale determinano la perdita di funzione della proteina CFTR. La ricerca ha permesso di identificare farmaci modulatori, che possono recuperare la funzione di CFTR. Ivacaftor (Kalydeco), Lumacaftor/Ivacaftor (Orkambi), Tezacaftor/Ivacaftor (Symdeko/Symkevi) ed Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (Trikafta/Kaftrio) sono stati approvati per l'uso sui pazienti con determinate mutazioni. Tuttavia, molti pazienti FC (circa il 30% in Italia) hanno mutazioni non incluse in quelle per le quali sono stati sviluppati i modulatori di CFTR, definite "mutazioni orfane", con sensibilità sconosciuta ai modulatori CFTR.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro studio si propone di utilizzare le cellule nasali dei pazienti per valutare la loro responsività ai diversi trattamenti, ovvero definendo il loro "teratipo", con l'obiettivo di fornire a ciascun paziente la migliore opzione terapeutica disponibile. Una seconda ragione per il nostro studio è il numero crescente di modulatori farmacologici CFTR (correttori, potenziatori) che sono in sviluppo preclinico o in studi clinici.

**Metodi essenziali.** Le cellule epiteliali nasali vengono raccolte mediante uno spazzolamento nasale minimamente invasivo e coltivate utilizzando metodologie consolidate. I modelli basati su colture cellulari primarie vengono utilizzati per studiare l'espressione di CFTR e valutare l'attività di CFTR e le sue possibili modifiche dovute a interventi terapeutici nei singoli pazienti.

**Risultati preliminari.** Abbiamo già stabilito colture primarie di cellule epiteliali nasali raccolte da 27 pazienti portatori di mutazioni orfane, quali, ad esempio, P5L, G85E, N1303K, I556V, T1036L, G622D, V317A, R1066C. Sono in corso studi elettrofisiologici e biochimici per caratterizzare il difetto molecolare causato dalle mutazioni in esame e la loro responsività ai modulatori di CFTR già approvati, nonché a composti ancora in fase preclinica, inclusi gli inibitori di RNF5. Gli studi in vitro dimostrano chiaramente che pazienti selezionati potrebbero trarre beneficio dal trattamento con ivacaftor o ivacaftor combinato con correttori.

**Conclusioni.** I modelli di coltura primaria di cellule epiteliali nasali sono un potente strumento per comprendere i meccanismi delle mutazioni CF e per definire la responsività delle mutazioni orfane ai modulatori CFTR. Inoltre, questo studio aiuterà anche a prevedere i pazienti più responsivi per ciascun trattamento, facilitando futuri studi clinici in cui i pazienti saranno selezionati in base al loro teratipo. In questo modo, è possibile dare la priorità ai composti promettenti per uno sviluppo e un'approvazione più rapidi.

### 16. Investigating epithelial-stromal crosstalk in full thickness cystic fibrosis model on chip for evaluating novel therapeutic strategies\*

Netti P<sup>1</sup>, Di Bernardo P<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Italiano di Tecnologia, Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli; <sup>2</sup>Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli. (FFC#14/2019. In progress)

**Background, problem, hypothesis.** Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR). Airway epithelial cells express CFTR and its defect occurs in the epithelium. Nevertheless, we demonstrated that CF lung fibroblasts, which do not express CFTR, showed significant alterations in a 3D stromal model. Specifically, CF fibroblasts showed pro-fibrotic features and over-expressed genes involved in epithelial function and inflammatory response. We hypothesize that epithelial/stromal crosstalk has a role in determining these alterations and CF progression.



Paolo Netti, responsabile del progetto, e Diego di Bernardo, dell'unità partner

**Rationale and objectives.** The objective is to investigate epithelial/stromal crosstalk in CF. To this aim we exploit the CF full thickness model (FT), comprising of the human bronchial epithelium (HBE) on the connective airway tissue (CAT), and the microfluidic chip, useful for tissue culture, drug administration and evaluation of therapeutic efficacy.

**Essential methods.** Fluid dynamic conditions were set in accordance with literature and simulations. The HBE was used to optimize tissue culture, treatment and impedance analysis on chip. The FT was obtained by using a tissue engineering strategy and the static or dynamic air liquid interface culture into the device. The FT was developed by using primary fibroblasts from Lonza or extracted from bronchial biopsy by the Gaslini Institute, as well as epithelial cells, with the aim to increase biological replicates.

**Results.** Impedance measurements on chip allowed to monitor tissue resistance and capacitance. The FT was developed by using both commercial fibroblasts and cells extracted by the Gaslini. The HBE differentiated on the CAT as demonstrated by morphological analysis. The CF-FT on chip showed a more homogeneous matrix compared to the static. Further morphological and single cell transcriptomic analysis will be performed to evaluate the influence of the CF HBE on the CAT and viceversa, after their separation from the FT by protease digestion and by comparing results with HBE on porous inserts. Moreover, the chip will be used to mimic bacterial infection and aerosol/serosal treatment.

**Conclusions.** We argue that the understanding of epithelial/stromal crosstalk in CF may indicate novel therapeutic targets able to rescue lung tissue function in patients. Furthermore, the possibility to reproduce patient-specific full thickness model on chip may allow to evaluate the efficacy of therapeutic approaches.

### Investigare l'interazione tra epitelio e stroma in un modello di fibrosi cistica 'a tutto spessore' su chip per valutare nuove strategie terapeutiche

**Problema e ragioni dello studio.** La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni a carico della proteina canale CFTR. Le cellule epiteliali delle vie respiratorie esprimono CFTR, il cui difetto si verifica dunque nell'epitelio. Tuttavia, abbiamo dimostrato che i fibroblasti polmonari di FC, che non esprimono CFTR, mostrano alterazioni significative in un modello stromale 3D. In particolare essi mostrano caratteristiche pro-fibrotiche e over-esprimono geni coinvolti nella funzionalità epiteliale e nella risposta infiammatoria. Ipotizziamo che l'interazione epitelio/stromale abbia un ruolo nella determinazione di queste alterazioni e nella progressione della FC.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo è investigare l'interazione epitelio/stromale in FC. A questo scopo sfruttiamo il modello 'a tutto spessore' di FC (che comprende l'epitelio bronchiale umano sul connettivo delle vie respiratorie) e il chip microfluidico (utile per la coltura del tessuto, per la somministrazione e la valutazione dell'efficacia di farmaci).

**Metodi essenziali.** Le condizioni fluido-dinamiche sono state scelte in accordo con la letteratura e simulazioni. Il modello epite-



liale bronchiale è stato utilizzato per ottimizzare le condizioni di coltura, il trattamento e l'analisi di impedenza su chip. Il modello 'a tutto spessore' è stato ottenuto mediante tecniche di ingegneria dei tessuti e coltura in statico o in dinamico all'interno del dispositivo. Il modello è stato ottenuto utilizzando fibroblasti umani acquistati presso la Lonza o estratti da biopsie bronchiali dall'Istituto Gaslini, così come le cellule epiteliali, con lo scopo di aumentare i replicati biologici.

**Risultati.** Le analisi di impedenza su chip permettono di monitorare la resistenza e la capacità dei campioni. Il modello 'a tutto spessore' può essere ottenuto sia a partire da fibroblasti commerciali che da fibroblasti estratti da biopsie bronchiali. Le cellule epiteliali bronchiali sono in grado di differenziare sul connettivo delle vie respiratorie, come dimostrato da analisi morfologiche. Il modello su chip mostra una matrice più omogenea in confronto a quello in statico. Ulteriori analisi morfologiche e molecolari permetteranno di valutare l'effetto dell'epitelio sullo stroma e viceversa. A tale scopo le due componenti saranno separate dal modello 'a tutto spessore' mediante digestione enzimatica e i risultati delle analisi saranno confrontati con il modello di epitelio bronchiale. Inoltre, il chip verrà utilizzato per mimare l'infezione batterica e il trattamento via aerosol o attraverso il flusso.

**Conclusioni.** Confidiamo che lo studio dell'interazione tra epitelio e stroma in FC possa indicare nuovi bersagli terapeutici in grado di ripristinare la funzione polmonare nei pazienti, e che il modello 'a tutto spessore' su chip, paziente-specifico, possa permettere di valutare l'efficacia di approcci terapeutici.

## 17. Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators.

Melotti P<sup>1</sup>, de Jonge H<sup>2</sup>, Castaldo G<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro fibrosi cistica, AOUI Verona; <sup>2</sup>Erasmus University Medical Center; <sup>3</sup>Centro CEINGE, Napoli - Biotecnologie Avanzate (FFC#9/2020. New)



Paola Melotti, responsabile del progetto, a sinistra, Hugo de Jonge (al centro) e Giuseppe Castaldo delle due unità partner

**Background.** For rare CFTR mutations lacking approved drugs experimental laboratory models derived from CF patients' cells have already provided the possibility of treatment for CF patients such as nasal cells derived from nasal brushing and intestinal organoids derived from rectal biopsies. Both procedures of collection have limited invasiveness and discomfort, they are utilized also in children for diagnostic purposes. Single CF patients have been stratified based on intestinal organoids or nasal cells to different CFTR modulators and for three of them the treatment with ivacaftor has been identified and in one therapy with lumacaftor and ivacaftor has been also successfully monitored during therapy.

**Hypothesis and Objectives.** This study aims to utilize both models in single adult CF patients carrying rare CFTR mutations for proposing and monitoring treatment of CF patients with CFTR modulator drugs.

**Material, patients, methods.** We will enroll 65 patients in

two Italian CF Centres, most of them (about 90%) participated to the first part of the multicentre study HIT-CF ([www.hitcf.org](http://www.hitcf.org)). In our study CFTR function will be tested in intestinal organoids and nasal cells with potentiators and correctors (ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor) as well as experimental drugs including also some compounds targeting nonsense mutations. We will evaluate effects not only on chloride transport mediated by CFTR but also on bicarbonate transport. Based on the response to CFTR modulators the treatment will be proposed in specific programs (off-label/Managed Access Programs) with drugs approved for patients with different genotypes or in HIT-CF clinical trials. CFTR function will be tested in CF patients by nasal potential difference and intestinal current measurements and sweat test; clinical follow-up will be acquired in two Italian CF Centres.

**Expected results and spin-off.** Off-label/MAP treatments or clinical trials will be proposed to CF patients based on in vitro response in nasal cells and intestinal organoids to CFTR modulators. Follow-up of patients during treatment will allow the validation of predictivity of in vitro test in single patients. Sharing and combining experimental models useful for selection of patients candidates for very expensive long terms treatments will benefit not only single patients participating to this study. This study aims will support new perspectives for CF therapy and better understanding of the genetic basic defect of CF.

## Proposte terapeutiche basate sulla risposta al trattamento in laboratorio di mutazioni rare con farmaci modulatori di CFTR.

**Ragioni del progetto.** Modelli sperimentali di laboratorio hanno già fornito dati utili per motivare la possibilità di trattamento di pazienti CF con mutazioni rare del gene CFTR. Sono state utilizzate cellule nasali derivate da spazzolatura nelle narici nasali e organoidi intestinali derivati da biopsie rettali. Entrambe le procedure di raccolta hanno invasività e disagio limitati (standardizzate a fini diagnostici). Sono stati utilizzati diversi farmaci modulatori CFTR e per tre soggetti è stato proposto il trattamento con ivacaftor e per un altro è iniziato il trattamento con lumacaftor e ivacaftor (monitorato con successo durante la terapia).

**Obiettivi principali.** Questo studio ha lo scopo di utilizzare cellule nasali ed intestinali di pazienti CF portatori di mutazioni CFTR rare per proporre e monitorare il loro trattamento con farmaci modulatori di CFTR.

**Materiale, pazienti, metodi.** Per 65 pazienti (il 90% ha partecipato alla prima parte dello studio multicentrico HIT-CF, [www.hitcf.org](http://www.hitcf.org)) sarà analizzata la funzione CFTR in organoidi intestinali e cellule nasali in risposta a potenziatori e correttori (ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, elexacaftor), e a farmaci sperimentali, inclusi alcuni attivi su mutazioni "nonsense", valutando trasporto di cloro mediato dal CFTR e di bicarbonato. Sulla base dei risultati in laboratorio, il trattamento sarà proposto in programmi specifici (programmi off-label / Managed Access Program) con farmaci approvati per pazienti con genotipi diversi o in studi clinici HIT-CF (Programma europeo che parte da studi su organoidi ndr). La funzione CFTR sarà testata nei pazienti CF con differenza di potenziale nasale e misurazioni della corrente intestinale e test del sudore; il follow-up clinico sarà acquisito in due centri FC italiani.

**Risultati attesi.** Il follow-up dei pazienti durante il trattamento consentirà la verifica della capacità dei test sperimentali di prevedere l'efficacia clinica, già pubblicata in studi olandesi. La condivisione e la combinazione di modelli sperimentali utili per la selezione dei pazienti candidati per trattamenti a lungo termine molto costosi andrà a beneficio non solo dei singoli pazienti che partecipano a questo studio. Questo studio fornirà supporto a nuove prospettive per la terapia della FC, in particolare per pazienti che altrimenti non possono usufruire di farmaci modulatori di CFTR, oltre a una migliore comprensione del difetto genetico di base della FC

## 18. Therapeutic potential of a long-acting lung-specific DNase (DNase2b) for the treatment of CF\*

Grigoletto A<sup>1</sup>, Delfino D<sup>2</sup>, Mori G<sup>2</sup>, Bizzotto G<sup>1</sup>, Rivetti C<sup>2</sup>, Castellani C<sup>3</sup>, Percudani R<sup>2</sup>, Pasut G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical and Pharmacological Sciences Department, University of Padua, <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale Università di Parma, <sup>3</sup>IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Cystic Fibrosis Center, Genova (FFC#9/2018. Concluded)

**Background, problem, hypothesis.** Pulmozyme® or recombinant human deoxyribonuclease I (rhDNase), thanks to its mucolytic activity, is one of the agents used for the treatment of CF respiratory symptoms. However, rhDNase has important issues: its short residence time in the lungs and actin inhibition which require its administration once or twice a day and inhibition by actin. Our hypothesis is that such issues can be overcome by developing long-acting forms of alternative DNases with improved catalytic properties to manage the pulmonary symptoms of CF.



Gianfranco Pasut, responsabile del progetto, e Riccardo Percudani dell'unità partner

**Rationale and objectives of the project.** The so far not explored human DNase (DNase1L2) has therapeutic potential for CF also for its actin resistance. Favourable properties of DNase1L2, but also of rhDNase, can be enhanced by conjugation with polyethylene glycol (PEG), thus increasing their residence time in the lungs, decreasing their proteolytic degradation, and enhancing mucus penetration. Therefore we aim to extend the beneficial effects of PEGylation showed with rhDNase-I to the new DNase1L2 and furthermore to investigate different approaches of polymer conjugation for a better activity retention, thus promoting better mucus thinning by cleaving the DNA of dead neutrophils.

**Essential Methods.** Recombinant expression of DNase1L2 was carried out in the yeast system. DNase1L2 was obtained insoluble and active form in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and was purified by anion-exchange and size exclusion chromatography. The purified protein was assayed *in vitro* for its endonuclease activity by using supercoiled plasmid DNA as substrate in the presence and in the absence of actin. Three different PEGylated forms of rhDNase (Pulmozyme®) were prepared varying the polymer length and the reactive functional group. The activity retention was determined by Kunitz assay. DNase biological activity was analysed *in vitro* by using supercoiled plasmid DNA as substrate in the presence and in the absence of actin, and by rheologic analysis on artificial mucus.

**Results.** The characterization and the study of the three conjugates have demonstrated that PEGylation of rhDNase has a positive impact in terms of preservation of the secondary structure and enzymatic activity of the protein. The conjugates were obtained by using PEG20kDa-aldehyde linked at the protein N-terminus, PEG2kDa-aldehyde linked to lysines or PEG1056Da-NHS linked to lysines. PEG20kDa-DNase demonstrated to reduce the viscosity of artificial mucus more efficiently with respect to the other compounds and native rhDNase. Preliminary activity studies of PEG20kDa-DNase conjugate with ac-

tin showed that the conjugate still retains endonuclease activity suggesting that PEG probably reduces the inhibition of rhDNase by actin. DNase1L2 showed a slightly lower endonuclease activity compared to rhDNase, but retained full activity in the presence of actin.

**Conclusions.** In this second year i) we have produced and characterized an alternative DNase (DNase1L2) resistant to actin inhibition; ii) we have synthesized and characterized three different conjugates of rhDNase, studying the biological activity and the ability of promote mucus thinning; iii) rheologic analysis revealed that the conjugate PEG20kDa-DNase is the most promising in reducing the viscosity of artificial mucus.

## Studio del potenziale terapeutico di una DNasi polmonare ad azione prolungata per il trattamento della fibrosi cistica

**Background e ragioni dello studio.** Pulmozyme® o desossiribonucleasi ricombinante umana (rhDNase) è l'agente mucolitico più diffuso nel trattamento della FC. I limiti principali di questo farmaco sono rappresentati dal breve tempo di permanenza nei polmoni e dall'inibizione da parte di actina che obbligano il paziente ad assumere il farmaco una o due volte al giorno. È stata evidenziata la presenza di una nuova isoforma di DNase umana, DNase1L2, con potenziale terapeutico per la FC e resistente all'actina, che ad oggi non è mai stata presa in considerazione. Le proprietà di questa DNase alternativa potrebbero essere migliorate mediante coniugazione a polietilenglicole (PEG), per aumentare la permanenza del farmaco in forma attiva nei polmoni, garantire una maggiore resistenza alla degradazione proteolitica, ridurre il riconoscimento da parte di anticorpi specifici e favorire la penetrazione nel muco.

**Ipotesi e obiettivi.** Sviluppare e studiare forme di DNasi alternative a lunga durata d'azione con proprietà catalitiche più efficienti per gestire i sintomi polmonari della CF. Le endonucleasi ottenute promoveranno la fluidificazione del muco frammentando le fibre di DNA dei neutrofili morti. Superare le attuali limitazioni di rhDNase mediante coniugazione del polimero PEG, il quale prolungherà l'azione delle DNasi, ne impedirà la degradazione e ridurrà l'inibizione da parte di actina.

**Metodi essenziali.** L'espressione ricombinante di DNase1L2 è stata ottenuta in sistema eucariotico. DNase1L2 è stata prodotta in forma solubile e attiva nel lievito metilotrofico *Pichia pastoris* e purificata tramite cromatografia a scambio anionico e cromatografia ad esclusione dimensionale. La proteina purificata è stata testata *in vitro* per l'attività endonucleasica, utilizzando DNA plasmidico superavvolto come substrato, in assenza e in presenza di actina. La PEGilazione di rhDNasi I (Pulmozyme®) ha portato all'ottenimento di tre diversi coniugati, in cui i polimeri si differenziano per la diversa lunghezza della catena polimerica e per il gruppo funzionale reattivo disponibile. L'attività residua è stata determinata tramite saggio di Kunitz. L'attività DNasica è stata analizzata *in vitro* utilizzando DNA plasmidico superavvolto come substrato in assenza e in presenza di actina, e su muco artificiale tramite analisi reologiche.

**Risultati.** La caratterizzazione e lo studio dei tre coniugati di rhDNasi I hanno dimostrato che la pegilazione di rhDNasi I è risultata un approccio positivo in quanto la proteina preserva la struttura secondaria e l'attività biologica. Il primo coniugato è stato ottenuto per modifica di rhDNasi I (Pulmozyme) all'estremità N-terminale mediante una PEG-aldeide da 20 kDa; gli altri due coniugati sono stati sintetizzati tramite coniugazione di tipo random alle lisine usando in un caso un PEG-aldeide da 2 kDa e nell'altro un PEG-NHS da 24 monomeri. Nel caso di PEG20kDa-DNase, la fluidificazione del muco è più marcata. Studi preliminari di attività del coniugato PEG20kDa-DNase in presenza di actina mostrano che il polimero sembra ridurre l'inibizione di rhDNasi I da parte di actina preservandone in parte l'attività. DNase1L2 ha mostrato attività endonucleasica lievemente inferiore a quella di rhDNasi I, ma in presenza di actina ha mantenuto la completa attività.

**Conclusioni.** In questo secondo anno i) abbiamo prodotto e



caratterizzato una DNasi (DNasi1L2) alternativa resistente all'inibizione da actina; ii) abbiamo sintetizzato e caratterizzato tre diversi coniugati, approfondendone attività biologica e capacità di ridurre la viscosità del muco; iii) dagli studi di viscosità su muco artificiale è emerso che il coniugato PEG20kDa-DNase è il più promettente perché presenta la migliore capacità di fluidificazione.

## 19. Identification and validation of circulating microvesicle analysis as a new ex vivo assay to monitor cystic fibrosis disease\*

Lanuti P<sup>1,2</sup>, Patruno S<sup>2,3</sup>, Bologna G<sup>1,2</sup>, Pomilio A<sup>2,3</sup>, Simeone P<sup>1,2</sup>, Plebani R<sup>2,3</sup>, Pece R<sup>2,3</sup>, Pierdomenico L<sup>1,2</sup>, Ercolino E<sup>1,2</sup>, Ciccocioppo F<sup>1,2</sup>, Di Sabatino M<sup>4</sup>, Miscia S<sup>1,2</sup>, Marchisio M<sup>1,2</sup>, Moretti P<sup>4</sup>, Cirilli N<sup>5</sup>, Cipolli M<sup>5</sup>, Recchiuti A<sup>2,3</sup>, Romano M<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, <sup>2</sup>Center for Advanced Studies and Technologies (CAST), <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università degli Studi G. d'Annunzio di Chieti-Pescara; <sup>4</sup>Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale di Atri (TE); <sup>5</sup>Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedali Riuniti, Ancona. (FFC#29/2018. Concluded)



Mario Romano, responsabile del progetto, e Paola Lanuti, partner del progetto

**Background, problem, hypothesis.** Monitoring inflammation and lung disease is pivotal in cystic fibrosis (CF). Previous work from our group and others showed that in addition to epithelial cells, platelet, endothelial cell and leukocyte functions are affected by the molecular defect of CF and can contribute to sustain lung inflammation. Moreover, cell activation is accompanied by the release of microvesicles (MV), which serve as intercellular messengers during the host response to infection and inflammation.

**Rationale and objectives of the project.** We hypothesize that the analysis of circulating MV may provide valuable information on inflammation, infection and lung damage. Main objectives: 1. To validate the integrated analysis of circulating MV as a new biomarker of CF lung disease progression and response to therapy. 2. To develop a new diagnostic/prognostic laboratory tool for CF, readily transferable to the clinic.

**Essential methods.** Using a proprietary flow cytometric methodology, we identified and enumerated total, platelet, leukocyte, endothelial and epithelial MV (both annexin V+ and -) in peripheral blood. We recruited 37 patients with CF (12 with FEV1% ≤ 50; 13 with FEV1% 50-70 and 12 with FEV1% > 70), 11 of them on CFTR modulators. Blood was collected approximately every 3 months up to 21 months and at the beginning and the end of any exacerbation. Data were correlated with respiratory parameters and markers of inflammation.

**Results.** CF patients showed a higher number of MV, both total and specific, than age and gender-matched normal subjects. MV number, particularly total and leukocyte, increased during exacerbation and decreased at resolution, whereas annexin V+ total MV were significantly reduced in patients on modulators, when CRP levels did not change. Relevant correlations were observed between annexin V+ total and leukocyte MV (both annexin V+ and-) and res-

piratory parameters, particularly in patients with FEV1% < 50.

**Conclusions.** Although preliminary, our current results indicate that the enumeration of selected circulating MV may have clinical significance. On the other hand, a larger number of observations as well as the analysis of MV content and bioactions will be crucial to elucidate the pathobiology of circulating MV in CF.

## Identificazione e validazione della analisi delle microvesicole circolanti come un nuovo metodo ex vivo per monitorare la fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Valutare lo stato dell'infiammazione e della malattia polmonare nei pazienti con fibrosi cistica (FC) è molto importante per mettere a punto terapie efficaci. Abbiamo in precedenza dimostrato come il difetto molecolare della FC comprometta la funzione di cellule dei vasi ematici e del sangue. Queste cellule rispondono a stimoli infettivo/infiammatori rilasciando piccole vescicole, denominate microvesicole (MV) che servono come portatori di messaggi tra le cellule per organizzare le risposte dell'organismo.

**Ipotesi e obiettivi.** Ipotizziamo che l'analisi delle MV circolanti possa fornire indicazioni su infiammazione, infezione e danno polmonare. I nostri obiettivi sono: 1. Validare l'analisi delle MV circolanti come un nuovo marcatore della progressione e risposta alla terapia della malattia polmonare nella FC; 2. Mettere a punto un nuovo strumento di laboratorio a fini diagnostico/prognostici, facilmente trasferibile alla pratica clinica.

**Metodi essenziali.** Abbiamo reclutato 37 pazienti con FC (12 con FEV1% < 50; 13 con FEV1% 50-70 e 12 con FEV1% > 70), 11 dei quali in trattamento con modulatori di CFTR. A questi pazienti abbiamo prelevato campioni di sangue ogni 3 mesi per 21 mesi e all'inizio e alla fine di ogni esacerbazione infettiva. I dati sono stati correlati con parametri di funzionalità respiratoria e indici di infezione/infiammazione. Le MV del sangue sono state contate utilizzando un metodo messo a punto dal nostro gruppo.

**Risultati.** I pazienti FC hanno mostrato un numero di MV superiore a quello di soggetti normali, comparabili per età e sesso. Il numero delle MV è risultato aumentato nel corso delle esacerbazioni per diminuire alla risoluzione. Inoltre, i pazienti in terapia con modulatori hanno presentato un numero inferiore di MV circolanti rispetto ai pazienti non in terapia con questi farmaci. Infine, abbiamo osservato un numero maggiore di MV in pazienti con maggiore compromissione della funzione respiratoria.

**Conclusioni.** Sebbene preliminari, i risultati ottenuti suggeriscono che la conta delle MV circolanti possa avere rilevanza clinica. D'altro canto, uno studio su un più ampio numero di casi, così come l'analisi del contenuto e della funzione delle MV sarà cruciale per comprendere il ruolo delle MV circolanti nello sviluppo ed evoluzione della malattia polmonare della FC.

## 20. Aspergillus pulmonary disease in cystic fibrosis (CF) patients: multicentre perspective observational study based on new diagnostic tests to evaluate the prognostic value on the CF disease (FFC#26/2018)\*

Bartoloni A<sup>1</sup>, Viscoli C<sup>2</sup>, Cariani L<sup>3</sup>, Fiscarelli EV<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unità Infezione e Malattie Tropicali, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze; <sup>2</sup>Div. Malattie Infettive, Università di Genova, Ospedale San Martino, Genova; <sup>3</sup>Lab. Analisi, Microbiologia FC, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>4</sup>Lab. Microbiologia FC, Ospedale Bambino Gesù, Roma (FFC#26/2018, concluded)

**Background and rationale.** *Aspergillus* spp may be isolated from respiratory samples in cystic fibrosis (CF) patients without signs or symptoms, but the benefit of antifungal therapy is debated. The differential diagnosis is complicated by the difficulty to discern between the poten-



Alessandro Bartoloni, responsabile del progetto

tial symptoms of *Aspergillus* infection and of those CF complications.

**Objectives.** The objective of the study is to determine the clinical impact of *Aspergillus* spp infection in CF patients, with the aim of investigating the role of diagnostic tests and of defining the diagnostic and therapeutic approach to the *Aspergillus* infection.

**Essential methods.** We enrolled CF patients, referred to 3 Italian Cystic Fibrosis Center (Florence, Milan, Rome). We enrolled CF patients 18 years old with available pulmonary imaging and we collected demographic and clinical data from medical records. The enrolled patients performed a sputum sample for microbiological culture, galactomannan (GM) determination and *Aspergillus* RT-PCR, and a blood test for detection of total and specific IgE and specific IgG.

**Results.** We enrolled 164 adult CF patients. The median age is 28.7 years old (standard deviation  $\pm 9.3$ ). Chronic respiratory pathogens are *Pseudomonas aeruginosa* (89, 54.3%), methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) (72, 43.9%), *Alcaligenes xylosoxidans* (14, 8.5%), methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (12, 7.3%), *Staphylococcus aureus* small colony variant (4, 2.4%). Sputum cultures were positive for *Aspergillus* spp. for 42 patients (25%). The GM sputum was performed for 105 patients and resulted positive in 16 patients (median index 3.69, range 0.75-5.9). Specific IgG was determined for 68 patients and resulted positive for 36 patients. *Aspergillus* RT-PCR was performed for 55 patients and tested positive for 21 patients. Seventeen patients (10%) had *Aspergillus* spp. positive culture and positive GM, but negative *Aspergillus* IgG. Seventeen patients (10%) had high total IgE and specific IgE level, positive *Aspergillus* IgG and 3 of them had positive sputum culture; three patients had high total IgE and specific IgE level, but negative *Aspergillus* IgG (*Aspergillus* sensitization). Twelve patients (7.3%) had *Aspergillus* positive culture with negative GM, IgG, IgE (colonization).

**Conclusions.** Despite the limitations due to the stop of clinical and laboratory activities related to the COVID-19 pandemia, the project highlighted the problems relating to the correct classification of patients with *Aspergillus* infection using Baxter's criteria. The analysis of the impact of *Aspergillus* on lung function is still undergoing.

## Malattia polmonare da *Aspergillus* nei pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico osservazionale prospettico basato sull'utilizzo di nuovi test diagnostici per valutare il ruolo prognostico sulla malattia polmonare dei pazienti con FC

**Ragioni dello studio.** *Aspergillus* è un fungo, al quale risuliamo frequentemente esposti nella vita affetti da fibrosi cistica, in assenza di una sintomatologia associata, per cui è dibattuta l'effettiva necessità di un trattamento. I sintomi non specifici, ma spesso simili ai sintomi di una riacutizzazione polmonare, e l'assenza di test diagnostici, che garantiscano una diagnosi di certezza, rendono complicata l'individuazione di soggetti che potrebbero beneficiare di un trattamento antifungino.

**Obiettivi principali.** Utilizzare la combinazione di test diagnostici, al fine di aumentare la sensibilità, per individuare pazienti con infezione da *Aspergillus* che potrebbero giovare di un trattamento antifungino.

**Metodi essenziali.** Saranno arruolati i pazienti con fibrosi cistica di età superiore a 18 anni, afferenti a 4 Centri italiani di Riferimento per la Fibrosi Cistica (Firenze, Genova, Milano, Roma). Per ogni paziente verrà richiesto un campione di espettorato, sul quale verranno eseguiti esami microbiologici, biomolecolari (real-time-PCR per *Aspergillus*) e sierologici (galattomannano), e un esame ematico per la ricerca di anticorpi specifici per *Aspergillus*. In base al risultato di tali test, verrà stabilita la necessità di un trattamento antifungino. I pazienti arruolati saranno valutati ogni 6 mesi con test di funzionalità respiratoria, esame dell'espettorato e esami sierologici.

**Risultati.** Nello studio sono stati arruolati 164 pazienti adulti FC, di età media 28,7 anni (deviazione standard  $\pm 9,3$ ). Ottantatré pazienti presentavano un'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (54,3%), 72 da *Staphylococcus aureus* meticillino sensibile (MSSA) (43,9%), 14 da *Alcaligenes xylosoxidans* (8,5%), 12 da *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) (7,3%), 4 da *Staphylococcus aureus* small colony variant (2,4%). Il GM su espettorato è stato eseguito in 105 pazienti ed è risultato positivo in 16, con index medio di 3,69 (range 0,75-5,9). IgG specifiche sono state eseguite in 68 pazienti e sono risultate positive in 36. *Aspergillus* RT-PCR è stata eseguita in 55 pazienti ed è risultata positiva per 21 pazienti. In 17 pazienti (10%) il colturale da escreato è risultato positivo per *Aspergillus* spp ed è risultata positiva la ricerca di GM, con negatività di *Aspergillus* IgG. Diciassette pazienti (10%) presentavano alti valori di IgE totali e specifiche, positività di *Aspergillus* IgG e tre di questi presentavano un colturale su escreato positivo per *Aspergillus* spp; tre pazienti avevano elevate valori di IgE totali e specifiche, con negatività di *Aspergillus* IgG (*Aspergillus* sensitization). In 12 pazienti (7,3%), la coltura dell'escreato era positiva per *Aspergillus* spp con negatività di GM, IgG, IgE (colonization).

**Conclusioni.** Nonostante le limitazioni dovute al blocco delle attività cliniche e laboratoristiche causate dall'emergenza COVID-19, il progetto è riuscito a evidenziare la difficoltà relata alla corretta classificazione dei pazienti con sospetta patologia aspergillare attraverso l'uso dei criteri di Baxter. L'analisi del potenziale impatto di *Aspergillus* sugli indici di funzionalità polmonare è al momento in corso.

## 21. Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis\*

Palleschi A<sup>1</sup>, Aliverti A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano; <sup>2</sup>Politecnico di Milano, Dip. Elettronica, Informazione e Bioingegneria (FFC#27/2018, concluded)



Alessandro Palleschi, responsabile del progetto

**Background and rationale.** Lung transplantation (LTx) is an established therapy for patients with end-stage cystic fibrosis (CF). Post-LTx follow-up required several computed tomography (CT) controls. The radiological risk is disappointing in patients treated



with immunosuppressive drugs and with young age. Recently, a new technique based on conventional proton magnetic resonance ( $^1\text{H-MRI}$ ) acquired at different lung volumes has been introduced to investigate regional ventilation, demonstrating sensitivity to ventilation impairment. More recently, these methods were applied to a small group of LTx patients.

**Hypothesis and objectives.** We propose to explore the feasibility of multivolume  $^1\text{H-MRI}$  to detect early changes and different features of structural damage in the follow-up of LTx CF patients and to correlate  $^1\text{H-MRI}$  regional variations with classical indicators of acute lung allograft dysfunction.

**Essential methods.** We enrolled all patients who receive a bilateral LTx at the Thoracic and Lung Transplantation Unit, Ospedale Maggiore Policlinico of Milan. Inclusion criteria: CF, both sexes, all ages. Exclusion criteria: re-transplantation, single LTx. Multivolume CT scan and pulmonary function tests at 3, 6 and 12 months were performed according to the surveillance protocol. In addition, the patients were subjected to a conventional  $^1\text{H-MRI}$  of the lung. An innovative algorithm for CT and MR image processing was developed in order to describe the ventilation distribution in the follow-up of LTx patients.

**Results.** From August 2018 to September 2019, 35 patients underwent LTx. Twelve recipients had an indication other than CF and were excluded, as well as a patient underwent re-transplantation. We enrolled 22 subjects, but only 17 completed the 1-year protocol for early graft failure (1 cases) and for logistical problems (4 cases). Overall, expiratory-inspiratory difference in MR signal-intensity correlated to CT-density ( $r=0.52$ ,  $p<0.0001$ ) and to FVC %pred ( $r=0.42$ ,  $p=0.03$ ). The linear correlation between MRI and CT functional maps considering all the four classes of ventilation defects (consolidation, air trapping, low ventilation and healthy) is  $r=0.79$  ( $p<0.0001$ ). MRI percent volumes of low ventilation correlated to FEV1 %pred ( $r=-0.41$ ,  $p=0.01$ ) and to FVC %pred ( $r=-0.63$ ,  $p<0.001$ ).

**Conclusions.** Our study confirms the definition of a new radiation-free imaging technique, for surveillance in young CF-patients after LTx, able to provide innovative functional imaging biomarkers useful to early detect acute lung allograft dysfunction. This approach may indeed increase the quality of the diagnostic examination by improving the survival and the quality of life of patients with CF who receive LTx.

## La risonanza magnetica multivolume come tecnica di imaging non ionizzante nella sorveglianza dei pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmone

**Problema e ragioni dello studio.** Il trapianto di polmone è una risorsa essenziale per i pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) con coinvolgimento polmonare grave. L'uso della TAC del torace ripetuta nel tempo è un ottimo approccio nella sorveglianza ma ha il limite di usare radiazioni ionizzanti che possono aumentare il rischio di tumore in pazienti giovani e già a rischio per la terapia immunosoppressiva post-trapianto.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro obiettivo è validare l'utilizzo di una tecnologia d'imaging non ionizzante, quale è la risonanza magnetica (RMN) convenzionale, come metodica di sorveglianza non invasiva, ripetibile e oggettiva per la diagnosi pre-clinica e differenziale di complicanze nel follow-up dei giovani pazienti FC sottoposti a trapianto.

**Metodi essenziali.** Abbiamo arruolato tutti i pazienti FC afferenti al Centro Trapianti di Milano. Criteri di inclusioni erano: FC, entrambi i sessi, tutte le età. Criteri di esclusione: re-trapianto, trapianto singolo. Dopo il trapianto, i pazienti arruolati erano sottoposti al protocollo abituale di sorveglianza a 3, 6 e 12 mesi. A questi tempi, e in occasione di sospetto clinico/funzionale di insorgenza di complicanze, i pazienti eseguivano TAC, prove di funzionalità respiratoria standard, lavaggio bronco-alveolare e biopsie polmonari trans-bronchiali. Per la finalità dello studio, erano sottoposti a RMN convenzionale. I dati relativi alle caratteristiche pre-, intra- e post-trapianto erano registrate su un database dedi-

cato. Le immagini TAC e RMN sono state rielaborate presso il Politecnico di Milano mediante approccio innovativo per lo studio funzionale e quantitativo del parenchima polmonare. Tali risultati sono stati correlati con i classici dati di funzionalità respiratoria e le eventuali modificazioni correlate con l'insorgenza di complicanze, in fase preclinica o clinica.

**Risultati.** Da agosto 2018 a settembre 2019, 35 pazienti sono stati sottoposti a trapianto di polmone. Esclusi 13 pazienti, abbiamo arruolato 22 pazienti, dei quali 17 hanno completato lo studio. Complessivamente, i dati registrati con la RMN sono risultati correlati con TAC e funzionalità respiratoria. Correlazione è risultata anche confrontando le mappe di ventilazione dopo analisi delle immagini RMN e TAC.

**Conclusioni.** Il nostro studio conferma la definizione di una nuova tecnica di imaging senza uso di radiazioni ionizzanti, ma in grado di fornire le stesse informazioni dello standard di sorveglianza attuale. La possibilità di introdurre una metodica di sorveglianza non invasiva, ripetibile ed oggettiva nel delicato approccio al paziente sottoposto a trapianto di polmone rappresenta una possibilità irripetibile e di grande importanza. In particolar modo in pazienti giovani e complessi quali i soggetti affetti da FC.

## 22. Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome\*

Terlizzi V<sup>1</sup>, Padoan R<sup>2</sup>, Tosco A<sup>3</sup>, Claut LE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro FC, AOU Meyer, Firenze; <sup>2</sup>Centro supporto FC, Spedali Civili, Brescia; <sup>3</sup>Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli); <sup>4</sup>IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano (FFC#30/2018, Concluded. FFC#24/2020, Extension Project)



Vito Terlizzi, responsabile del progetto, e le ricercatrici delle tre unità partner (R. Padoan, A. Tosco, L.E. Claut)

**Background.** Further researches are needed to better define outcome and appropriate follow up (FU) of Cystic Fibrosis (CF) screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID) infants.

**Objectives.** 1. (retrospective) to collect clinical data and information on FU of CFSPID from 6 Italian CF Centers; 2. (prospective) to standardize sweat testing (ST) timelines and genetic testing during CFSPID' FU.

**Methods.** NBS positive infants born from 01.01.2011 to 31.08.2018 and diagnosed as CF or CFSPID were enrolled. CF patients (CFp) diagnosed by meconium ileus were excluded. Data were retrospectively retrieved about ST, genetics, clinical course and FU features. Prospectively, we followed CFSPID born from 1 September 2018 to 31 December 2019, performing ST every 6 months and II and III level CFTR genetic analyses.

**Results.** 1. retrospective phase: we enrolled 257 CFp and 336 CFSPID, with a CF/CFSPID ratio of 1:1.30. Blood immunoreactive trypsinogen was significantly lower in CFSPID. F508del accounted for only 20.5% of alleles. CFSPID children showed a milder clinical course, pancreatic sufficiency and a limited percentage of symptoms than CFp: pancreatitis (1.3%), hypochloremic dehydration (1.3%) or non-chronic *Pseudomonas aeruginosa* (20.2%) colonisation. A great variability among centres was found regarding CFSPID's management: frequency of ST, chest x-ray prescription (8.2%-100%), salt supplementation (10.8%-89.7%), and percentage of subjects without a definitive diagnosis (40.6-100%). Only 15.5% of CFSPID underwent ST at least every 6 months. On 31 December 2018 (mean FU for CFSPID: 40 months, range 4.2-96.2), 18 (5.3%) out of 336 CFSPID progressed to CF and 4 (1.2%) progressed to CFTR-RD. Twenty-seven (8.0%) were healthy carriers and 16 (4.8%) were healthy.

2. prospective phase: we collected data on 70 CFSPID; of these 50 (mean age 16.8 months, range 7-21) were enrolled having a FU of at least 30 days. 43 (86%) CFSPID underwent ST every 6 months. All CFSPID performed II and III level CFTR tests. On 30 June 2020 (mean FU: 257.7 days; range 35-487), 35 (70%) out of 50 CFSPID still had an inconclusive diagnosis, 6 (12%) progressed to CF, 8 (16%) were healthy carriers and 1 (2%) were healthy.

**Conclusions.** most CFSPID have no disease manifestation during FU and a limited number progress to CF. A great variability in management by centres is noted. Serial repeated ST is a non invasive parameter to reach a definitive diagnosis as soon as possible.

**Project extension (FFC # 24/2020).** The follow-up of 336 CFSPID subjects will be extended, also evaluating the psychological impact on families of this long path towards the definitive diagnosis, the details of which will be analyzed. Guidelines for communicating with families will be developed.

## Diagnosi inconclusiva di fibrosi cistica dopo screening neonatale positivo (CFSPID): studio osservazionale multicentrico per valutare prevalenza, dati clinici, gestione ed outcome in 6 centri italiani di riferimento regionale

**Ragioni dello studio.** Lo screening neonatale per la Fibrosi Cistica (FC) può identificare neonati nei quali non si riesce a confermare la diagnosi di FC per il riscontro di test del sudore (TS) non patologici. L'acronimo inglese è CFSPID, "Cystic fibrosis screen positive, inconclusivediagnosis".

Sono necessari ulteriori studi per definire la gestione, l'andamento clinico e la durata del follow-up in questi soggetti.

**Obiettivi.** 1. raccogliere retrospettivamente dati sui lattanti CFSPID e con diagnosi di FC per confrontare l'andamento clinico e valutare la modalità di gestione dei centri. 2. prospetticamente uniformare la tempistica di esecuzione del test del sudore nei soggetti CFSPID.

**Metodi essenziali.** Dopo approvazione del progetto da parte dei comitati etici locali, sono stati retrospettivamente raccolti dati clinici, laboratoristici, genetici e microbiologici di bambini nati tra il 01.01.2011 e il 31.08.2018 con screening neonatale positivo e diagnosi confermata/inconclusiva di FC (FC/CFSPID).

Dati prospettici sono stati raccolti per i CFSPID nati dal 01.09.2018 al 31.12.2019 e seguiti in follow up fino al 30.06.2020, effettuando in modo univoco il TS ogni 6 mesi e il test genetico di II e III livello.

**Risultati preliminari.** 1. fase retrospettiva: sono stati arruolati 257 bambini FC e 336 CFSPID. I soggetti CFSPID presentavano un andamento clinico molto più lieve e raramente avevano manifestazioni correlate alla malattia, quali pancreatite (1.3%) o disidratazione (1.3%). Più frequente era il riscontro intermittente di *Pseudomonas aeruginosa* (20.2%). La gestione clinica nei centri era molto variabile e soprattutto il test del sudore, esame cardine per ottenere una diagnosi conclusiva era effettuato ogni 6 mesi solo nel 15.4% dei casi. Dopo un periodo medio di follow up di 3.3 anni, solo 65/336 bambini (19.3%) ricevevano una diagnosi conclusiva: 18 (5.3%) fibrosi cistica, 4 (1.2%) patologia CFTR-correlata, 27 (8%)

erano risultati portatori sani e 16 (4.8%) soggetti sani.

2. Fase prospettica: sono stati arruolati 50 soggetti CFSPID con un follow up di almeno 30 giorni. Molti più bambini effettuavano il test del sudore ogni 6 mesi (43/50, 86%) e questo determinava al termine di un breve follow up (257.7 giorni in media) un maggior numero di diagnosi definitive (15/50, 30%) di cui: 6 soggetti FC (12%), 8 portatori sani (16%) e 1 bambino sano (2%).

**Conclusioni.** La gestione clinica dei soggetti CFSPID e la tempistica di esecuzione del test del sudore è molto variabile nei centri italiani coinvolti. I soggetti CFSPID hanno un andamento clinico meno severo rispetto ai casi di FC e presentano raramente sintomi correlati alla malattia. L'esecuzione del test del sudore ogni 6 mesi consente di raggiungere più frequentemente una diagnosi definitiva, in un tempo minore.

**Estensione del progetto (FFC#4/2020).** Verrà prolungato il follow-up di 336 soggetti CFSPID, valutando anche l'impatto psicologico sulle famiglie di questo lungo percorso verso la diagnosi definitiva, di cui si analizzeranno i dettagli. Verranno elaborate linee guida per la comunicazione con le famiglie.

## 23. Patient Engagement in Cystic Fibrosis: a cross sectional multi-stakeholder study\*

Casciaro R<sup>1</sup>, Ciprandi R<sup>1</sup>, Pescini R<sup>1</sup>, Cresta F<sup>1</sup>, Garuti S<sup>1</sup>, Graffigna G<sup>2</sup>, Barello S<sup>2</sup>, Guida E<sup>2</sup>, Castellani C<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cystic Fibrosis Center, IRCCS Giannina Gaslini Institute, Genoa, Italy, <sup>2</sup> EngageMinds Hub Consumer, Food & Health Engagement Research Center, Catholic University of the Sacred Heart, Milano (FFC#25/2019. Concluded)



Rosaria Casciaro, responsabile del progetto

**Background and rationale.** Patient engagement is based on establishing an effective partnership with patients for improving adherence to medical prescriptions and alliance with healthcare team. Scientific evidences explain caregivers' crucial role for improving therapeutic success potentialities.

**Hypothesis and objectives.** The primary objective of this study has been to investigate the level of engagement of patients with Cystic Fibrosis (CF) and of their parents. Furthermore, we intended to study clinicians' work engagement. Secondary objectives were related to investigate other psychosocial variables connected to the illness experience such as: medication adherence, quality of life, self-efficacy, anxiety and depression, health literacy and the quality of the doctor-patient relationship. Finally, we aimed to collect in depth experiences of illness management from the perspective of both patients and parents.

**Essential methods.** This is a mixed method study involving a quantitative phase (survey) and a qualitative phase (interviews). Quantitative data have been analyzed through descriptive and multivariate statistics; qualitative data have been analyzed with Interpretative Phenomenological Approach.

**Results.** One hundred and sixteen questionnaires have been collected, including 100 patients (average age: 26 y.o.), 12 parents (average age: 47 y.o.) and 4 physicians (average age: 45.5 y.o.). Quantitative results showed high level of patient engagement in



the majority of the patients' sample. Similarly, parents showed high level of caregiver engagement in the majority of the cases. Finally, the included physicians reported high level of work engagement. Both patients and parents reported moderate symptoms of anxiety and depression. As expected, the majority of the patients' sample still reported low/moderate level of adherence to treatment. However, the perceived quality of the patient-doctor relationship resulted very satisfying for the majority of the sample. These results find further confirmation in the qualitative data collected through face to face interviews that involved in total 35 participants (23 patients and 12 parents). In particular, interviews showed that the experience of living with CF is characterized by some common topics that are shared by patients and their parents such as: 1) "the double face of the identity"; 2) "the medical team as a second family"; 3) coping with the uncertainty of the future; 4) the dark and light sides of therapies.

**Conclusions.** The role of health engagement in the management of a chronic disease has been proved to be a key factor for a good clinical practice and for more effective treatment results, confirming the study hypothesis and the insights from the literature.

## Il coinvolgimento attivo nel programma di cura del paziente con fibrosi cistica: uno studio trasversale con le diverse parti interessate

**Problema e ragioni dello studio.** Il coinvolgimento attivo (Patient Engagement) del paziente è basato sulla costruzione di un'efficace collaborazione per migliorare l'aderenza alle prescrizioni mediche e l'alleanza col team sanitario. Le evidenze scientifiche illustrano il ruolo cruciale dei caregiver per migliorare la potenzialità di successo terapeutico.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo primario dello studio è stato di indagare il livello di coinvolgimento attivo dei pazienti con Fibrosi Cistica (FC) e dei loro genitori. Inoltre, si è studiato il coinvolgimento attivo del medico nei confronti del lavoro. Gli obiettivi secondari hanno riguardato altre variabili psicosociali connesse al vissuto di malattia quali: aderenza alle terapie, qualità di vita, auto-efficacia percepita, ansia e depressione, grado di "alfabetizzazione sanitaria" e qualità della relazione medico-paziente. Infine, abbiamo raccolto esperienze che raccontassero più in profondità la gestione della malattia dal punto di vista del paziente e dei genitori.

**Metodi essenziali.** Si tratta di uno studio composto da una fase quantitativa (tramite somministrazione di questionari) ed una fase qualitativa (attraverso colloqui). L'elaborazione dei dati è stata condotta tramite analisi statistica per la parte quantitativa e analisi delle aree tematiche dei colloqui per la parte qualitativa.

**Risultati.** Sono stati raccolti 116 questionari, che includono 100 pazienti (età media: 26 anni), 12 genitori (età media: 47 anni) e 4 medici (età media: 45 anni). I risultati hanno mostrato un buon livello di coinvolgimento attivo dei pazienti e dei genitori nella maggior parte del campione, allo stesso modo per quanto riguarda i medici coinvolti nello studio. Sia i pazienti che i genitori hanno riportato sintomi moderati di ansia e depressione. La maggior parte dei pazienti ha riportato una aderenza alle terapie bassa o al più moderata. Mentre la qualità della relazione medico-paziente è risultata molto soddisfacente per la maggior parte del campione. Questi risultati sono stati confermati nella fase qualitativa, condotta attraverso 35 interviste (23 pazienti e 12 genitori). In particolare i colloqui hanno mostrato che l'esperienza di vivere con FC è caratterizzata da alcuni temi comuni per pazienti e genitori quali: 1) la doppia faccia dell'identità; 2) il team medico come una seconda famiglia; 3) affrontare l'incertezza del futuro; 4) il lato buio e quello luminoso delle terapie.

**Conclusioni.** Il ruolo del coinvolgimento attivo della salute nella gestione di una patologia cronica è dimostrato essere un fattore chiave per una buona pratica clinica e per risultati di trattamento più efficaci, confermando le ipotesi e le informazioni dalla letteratura scientifica.

## 24. Early Derangements of Glucose Tolerance in Cystic Fibrosis: Effect of CFTR Modulators

Battezzati A<sup>1</sup>, Bertoli S<sup>1</sup>, De Carlo GM<sup>1</sup>, Foppiani A<sup>1</sup>, Alicandro G<sup>1</sup>, Colombo C<sup>2</sup>, Russo MC<sup>2</sup>, Dacco V<sup>2</sup>, Lucidi V<sup>3</sup>, Ciciriello F<sup>3</sup>, Debiase RV<sup>3</sup>, Montemari AL<sup>3</sup>, Alghisi F<sup>3</sup>, Lucanto MC<sup>4</sup>, Quattromano E<sup>4</sup>, Cristadoro S<sup>4</sup>, Mari A<sup>5</sup>, Bizzotto R<sup>5</sup>, Grespan E<sup>5</sup>

<sup>1</sup> International Center for the Assessment of Nutritional Status, DeFENS, Università di Milano; <sup>2</sup> Cystic Fibrosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Università di Milano; <sup>3</sup> Unità Operativa Complessa di Fibrosi Cistica, Dipartimento Pediatrie Specialistiche, Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>4</sup> Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Messina; <sup>5</sup> Institute of Neuroscience, National Research Council, Padova (FFC#24/2019. In progress)



Alberto Battezzati, responsabile del progetto, e i responsabili delle unità partner (C. Colombo, V. Lucidi, MC. Lucanto e A. Mari)

**Background and Rationale.** Diabetes (CFRD) is a frequent and serious complication in Cystic Fibrosis (CF), caused by defects in insulin secretion (Moran et al. 2009). New modulator therapies targeted at CFTR have become available raising hope to prevent or treat CFRD (Clancy et al. 2019). Current evidence does not support significant effects but several issues have complicated this assessment: the natural history of insulin secretory defects is unclear in early life according to CFTR genotypes, but therapy is offered earlier now than in initial studies and for few mutations.

**Hypothesis and Objectives.** We hypothesize that CFTR modulators can ameliorate insulin secretory defects, but, in previous studies, the endocrine pancreas damage may have been too advanced for therapy to be effective.

The objectives:

- to evaluate whether 1-yr modulators treatment ameliorates the insulin secretory, sensitivity and glucose tolerance parameters in 6-11 years old subjects compared to the course of children with the same mutations on conventional therapy;
- to begin a natural history study in the carriers of mutations still not eligible for modulators.

**Essential methods.** We will initiate a prospective multicenter study of glucose tolerance in a cohort of CF subjects 6-11 yr old using repeated OGTTs as previously developed to assess the insulin secretion parameters along with pulmonary, exocrine pancreatic and liver function and nutritional status assessment. Subjects who become eligible to CFTR modulators will be studied at therapy onset. All subjects will repeat the OGTT after 1 yr.

**Preliminary results.** During the first year of the study, all partners obtained the ethical committee approvals for their own institution. A web-based, centralized, data collection platform was implemented to gather data from clinical evaluations and laboratory results. We also identified appropriate candidates for the study. The implications of the on-going COVID-19 pandemic, particularly con-

cerning the Milan center, have severely limited the opportunities to perform OGTT up to now. Nonetheless, the historical data analysis is still ongoing. Also, we are still performing the clinical follow-up of previously studied patients meeting the inclusion criteria, and of those patients recently recruited but still waiting to perform an OGTT.

**Conclusions.** Evaluation of modulators effects on insulin secretion, sensitivity and glucose tolerance parameters and initial description of natural history in patients still not receiving modulators, to provide valuable background data for future therapies assessment. This clinical study will evaluate the effectiveness of therapies targeted to the basic CFTR defect on an important CF complication and will fill gaps in knowledge in its natural history.

## Alterazioni precoci della tolleranza al glucosio in fibrosi cistica: effetti dei modulatori di CFTR

**Problema e ragioni dello studio.** Il diabete in fibrosi cistica (CFRD) è una complicanza frequente e severa causata da un deficit progressivo di secrezione insulinica. Nuovi farmaci, mirati a modulare il difetto genetico di base, sono diventati disponibili nella pratica clinica, aprendo la possibilità di prevenire o trattare il CFRD. Inizialmente non sono emersi effetti netti, ma mancano i dati nelle prime fasi della vita e per diversi genotipi. Oggi, la terapia con modulatori è offerta per poche mutazioni in età più precoce rispetto agli studi iniziali. Per poter dare una risposta bisogna conoscere al meglio il decorso dei deficit di secrezione insulinica in età precoce.

**Ipotesi e obiettivi.** Noi ipotizziamo che i farmaci modulatori possano migliorare la secrezione insulinica, ma che nei primi studi la terapia sia stata somministrata in fase troppo avanzata per risultare efficace. Ci poniamo quindi l'obiettivo di valutare se il trattamento con i modulatori può migliorare la secrezione insulinica in pazienti più giovani, dai 6 agli 11 anni, rispetto al decorso di chi non ha ancora l'opportunità di ricevere questi farmaci, anche perché portatore di mutazioni per cui non vi è ancora indicazione.

**Metodi essenziali.** Useremo il carico orale di glucosio (OGTT) come metodo sperimentale (già indicato come screening annuale dalle linee-guida) per identificare le alterazioni di secrezione insulinica e lo ripeteremo a distanza di un anno in tutti i bambini dai 6 ai 12 anni afferenti ai centri coinvolti. I pazienti per cui è indicata la terapia ma sono ancora in attesa ed i pazienti con mutazioni per cui non vi è ancora indicazione verranno inclusi ugualmente e se ne valuterà presenza e decorso naturale dei deficit secretori.

**Risultati preliminari.** Nel corso del primo anno di progetto, sono state ottenute le approvazioni dei Comitati Etici interessati, è stata implementata una piattaforma informatica centralizzata che permette l'inserimento dei dati clinici e di laboratorio, sono stati identificati potenziali candidati per lo studio. Le problematiche connesse all'emergenza COVID, particolarmente severe in area milanese, hanno finora severamente limitato la possibilità di realizzare OGTT. Prosegue comunque l'analisi di dati storici ed il follow-up clinico dei soggetti in questa classe di età precedentemente studiati o recentemente reclutati in attesa di OGTT.

**Conclusioni.** Lo studio permetterà di comprendere se i nuovi farmaci modulatori hanno un effetto sulle alterazioni che portano al diabete in FC e di aumentare le conoscenze sulle fasi precoci della sua storia naturale. Questo permetterà la valutazione dell'efficacia dei modulatori nel prevenire i meccanismi di diabete, chiarimento del decorso naturale per una migliore valutazione dell'effetto delle terapie future.

## 25. Standardized Ventilation Inflammation Perfusion and Structure (VIPS) MRI platform for monitoring cystic fibrosis lung disease

Morana G

Ospedale Ca' Foncello, Dip. Radiologia Diagnostica e Interventistica, Treviso (FFC#26/2019. In progress)



Giovanni Morana (in alto a sx), responsabile del progetto, e collaboratori

**Razionale.** Fourier Decomposition is a novel Magnetic Resonance (FD-MR) technique that allows obtaining perfusion and ventilation images without contrast media. FD-MRI has the potential to provide new outcomes measures for the monitoring of Cystic Fibrosis Lung Disease (CFLD). Before introducing FD-MRI in CF clinical practice, we need to validate this technique against standards such as Computed Tomography (CT) and perfusion MRI techniques (CEMRI).

**Hypothesis and Objective.** Primary: to validate a new MR protocol in order to obtain more precise information about lung ventilation, perfusion, inflammation and structure compared to CT and Contrast-enhanced MRI in a single 30 minutes protocol.

Secondary: to develop an VIPS MRI platform to be used independently from the MR brand.

**Essential methods.** 80 patients with CF scheduled for their periodical CT will be asked to participate. An MRI study, performed the same day of the CT or within a week will be done. A subgroup of patients which include patients with pulmonary exacerbations (n=20) and hemoptysis (n=10) will undergo to contrast-enhanced MRI. Patients with respiratory tract exacerbation will repeat the MRI protocol after medical treatment. The primary study parameters will be used to validate a new sequence against established MRI (1,5 T) and CT (ultra low-dose) techniques to assess structural and functional pulmonary alterations. The main parameters assessed will be: amount of Low Intensity Regions (LIR) on end-expiratory MR images expressed as % over the total lung volume. Ventilation defect (VD) on ventilation map expressed as % of total lung volume, amount of Low Attenuation Regions (LAR) on end-expiratory CT images (CF patients only) expressed as % of the total lung volume. The primary study parameters will be compared with clinical and standard functional parameters (FEV1, etc) using appropriate statistic tests, and correlated against each other to define strength of association.

**Preliminary results.** Primary: the acquisition protocol for VIPS-MRI had been optimized. It consists of morphological acquisitions such as UTE, BLADE T2-w and PD-w, a DWI acquisition, FD-MR 2D and 3D acquisitions to assess ventilation and perfusion, and optimized acquisitions to demonstrate the first-pass of contrast medium. The study started on May 23<sup>rd</sup> 2020; to date, the data from 22 patients, of whom 2 with pulmonary exacerbations, had been collected. We consider to conclude the data collection on May, 2022. Secondary: a protocol for harmonization of image quality between different GE scanners had been finalized. That protocol will be extended to Siemens and Philips scanners too.

**Conclusions.** MRI is already part of the clinical routine for CF patients, and the data derived from this study have the potential to improve clinical understanding and patient management, allowing detection and quantification of structural and functional changes in the CF patients.

**Standardizzazione di un protocollo di imaging con risonanza magnetica (MRI) per lo studio di ventilazione, infiammazione, perfusione e struttura al fine di migliorare il monitoraggio della patologia polmonare FC**



**Ragioni dello studio.** La Fourier Decomposition è una nuova tecnica di risonanza magnetica (FD-MR) che consente di ottenere informazioni su perfusione e ventilazione senza mezzo di contrasto (mdc). La FD-RM ha la potenzialità di fornire nuove informazioni per il monitoraggio della malattia polmonare da fibrosi cistica (CFLD). Prima di introdurre la FD-MR nella pratica clinica, è necessario convalidare questa tecnica confrontandola con la Tomografia Computerizzata (TC) e con lo studio di perfusione RM con mdc (CEMR).

**Ipotesi e Obiettivi.** **Primario:** convalidare un nuovo protocollo RM che dia informazioni su ventilazione, perfusione, infiammazione e struttura polmonare migliori rispetto alla TC ed alla RM con mdc. **Secondario:** sviluppare una piattaforma VIPS-MR in un singolo esame di 30 minuti, standardizzando il protocollo per l'utilizzo in ogni centro, indipendentemente dall'apparecchiatura RM utilizzata.

**Metodi essenziali.** Sono previsti 80 pazienti con FC che devono eseguire il controllo TC periodico, cui verrà effettuato uno studio RM il giorno stesso o entro una settimana. Un sottogruppo di pazienti con esacerbazione polmonare (n=20) ed emottisi (n=10) eseguirà anche una RM con mezzo di contrasto. I pazienti con esacerbazione ripeteranno l'esame RM dopo il trattamento antibiotico. I risultati dello studio verranno utilizzati per validare la nuova sequenza FD-MR nei confronti dei protocolli standard RM e TC per la analisi delle alterazioni strutturali e funzionali del polmone. Saranno valutati dei parametri RM e TC che verranno confrontati con i dati clinici ed i test di funzionalità polmonare standard (FEV1 ecc) mediante analisi statistica.

**Risultati preliminari.** Primari: il protocollo di acquisizione VIPS-MR è stato ottimizzato; consiste in una acquisizione di una serie di sequenze RM in grado di fornire le informazioni ricercate. Lo studio è partito il 23 Maggio 2020, al termine della emergenza COVID che ci ha costretti ad uno stop per motivi prudenziali, e sono stati arruolati 22 Pazienti, di cui 2 con esacerbazione. A causa delle nuove restrizioni COVID prevediamo di terminare l'arruolamento nel Maggio 2022. Secondari: è stato finalizzato un protocollo per la armonizzazione della qualità di immagine tra i differenti scanner della GE, che verrà esteso alle apparecchiature Siemens e Philips.

**Conclusioni.** La RM è ormai parte della routine clinica per i pazienti FC e i dati derivati da questo studio hanno il potenziale di migliorare la comprensione e gestione clinica dei Pazienti FC, migliorando la identificazione e la quantificazione delle alterazioni morfologiche e funzionali polmonari.

## 26. Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation

Scaravilli V

Department of Anesthesia, Critical Care and Emergency, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano (FFC#27/2019. In Progress)



Vittorio Scaravilli, responsabile del progetto

**Background, problem and hypothesis.** Patients with cystic fibrosis (CF) have subclinical right ventricle (RV) dysfunction. During lung transplantation (LUTX), pulmonary artery cross-clamping,

hypoxia, and hypercapnia may lead to pulmonary hypertension, RV failure, and shock. Emergent intraoperative extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is used in these cases. ECMO is associated with a higher risk for postoperative cardiac failure, and primary graft dysfunction. Echocardiographic RV strain has been recently described as an accurate, non-invasive index of RV dysfunction, but has never been evaluated in FC patients. Levosimendan is a calcium-sensitizer drug used for cardiac failure, capable of improving RV function.

**Rationale and Objective of the project.** We hypothesize that in CF patients undergoing LUTX: 1) RV strain is predictive of RV failure and the intraoperative need for ECMO; 3) in patients with RV dysfunction, pre-operative levosimendan is effective in reducing RV strain, and limit RV failure.

**Essential methods.** This study is composed of two consecutive phases: 1) prospective observational study to evaluate RV strain before, during, and after LUTX in CF patients by echocardiography throughout all the perioperative period; 2) prospective interventional trial to evaluate the efficacy of pre-operative levosimendan in reducing RV strain in patients at higher risk for intraoperative right ventricle failure.

**Preliminary Results.** At the moment of this writing, patients' recruitment has commenced but, unfortunately, slowed by the COVID-19 pandemic. We decided to strengthen the rationale of the study with a retrospective analyzing RV function of CF adults awaiting LUTX at our Center.

We included 49 patients (25 male, 29±9 y.o.) with FEV<sub>1</sub> 31±11% predicted, Lung Allocation Score 36±5; with normal invasive mean pulmonary artery pressure (i.e., 17±5 mmHg). Compared to standards, patients had increased RV end-diastolic area and RV wall thickness, with subnormal systolic function indexes (i.e., Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion -TAPSE, tissue Doppler positive peak systolic wave velocity -S', Fraction Area Change-FAC) and pulmonary artery acceleration time (Table 1). Moreover, subnormal FAC (<49%), TAPSE (<23 mm) and S' (<14cm/sec) had high sensitivity and negative predictive value, with low specificity and positive predictive value in predicting right ventricle dysfunction (RVEF<40%), as measured by cardiac radionuclide ventriculography.

**Conclusions.** CF adults awaiting LUTX have minimal morphologic alteration of the right heart with slightly impaired RV systolic function, without overt pulmonary hypertension. Echocardiography may be useful as a screening tool in detecting patients with RVEF<40%. Development of a new accurate non-invasive repeatable index for identification of patients at high risk for intraoperative RV failure is ongoing.

## Disfunzione del ventricolo destro in pazienti con fibrosi in lista per trapianto di polmone

**Problema e ragioni dello studio.** Alcuni pazienti con Fibrosi Cistica (FC) hanno disfunzione delle camere destre del cuore. Tale alterazione è generalmente asintomatica nella vita comune dei pazienti FC, ma può complicare il decorso perioperatorio del trapianto di polmone, aumentando il rischio di utilizzo della circolazione extracorporea e quindi di rigetto. La misura dello sforzo del ventricolo destro è una nuova tecnica ecografica non invasiva che potrebbe essere usata per fare diagnosi precoce di disfunzione cardiaca destra. Un trattamento precoce con un farmaco innovativo (Levosimendan) potrebbe migliorare il percorso perioperatorio dei pazienti più a rischio.

**Ipotesi e Obiettivi.** Lo scopo del nostro studio è valutare se: 1) la misura ecografica dello strain sia capace di riconoscere precocemente i pazienti ad alto rischio di disfunzione del ventricolo destro durante trapianto e 2) se un trattamento precoce con Levosimendan possa evitare tali complicanze nei pazienti più a rischio.

**Metodi essenziali.** In una prima fase dello studio misureremo lo sforzo del ventricolo destro durante il percorso perioperatorio dei pazienti con FC sottoposti a trapianto (prima, durante e dopo il trapianto). Quindi, l'efficacia del trattamento con Levosimendan verrà valutata in un gruppo selezionato di pazienti ritenuti ad alto rischio.

**Risultati.** Allo stato attuale, il reclutamento dei pazienti è iniziato ma è stato molto rallentato dalla pandemia COVID-19. Abbiamo quindi condotto uno studio retrospettivo per rafforzare il razionale dello studio, analizzando la funzione del ventricolo destro con tecniche ecografiche avanzate. 49 pazienti senza sintomatologia e/o alterazioni cardiologiche di sorta sono stati reclutati. L'ecografia preoperatoria di questi pazienti ha evidenziato un aumento delle dimensioni ed una riduzione della contrattilità del ventricolo destro.

**Conclusioni.** I pazienti adulti con FC hanno una alterazione morfologica e funzionale del ventricolo sinistro senza apparenti sintomi clinici. Lo studio dello sforzo del ventricolo destro potrebbe permettere di individuare i pazienti ad alto rischio di disfunzione cardiologica nel periodo perioperatorio del trapianto di polmone, ed un loro trattamento con Levosimendan potrebbe permettere un loro trattamento preventivo.

## 27. Use of multivolume MRI to assess response to CFTR modulators

Aliverti A

Politecnico di Milano, Dip. di Elettronica, Informazione e Bioingegneria (FFC#21/2020. New)



Andrea Aliverti, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** New molecular therapies for CF are intended to restore CFTR function by correction of protein misfolding or potentiation of defective channel gating. In clinical studies, CFTR modulation therapies have been shown to improve lung function, pulmonary exacerbations, and symptoms of CF. In these studies, pulmonary outcomes were assessed using traditional spirometry. However, spirometry is insensitive to local changes of lung structure and function.

**Rationale and Objectives.** Our goal is to explore the feasibility of conventional MRI acquired at different lung volumes (multivolume MRI) to detect changes in lung structure and function in patients treated with Ivacaftor/Lumacaftor and to compare the sensitivity of multivolume MRI to therapy in comparison to spirometry.

**Essential methods and design.** In the present 1-year project, we plan to retrospectively study changes in MRI and spirometry in a group of patients who received Ivacaftor/Lumacaftor at the Lombardia Region CF Centre, University of Milan, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy from 2016 to 2020. Changes from baseline in lung structure and function during therapy will be assessed respectively through MRI-derived ventilation imaging (Pennati et al, Radiology 2014) and MRI scoring (Eichinger et al, Eur J Rad 2012). The changes of MRI and spirometry parameters during therapy will be investigated.

**Preliminary results.** In a previous cross-sectional study including 28 CF patients, we have demonstrated that multivolume MRI is highly correlated to standard clinical indicators of ventilation impairment, i.e. spirometry and multiple breath washout (Pennati et al., ERJ 2019). More recently, in a longitudinal retrospective study on 19 patients, we have reported that changes of multivolume MRI correlated to changes of pulmonary function, as measured by spirometry (unpublished data).

**Expected results ad clinical applications.** The success of this proposal would improve our understanding into the effect of CFTR modulators on local lung structure-function, providing more insight into structure-function relationship. This proposal will promote MRI for supporting diagnosis, monitor disease progression and quantify individual response to treatment.

## Uso della risonanza magnetica multivolumetrica per studiare gli effetti della terapia con modulatori di CFTR

**Ragioni dello studio.** Le nuove terapie molecolari per la fibrosi cistica hanno lo scopo di recuperare in parte la funzione della proteina CFTR. Negli studi clinici, le terapie con modulatori di CFTR hanno dimostrato di migliorare la funzione polmonare, le esacerbazioni polmonari e i sintomi della FC. In questi studi, l'effetto dei modulatori di CFTR è stato valutato utilizzando la spirometria tradizionale. Tuttavia, la spirometria è insensibile ad alterazioni locali del polmone.

**Obiettivi.** L'obiettivo di questo progetto è di determinare se sia possibile rilevare cambiamenti locali del polmone, sia strutturali che funzionali, con la risonanza magnetica (RM) nei pazienti trattati con modulatori di CFTR.

**Metodi essenziali e disegno dello studio.** Nel presente progetto di 1 anno, intendiamo studiare le variazioni nelle immagini RM in un gruppo di pazienti che hanno ricevuto una terapia dei modulatori CFTR presso il Centro FC della Regione Lombardia, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano dal 2016 al 2020, in confronto alle variazioni dei dati spirometrici e dell'LCI durante la terapia.

**Risultati preliminari.** In uno studio precedente condotto su 28 pazienti FC, abbiamo dimostrato che la RM è fortemente correlata con la spirometria e la Multiple Breath Washout e che fornisce uno strumento per descrivere localmente le alterazioni funzionali e strutturali del polmone. Più recentemente, in un gruppo di 19 pazienti abbiamo osservato che le variazioni misurate con la RM correlano con le variazioni della funzionalità polmonare misurate con la spirometria, su un periodo di 3 anni.

**Risultati attesi e applicazioni cliniche.** Il successo di questa proposta potrà migliorare la nostra comprensione sull'effetto locale dei modulatori di CFTR sul polmone. Questa proposta promuoverebbe l'uso della RM come supporto alla diagnosi, al monitoraggio della progressione della malattia e alla quantificazione della risposta individuale al trattamento.

## 28. Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting: a translational research

Cirilli N<sup>1</sup>, Tiano L<sup>2</sup>, Gesuita R<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ospedali Riuniti, Dip. Materno Infantile, Centro FC, Ancona; <sup>2</sup>Università Politecnica delle Marche, Dip. di Scienze della Vita e dell'Ambiente; <sup>3</sup>Università Politecnica delle Marche, Centro di Epidemiologia, Biostatistica e Informatica Medica (FFC#22/2020. New)



Natalia Cirilli, responsabile del progetto, e i due partner di progetto (L. Tiano, R. Gesuita)

**Background.** With this study we want to correlate the clinical data of CF patients with chronic lung infection to the presence of viable but not detectable forms (VBNC) in their sputum

**Hypothesis and objectives.** To search for VBNC bacteria in the sputum of FC patients with chronic lung infection and compare their presence with the clinical course; we aim also to estimate the time of reactivation of VBNC forms

**Material, patients, methods.** Sputum samples collected from all CF patients in follow-up at least in the last 2 years will be analysed using qPCR and citofluorimetric methods to detect *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, methicillin sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* VBNC forms.

**Study design.** Prospective monocentric study (Ancona CF centre) in collaboration with the Università Politecnica delle Marche lasting 2 years. The subjects will be enrolled after obtaining adequate informed consent. During each routine visit (every 2-3 months) and at pulmonary exacerbations that require intravenous antibiotic treatment sputum samples will be collected from each patient and analysed

**Expected results and spin-offs.** The results of this study will allow to better understand the respiratory microbiology of CF patients, to promote the development of new diagnostic techniques for VBNC and more targeted therapeutic strategies.

## Ruolo delle forme batteriche vitali ma non coltivabili (VBNC) nei pazienti con fibrosi cistica dal punto di vista clinico

**Ragioni del progetto.** Con questo studio si vuole correlare l'andamento clinico dei pazienti FC con infezione polmonare

cronica con la presenza di forme VBNC nello sputo

**Obiettivi principali.** Ricercare i batteri VBNC nello sputo di pazienti FC con infezione polmonare cronica. Confrontare gli esiti clinici con i risultati del test per la ricerca di forme VBNC; stimare il tempo di riattivazione delle forme VBNC

**Materiali, pazienti, metodi.** Con tecniche combinate di biologia molecolare (qPCR) e citofluorimetria si rileveranno le forme VBNC di *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus* meticillino sensibile (MSSA) e resistente (MRSA) nello sputo di tutti i pazienti FC in follow-up da almeno 2 anni. Verranno messi a confronto i dati clinici con i risultati del test per la ricerca delle forme VBNC e si cercherà di stimare il tempo di riattivazione delle forme VBNC.

**Disegno dello studio.** Studio prospettico multicentrico coordinato dal Centro Regionale per la cura della Fibrosi Cistica di Ancona in collaborazione con l'Università Politecnica delle Marche della durata di 2 anni. I soggetti saranno arruolati dopo aver ottenuto adeguato consenso informato. Ad ogni paziente saranno prelevati, nel corso delle visite di routine (ogni 2-3 mesi) ed in occasione di una riacutizzazione respiratoria trattata con antibiotici endovena campioni di sputo che saranno poi analizzati

**Risultati attesi.** Ci aspettiamo che i pazienti trattati per riacutizzazione respiratoria e che presentano forme VBNC nel loro escreato abbiano un quadro clinico più compromesso dei pazienti con test VBNC negativo

**Possibili ricadute.** I risultati di questo studio consentiranno di conoscere meglio la microbiologia respiratoria dei pazienti FC, di promuovere lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche per i VBNC e strategie terapeutiche più mirate.

## NEW PATHS TO RESCUING MUTATED CFTR

### 29. Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems\*

Venturini A<sup>2</sup>, Renda M<sup>2</sup>, Guidone D<sup>2</sup>, Scudieri P<sup>2</sup>, Spanò V<sup>1</sup>, Barreca M<sup>1</sup>, Genovese M<sup>2</sup>, Montalbano A<sup>1</sup>, Galiotta LJV<sup>2</sup>, (Venturini A<sup>2</sup>, in extension project), Barraja P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche Biologiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli Studi di Palermo, <sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli, Napoli (Projects FFC#4/2018. Concluded. FFC#3/2020, extension project)



Paola Barraja, responsabile del progetto, e Arianna Venturini, partner nel progetto di estensione

**Background and Rationale.** The folding and stability CFTR defects caused by F508del mutation can be targeted with combinations of correctors having complementary mechanisms of action. At the beginning of our study, we identified a novel compound with the ability to rescue F508del-CFTR, in cell lines and primary airway epi-

thelial cells, particularly in combination with class 1 correctors such as VX-809.

**Hypothesis and Objectives.** So far, we have synthesized and functionally evaluated nearly 200 compounds thus obtaining useful information about the structure-activity relationship (SAR) of these molecules as CFTR correctors. A compound of this class, named PP028, was selected for mechanistic studies. Our working hypothesis is that PP028 represents a new family of pharmacological agents acting at a second site on CFTR protein. Our objectives are:

- New synthesis to further optimize potency, efficacy, and drug-like properties
- Investigation of the mechanism of action of our compounds
- Evaluation of the activity on other CF mutations

**Essential methods.** All new synthesized compounds are initially tested as correctors with the HS-YFP functional assay. The most active compounds are then validated: i) in short-circuit recordings on primary airway epithelial cells (bronchial and/or nasal); ii) in biochemical and microscopy assays for CFTR maturation and trafficking.

**Preliminary results.** The work done in the course of the project FFC#4/2018 has provided further information on SAR and identified PP028 analogs with improved potency and efficacy. Initial evaluation of medicinal chemistry properties reveals a high metabolic stability but a low kinetic solubility that needs further improvement to achieve the best compromise between corrector activity on F508del-CFTR and drug-likeness. Combination of PP028 with different types of correctors reveals a synergic effect with 3151 (class 2) but not with 4172 (class 3). PP028 has also no additive/synergic effect when combined with VX-445, recently classified as a class 3 corrector in accordance with our hypothesis.

**Conclusions.** We have identified novel second-site CFTR correctors, possibly belonging to class 3, which appear promising for the development of novel combinatorial treatments for CF patients. Iterative cycles of chemical synthesis, evaluation of corrector ac-



tivity and ADME/Tox properties are needed to improve potency and drug likeness. The final goal is to develop an optimized lead compound that could be considered for preclinical and clinical development.

**Extension project (FFC#3/2020).** The project FFC#3/2020 will be focused on the synthesis of further refined structures to optimize potency/efficacy on F508del-CFTR. For the best candidates ADME properties will be evaluated to acquire information about drug-like properties. Moreover insight on the mechanism of action and on other CF mutations (N1303K, premature termination codons) will be considered.

## Verso l'identificazione di nuovi correttori basati su sistemi eterociclici azotati

**Background e Razionale.** L'uso di combinazioni di correttori della proteina F508del-CFTR con meccanismi d'azione complementari è necessario per ottenere la massima efficacia. Da una iniziale libreria di composti sintetizzati, è emerso un composto chimico come efficace correttore della proteina F508del-CFTR in linee cellulari e cellule epiteliali primarie, soprattutto in combinazione con correttori di classe 1 come il VX-809.

**Ipotesi e Obiettivi.** Finora abbiamo sintetizzato e saggiato circa 200 analoghi, ottenendo utili informazioni sulle relazioni struttura attività (SAR) di questi correttori. Il derivato PP028 è stato selezionato per ulteriori studi meccanicistici. La nostra ipotesi è che PP028 rappresenti una nuova famiglia di agenti farmacologici che agiscono su un secondo sito della CFTR. Obiettivi futuri saranno: Sintesi di nuovi derivati con potenza/efficacia ottimali e proprietà drug-like (capacità di tali composti di funzionare da farmaci in vivo); Studio del meccanismo di azione dei nostri composti; Valutazione dell'attività su altre mutazioni FC

**Metodi essenziali.** I nuovi composti sintetizzati saranno saggiati come correttori con il test funzionale HS-YFP. I derivati più potenti saranno quindi validati attraverso: i) tecniche elettrofisiologiche su linee cellulari e cellule epiteliali primarie (bronchiali e/o nasali); ii) saggi biochimici e per microscopia per valutare l'effetto sulla maturazione e trasporto della proteina mutata.

**Risultati preliminari.** Nel corso del progetto FFC#4/2018 è stato possibile identificare analoghi di PP028 dotati di maggiore potenza ed efficacia. Da un'iniziale valutazione delle proprietà ADME è emersa un'alta stabilità metabolica ma una bassa solubilità cinetica che necessita di essere migliorata per raggiungere il giusto compromesso tra attività biologica e proprietà drug-like. La combinazione di PP028 con altri correttori, ha rivelato un effetto sinergico con 3151 (classe 2) ma non con 4172 (classe 3). Inoltre, PP028 non ha effetto additivo/sinergico se usato in combinazione con VX-445, recentemente classificato come correttore di classe 3 confermando la nostra ipotesi.

**Conclusioni.** Abbiamo identificato una nuova classe di correttori, probabilmente di classe 3, che agiscono su un secondo sito della CFTR. Per migliorare le proprietà ADME e la drug-likeness saranno necessari diversi cicli di sintesi chimica seguiti dalla valutazione dell'attività biologica dei composti ottenuti. Obiettivo finale è quello di ottenere un buon candidato per un possibile sviluppo preclinico e clinico.

**Estensione del progetto (FFC#3/2020).** Nell'ambito del progetto FFC#3/2020 sarà valutata la sintesi di nuovi derivati con potenza/efficacia ottimali e proprietà drug-like (capacità di tali composti di funzionare da farmaci in vivo). Inoltre, sarà approfondito lo studio del meccanismo di azione dei nostri composti e sarà valutata l'attività su altre mutazioni FC (N1303K, mutazioni non senso).

## 30. Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF\*

Braccia C<sup>1,3</sup>, Tomati V<sup>2</sup>, Gianotti A<sup>4</sup>, Liessi N<sup>4</sup>, Pedemonte N<sup>2</sup>, Armirotti A<sup>3</sup>

<sup>1</sup>D3Pharmacemistry, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova; <sup>2</sup>U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova; <sup>3</sup>Dipartimento di Chimica, Università di Genova, Genova, Italy; <sup>4</sup>Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica – Onlus, Verona; <sup>5</sup>Analytical Chemistry Lab, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova (FFC#1/2019. Concluded)



Andrea Armirotti, responsabile del progetto

**Background and Rationale.** Omics sciences are useful tools to investigate the cell biology associated with the CF condition<sup>1</sup>, particularly following events (like pharmacological treatments) able to trigger CFTR rescue. Omics data help uncovering pathways involved in CFTR trafficking and function. In the past, the screening of siRNA libraries designed to silence molecules with a role in F508del-CFTR processing and degradation, has identified proteins that, upon inhibition, lead to CFTR rescue at the plasma membrane. Still, some of the identified molecules (primary targets) are important in the cell machinery and their inhibition might arise safety concerns. More data on new potential targets are needed to help future medicinal chemistry efforts.

**Hypothesis and objectives.** The hypothesis for this project is that the omics investigation of the human bronchial epithelium, following successful F508del-CFTR rescue maneuvers, will generate crucial data to understand the biological pathways associated to CFTR trafficking within the cell, thus uncovering new and safe target proteins whose pharmacological modulation could ameliorate the CF condition.

**Essential methods.** We performed the proteomic analysis in label-free mode, using a protocol optimized for the human bronchial epithelium. We used publicly available software tools to annotate the functions of the dysregulated proteins, to investigate protein networks and to retrieve information on available chemical modulators. We also investigated the CFBE41o- lipidome by high-resolution mass spectrometry.

**Results.** Our investigation of CFBE41o- cells, combined with extensive bioinformatics and data mining activities, allowed us to identify a set of secondary targets to further investigate. We modulated them in the same model, using commercially available compounds. Some of these chemicals indeed triggered a significant rescue of CFTR. Unfortunately, the most promising compound failed to produce the same rescue on primary cells. Further biological tests are still pending, to complete the assay of all the compounds purchased. While these experiments were ongoing, we also undertook a parallel investigation of the CFBE41o- chemical space following CFTR rescue triggered by the use of clinically available CF drugs (including Kaftrio®). Our experiments uncovered new biological mechanisms associated with these drugs.

**Conclusions.** Our project succeeded in uncovering new targets able to help CFTR rescue in in-vitro models but further efforts are needed to translate these results to primary cells obtained from CF subjects.

## Analisi proteomica su cellule F508del-CFTR per identificare nuovi bersagli farmacologici per la fibrosi cistica

**Ragioni dello studio.** Le "omiche" sono strumenti utili per stu-

diare la biologia associata alla Fibrosi Cistica, in particolare a seguito di eventi (come i trattamenti farmacologici) in grado di produrre recupero funzionale di CFTR. I dati ottenuti dalle omiche aiutano a scoprire i meccanismi di funzionamento di CFTR. In passato, lo screening delle librerie di siRNA progettate per silenziare molecole con un ruolo nell'elaborazione e nella degradazione di F508del-CFTR, ha identificato proteine che, se inibite, portano al recupero di CFTR. Tuttavia, alcune di queste proteine sono molto importanti per la vita della cellula e la loro inibizione potrebbe sollevare problemi di sicurezza. Sono necessari più dati su nuovi potenziali obiettivi su cui orientare la scoperta di nuovi farmaci.

**Ipotesi e obiettivi.** L'ipotesi per questi due progetti è che lo studio dell'epitelio bronchiale umano, a seguito di azioni di recupero di F508del-CFTR, genererà dati cruciali per comprendere i meccanismi biologici associati alla regolazione di CFTR all'interno della cellula, scoprendo così nuove e sicure proteine bersaglio la cui modulazione farmacologica potrebbe migliorare la condizione FC.

**Metodi essenziali.** Abbiamo analizzato il proteoma dell'epitelio bronchiale umano, utilizzando un protocollo ottimizzato. Abbiamo usato strumenti software disponibili pubblicamente per annotare le funzioni delle proteine alterate, per studiare i meccanismi biologici e per recuperare informazioni sui modulatori chimici disponibili. Abbiamo anche studiato il lipidoma delle CFBE41o mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.

**Risultati.** Il nostro studio sul modello cellulare CFBE41o, combinato con estese attività di bioinformatica e *data mining*, ci ha permesso di identificare una serie di target secondari da indagare ulteriormente. Abbiamo modulato queste proteine nello stesso modello, utilizzando composti commercialmente disponibili. Alcune di queste molecole hanno effettivamente prodotto un significativo recupero di CFTR. Sfortunatamente, le molecole che sono state testate finora su cellule primarie non sono riuscite a produrre lo stesso recupero funzionale di CFTR. Ulteriori test sono in corso, fino al completamento di tutto il pannello delle molecole acquistate. Mentre i test biologici venivano effettuati, abbiamo anche intrapreso un'indagine parallela dello spazio chimico delle CFBE41o dopo il recupero di CFTR innescato dall'uso di farmaci FC di uso clinico (tra cui il Kaftrio®). I nostri esperimenti di omica hanno portato alla scoperta di nuovi meccanismi biologici associati a questi farmaci.

**Conclusioni.** Il nostro progetto è riuscito a scoprire nuove proteine in grado di aiutare il recupero di CFTR in modelli in vitro, ma sono necessari ulteriori studi per traslare questi risultati a cellule primarie ottenute da soggetti FC.

### 31. Small molecules modulating splicing as novel CFTR amplifier drugs\*

Duga S<sup>1</sup>, Straniero L<sup>1</sup>, Perriera R<sup>2</sup>, Rimoldi V<sup>1</sup>, Soldà G<sup>1</sup>, Asselta R<sup>1</sup>, Lentini L<sup>2</sup>, Melfi R<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Humanitas University, Pieve Emanuele and IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano;

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia, Chimica e Scienze Farmaceutiche e Tecnologiche, Università di Palermo (FFC#5/2019. Concluded)

**Background & Rationale.** Despite being a lethal disease, cystic fibrosis (CF) has not been eradicated along human evolution and disease allele frequencies as high as 1:20 are seen in Caucasians. This evidence, together with the presence of a highly prevalent haplotype (associated with the F508del mutation) in most populations, suggested the hypothesis that reduced CFTR function was selected as it conferred increased resistance to infectious diseases. Literature and our preliminary results also indicate that CFTR splicing is particularly inefficient, suggesting that high levels of missplicing could have been evolutionarily advantageous. This might also explain the frequency of some variants known to severely impair CFTR splicing, such as the TGmTn polymorphism, which is associated with monosymptomatic CF forms.



Stefano Duga, responsabile del progetto, e Raffaella Melfi, dell'unità partner

**Hypothesis & objectives.** Our hypothesis is that a fraction of the population has an endogenous reservoir of precursor CFTR transcripts that are incorrectly spliced and might represent a source of additional CFTR protein, when the splicing defect is corrected. Our objectives are: i) define the actual amount of misspliced CFTR mRNAs that could be corrected to increase the level of functional CFTR protein; ii) confirm that kinetin/RECTAS (small molecules successfully used as splicing correctors) can increase CFTR protein expression; iii) assess target vs off-target splicing effects of kinetin/RECTAS.

**Results.** 1) We determined the actual amount of full-length CFTR mRNA by long-read RNA sequencing in different tissues. In particular, we analyzed by both Nanopore and PACBIO technologies the splicing pattern of CaCo2 cells as well as of human lung, testis, vas deferens, colon, and pancreas. 2) We confirmed by immunofluorescence and western blot analyses that treatment with kinetin/RECTAS in rat fisher cells can increase wild-type CFTR splicing and protein levels. 3) We characterized the global impact of kinetin/RECTAS on splicing in CaCo2 and bronchial epithelial CuFi-1 cells by RNAseq, confirming a low level of off-target splicing modulation.

**Conclusions.** We demonstrated the feasibility to correct the splicing defect associated with some alleles at the TGmTn polymorphism by treating cell lines and patient-derived cells with kinetin/RECTAS. We expect to prove on additional patient-derived models (eg intestinal organoids) that kinetin/RECTAS can be used as amplifier drugs to increase CFTR protein, laying the foundations to explore possible synergistic effects with modulator treatments.

### Utilizzo di piccole molecole che modulano lo splicing di CFTR come nuovi farmaci amplificatori

**Background e razionale.** Nonostante sia una malattia letale, la fibrosi cistica (FC) non è stata eradicata dall'evoluzione e rappresenta la più frequente malattia genetica nei caucasici. Questa evidenza, insieme alla presenza di una mutazione largamente prevalente (F508del) nella maggior parte delle popolazioni, ha suggerito l'ipotesi che una ridotta funzione di CFTR si sia selezionata in quanto in grado di conferire una maggiore resistenza ad alcune malattie infettive. Nostri risultati preliminari indicano che lo splicing (il processo di maturazione dell'mRNA) di CFTR è particolarmente inefficiente, suggerendo che alti livelli di splicing errato potrebbero essere evolutivamente vantaggiosi. Ciò spiegherebbe la frequenza di alcune varianti note compromettere lo splicing, come il polimorfismo TGmTn (associato a forme di FC monosintomatica).

**Ipotesi e obiettivi.** La nostra ipotesi è che una parte della popolazione abbia un "serbatoio endogeno" di pre-mRNA CFTR che vengono maturati in modo errato e che, correggendo il difetto di splicing, potrebbero rappresentare una fonte di proteina CFTR aggiuntiva. I nostri obiettivi sono: i) definire la quantità effettiva di mRNA CFTR errati che potrebbero essere corretti; ii) confermare che kinetina/RECTAS (molecole utilizzate con successo come correttori di splicing) possano aumentare la proteina CFTR; iii) valutare gli effetti sullo splicing di altri geni.

**Risultati.** 1) Abbiamo determinato la quantità effettiva di mRNA di CFTR funzionale e il suo pattern di splicing mediante

sequenziamento dell'RNA con tecnologie innovative in diversi tessuti (polmone, testicolo, dotto deferente, colon e pancreas) e nelle cellule CaCo2. 2) Abbiamo confermato che il trattamento con kinetina/RECTAS può aumentare il corretto *splicing* dell'mRNA di CFTR e i relativi livelli di proteina. 3) Abbiamo caratterizzato l'impatto globale di kinetina/RECTAS sullo *splicing* nelle cellule CaCo2 e CuFi-1, confermando che il trattamento agisce su pochi altri geni oltre a CFTR, riducendo il rischio di effetti collaterali.

**Conclusioni.** Abbiamo dimostrato la fattibilità di correggere il difetto di *splicing* associato a varianti del gene CFTR con kinetina/RECTAS. Ci aspettiamo di dimostrare su ulteriori modelli derivati da pazienti (es. organoidi intestinali) che kinetina/RECTAS possono essere utilizzati come farmaci "amplificatori" per aumentare la proteina CFTR, ponendo le basi per esplorare i possibili effetti sinergici con i trattamenti modulatori.

### 32. Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays\*

Fossa P<sup>1</sup>, Orro A<sup>2</sup>, Urbinati C<sup>3</sup>, Uggeri M<sup>2</sup>, Rondina A<sup>2</sup>, Nale V<sup>2</sup>, Milanese M<sup>2</sup>, Pedemonte N<sup>4</sup>, D'Ursi P<sup>2</sup>, Rusnati M<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Farmacia Università di Genova <sup>2</sup>ITB-CNR Segrate MI <sup>3</sup>DMMT Università di Brescia, <sup>4</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Giannina Gaslini, Genova (FFC#10/2019. Concluded)



Marco Rusnati, a sinistra, responsabile del progetto, e i partner Paola Fossa e Alessandro Orro

**Background.** Cystic Fibrosis (CF) is caused by mutations (mainly F508del) of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Current CF therapies are aimed at symptoms alleviation, calling for new F508del-CFTR-rescuing drugs.

**Objectives.** Drug Repositioning (DR) aims at finding new applications for already marketed drugs/natural compounds. We have integrated DR with computational studies, Surface Plasmon Resonance (SPR) and cellular models<sup>1</sup> to identify new CF drugs.

**Methods & results.** A new virtual model of intact human F508del-CFTR in a lipid bilayer and a new biosensor containing the actual mutated protein in a lipid film have been prepared and used to analyze some known and new molecules, validating the tools and identifying some promising CFTR-rescuing molecules. The virtual model and the biosensor have been then used for DR on the AIFA library (846 compounds) identifying 10 drugs. Of these, rutin and its bio-converted quercetin have been further analyzed, finding that they are effectively able to bind F508del-CFTR. Interestingly, quercetin has been already found to activate F508del-CFTR and to exert antioxidant/anti-inflammatory activity, making it an interesting natural compound to be used as dietary supplementation in CF patient. The identification of quercetin in our first DR arouse our interest in small natural compounds. The DR program was then performed applying a molecular cut-off, leading to the identification of nicotinamide (NAM) as able to bind F508del-CFTR in a region close to VX809. NAM has a significantly higher affinity binding than the drug. In cell-

based assay, NAM turned out to be unable to rescue F508del-CFTR but able instead to increase the efficacy of VX809. A last DR procedure has been performed with the DrugBank library (13,700 entries) retrieving 35 hits that are now under clinical consulting for further biochemical/biological characterization.

**Conclusions.** A virtual model of F508del-CFTR in a lipid bilayer and a matching biosensor have been prepared, validated and used in different DR procedures allowing us to identify 2 natural compounds and other 35 drugs to be further evaluated for their value in treatment of CF.

### Riposizionamento del farmaco, studi computazionali, risonanza plasmonica di superficie esaggi biologici con culture cellulari: un approccio multidisciplinare per l'identificazione di nuovi farmaci ad azione correttiva su CFTR

**Problema, ragioni dello studio.** La possibilità di sviluppare nuovi farmaci che correggano CFTR mutato, causa della fibrosi cistica (FC), è l'obiettivo di numerose ricerche.

**Ipotesi, obiettivi.** Il riposizionamento del farmaco è una metodologia diretta a scoprire nuove applicazioni per farmaci già utilizzati in altre malattie che riduce costi/durata dei programmi di sviluppo ed evita effetti indesiderati. In questo progetto abbiamo integrato il riposizionamento del farmaco con nuove tecnologie (biosensori, bioinformatica) e modelli cellulari per scoprire farmaci già commercializzati in grado di indurre benefici terapeutici nella FC.

**Metodi.** Abbiamo preparato modelli virtuali di CFTR mutato in ambiente lipidico ed un biosensore per una sofisticata tecnologia chiamata "risonanza plasmonica di superficie" contenente CFTR mutato in uno strato lipidico.

**Risultati.** Questi modelli sono stati utilizzati per studiare alcuni composti neosintetizzati, validando il sistema ed identificando alcune molecole con capacità di legare e correggere CFTR mutato superiori a quelle di farmaci già utilizzati. Si è quindi proceduto a tre diversi programmi di riposizionamento del farmaco con due librerie di farmaci e prodotti naturali, identificando la rutina ed il suo prodotto di conversione naturale quercetina quali molecole in grado di legare CFTR mutato. Interessante a questo riguardo il fatto che quercetina è stata già dimostrata essere in grado di attivare CFTR e di esercitare effetti antiossidanti ed antiinfiammatori, proponendosi come un interessante prodotto naturale da usare come integratore dietetico nei pazienti affetti da FC.

Abbiamo quindi rivolto la nostra attenzione ad un altro prodotto naturale identificato mediante riposizionamento del farmaco, la nicotinamide, che si è rivelata effettivamente in grado di legare CFTR mutato contemporaneamente a lumacaftor e di aumentarne l'attività di recupero dell'attività di CFTR. Un'ultima procedura di riposizionamento del farmaco ha permesso di identificare altri 35 farmaci riposizionati su CFTR mutato che verranno ora sottoposti ad ulteriori analisi biochimiche/biologiche.

**Conclusioni.** Il progetto ha permesso di sviluppare nuovi modelli di studio sperimentali e computazionali ora a disposizione della comunità scientifica. Il loro utilizzo con la tecnologia di riposizionamento del farmaco ha permesso di identificare due composti naturali e una serie di farmaci già in uso in altre terapie per il recupero della funzionalità di CFTR mutato.

### 33. Harnessing CRISPR-Cas technology to revert ΔF508 CFTR defect \*

Aiello D<sup>1</sup>, Amistadi S<sup>2</sup>, Carrozzo I<sup>1</sup>, Maule G<sup>1</sup>, Arosio D<sup>1</sup>, Cereseto A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Biofisica, CNR, Trento; <sup>2</sup>Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), Università di Trento (FFC#3/2019. In progress)





Anna Cereseto, responsabile del progetto, e Daniele Arosio dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Recent advancements in genome editing offer unprecedented technical opportunities to reverse genetic defects. Yet certain types of mutations are still difficult to reverse, these include deletions, such as the frequent  $\Delta F508$  deletion in the CFTR gene causing cystic fibrosis. With this project we aim at developing genome editing strategies, based on CRISPR technology, allowing to efficiently reverse the  $\Delta F508$  defect.

**Rationale and objectives of the project.** Secondary, mutations in the CFTR gene can be exploited to mitigate the  $\Delta F508$  defect. Structural studies revealed that these mutations promote  $\Delta F508$  CFTR trafficking to the plasma membrane thus resulting in various degree restoration of the CFTR function. Based on this large body of data we propose to circumvent the current limitation in repairing the  $\Delta F508$  mutation by introducing neutralizing mutations through efficient genome editing techniques. Moreover, we will identify novel neutralizing mutations to maximize the possible genome manipulations to efficiently neutralize the  $\Delta F508$  deletion.

**Essential methods.** We have used the recent CRISPR technology, base-editor, to introduce secondary mutations reported to neutralize the  $\Delta F508$  defect. To increase the repertoire of mutations amenable for base editing procedures we are setting up screening platform for the identification of novel neutralizing mutations through conventional PCR based random mutagenesis and directed evolution (EvolvR) using as CFTR reversion read-out a plasma membrane CFTR analysis as preliminary indicator for  $\Delta F508$  reversal.

**Results.** Selected mutations that were reported to counteract the folding defect of  $\Delta F508$  were validated by CFTR localization on the cellular membrane and then analyzed for  $\Delta F508$  by CRISPR base-editing. Current results are showing limitations in applying base-editing technology in multiple loci. We are currently searching for additional secondary mutations more suitable for introduction by base-editing.

**Conclusions.** Preliminary results showed that specific neutralizing mutations are optimal candidate to restore CFTR function altered by  $\Delta F508$  mutation. Yet the application of CRISPR base-editing to introduce combination of neutralizing mutations is not efficient thus leading to the necessity of further investigation of more amenable mutations compatible with the base-editing technology. We expect to identify novel secondary neutralizing mutations that will be compatible with an efficient genome manipulation to produce a new alternative approach to repair CFTR defects, such as  $\Delta F508$  and beyond.

## Utilizzo della tecnologia CRISPR-Cas per la correzione della mutazione $\Delta F508$

**Problema e ragioni dello studio.** Lo sviluppo di nuove tecnologie per la terapia genica ha rivitalizzato le aspettative verso la ricerca di una cura per le malattie genetiche come la fibrosi cistica. In particolare, la nucleasi CRISPR-Cas9 offre la possibilità di "editare" (cioè cambiare) il DNA genomico con elevata efficienza e precisione, senza causare modifiche indesiderate in altre parti del genoma. La forma più diffusa di fibrosi cistica è causata dalla perdita dell'aminoacido fenilalanina nella posizione 508 ( $\Delta F508$ )

della proteina CFTR. Le tecnologie esistenti non sono efficienti nel correggere questo tipo di mutazioni (delezioni di tre nucleotidi).

**Ipotesi e obiettivi.** In questo progetto ci proponiamo di ripristinare il corretto funzionamento di CFTR  $\Delta F508$ , mediante un nuovo approccio che sfrutta l'esistenza di mutazioni neutralizzanti. Infatti, è stato osservato che i difetti di maturazione e trasporto proteico causati dal  $\Delta F508$  possono essere in parte corretti da ulteriori mutazioni puntiformi nel gene CFTR, quindi dette neutralizzanti.

**Metodi essenziali.** Abbiamo utilizzato nuovi sistemi basati su CRISPR (CRISPR-base editor) per modificare in modo mirato esclusivamente un singolo nucleotide. CRISPR-base editor e mutagenesi mediata da PCR sono state utilizzate per introdurre le mutazioni neutralizzanti compatibili con le tecniche di editing genomico tramite base-editing.

**Risultati.** Abbiamo avviato ricerche finalizzate all'identificazione di nuove mutazioni neutralizzanti compatibili con la riparazione della mutazione  $\Delta F508$  tramite la tecnologia di genome editing. A questo fine durante il primo anno di progetto abbiamo messo a punto la piattaforma sperimentale basata su un circuito molecolare mediato da CRISPR-Cas9 o da mutagenesi tramite PCR per inserire nuove mutazioni casuali nella sequenza di CFTR e selezionare unicamente quelle che promuovono il corretto trasporto in membrana del canale. Un avanzato screening funzionale rivelerà infine le mutazioni migliori, in grado di ripristinare l'attività della proteina. Queste mutazioni nel corso del secondo anno di progetto saranno riprodotte in modelli cellulari di fibrosi cistica  $\Delta F508$  (cellule epiteliali delle vie aeree e organoidi intestinali derivati da pazienti) mediante l'uso di CRISPR-base editor.

**Conclusioni.** Con questo progetto ci prefiggiamo di mettere a punto una nuova strategia di correzione genica per la cura della fibrosi cistica. In particolare, ci stiamo focalizzando su una mutazione frequente in fibrosi cistica, la  $\Delta F508$ , che essendo una delezione è difficile da riparare con i metodi di *genome editing* ad oggi a disposizione. La nostra strategia prevede di aggirare i limiti del *genome editing* sfruttando mutazioni secondarie neutralizzanti per mitigare il difetto principale. Le mutazioni secondarie verranno introdotte utilizzando una nuova evoluzione della metodologia CRISPR- base editors. Il nostro lavoro rappresenta la base per uno sviluppo verso la clinica.

## 34. Antimicrobial peptides from amphibian skin for treatment of lung pathology in cystic fibrosis: advanced in vitro and in vivo functional characterization

Mangoni ML

Università La Sapienza Roma, Dip. di Scienze Biochimiche, Lab. di Peptidi Bioattivi (FFC#8/2019. In progress)



Marialuisa Mangoni, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** The most prevalent mutation in cystic fibrosis (CF) is the loss of phenylalanine 508 in the CFTR transmembrane channel ( $\Delta F508$ -CFTR) which leads to an incor-

rectly folded protein that is rapidly degraded and exhibits a defect channel gating. This induces the formation of a thick airway mucus and the establishment of chronic pulmonary infection, mainly due to the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. In the last years, we identified a short-sized antimicrobial peptide (AMP) from frog skin, Esc(1-21), that rapidly kills *P. aeruginosa* and eradicates its biofilm with a membrane-perturbing activity that prevents bacteria from developing resistance. Furthermore, a diastereomer of Esc(1-21) was found to be more efficient in restoring bronchial epithelium integrity *in vitro* and in reducing lung bacterial burden in murine models of *P. aeruginosa* lung infection, upon a single intra-tracheal (i.t.) instillation, especially when encapsulated into polymeric nanoparticles (NPs). Recently, we studied the effect of the two Esc peptides on delF508-CFTR-dependent ions current.

**Rational and objectives.** The Project aims at (i) studying the effect of the two Esc peptides on the ion currents controlled by CFTR with different gating mutations; (ii) investigating their synergistic effect in rescuing CFTR activity when combined with currently-used CFTR modulators; (iii) evaluating the clinical potential of Esc peptides-loaded polymeric NPs by determining their pulmonary safety profile and host response upon i.t. administration in mice

**Essential methods.** A multidisciplinary approach combining electrophysiological, biochemical, cell biology and computational methods, as well as healthy mice for *in vivo* studies will be used.

**Preliminary results.** We demonstrated that both Esc peptides are able to increase the CFTR-dependent transepithelial electrical conductance in immortalized cell lines expressing delF508-CFTR and to evoke a significant increase of chloride ions current in primary bronchial epithelial cells homozygous for the delF508 mutation, by likely promoting the channel opening time with a comparable effect to that of genistein. Furthermore, we found that this effect is not a general property of membrane-active AMPs, but closely related to the primary structure of Esc peptides. In addition, intratracheal instillation of polyvinyl alcohol-engineered poly(lactic-co-glycolic) acid NPs in healthy mice did not alter the number of lung inflammatory cells or the protective functions of the respiratory epithelium, as highlighted by the invariant expression of genes involved in the mucociliary clearance.

**Conclusions.** The results of our studies are expected to develop novel Esc peptides-based inhalable drugs with the ability not only to act as antibiotics and to promote airway epithelial wound repair, but also to restore the activity of a mutated CFTR.

## Peptidi antimicrobici da pelle di anfibio per il trattamento della patologia polmonare nella fibrosi cistica: caratterizzazione funzionale *in vitro* e *in vivo*.

**Problema e Ragioni dello studio.** La mutazione più diffusa nella fibrosi cistica (FC) consiste nella perdita della fenilalanina 508 dalla sequenza aminoacidica del canale transmembrana CFTR (delF508-CFTR). Questo conduce alla sintesi di una proteina canale mal ripiegata e con un difetto di apertura ("gating"). Di conseguenza si ha la formazione di uno strato di muco ispessito che riveste le vie aeree e l'instaurarsi di un'infezione polmonare cronica, soprattutto da parte del batterio *Pseudomonas aeruginosa*. Negli ultimi anni, abbiamo identificato un peptide antimicrobico (AMP) da pelle di rana, l'Esc(1-21), che uccide rapidamente *P. aeruginosa* ed il suo biofilm con un meccanismo di perturbazione di membrana che impedisce ai batteri di sviluppare resistenza. Inoltre, un diastereomero di Esc(1-21) è risultato più efficiente nel ripristinare l'integrità dell'epitelio bronchiale *in vitro* e nel ridurre la carica batterica in modelli murini di infezione polmonare da *P. aeruginosa* in seguito ad una singola instillazione intra-tracheale (it), soprattutto se incorporato in nanoparticelle (NP) polimeriche. Recentemente, abbiamo studiato l'effetto dei due peptidi Esc sulle correnti ioniche dipendenti da F508del-CFTR.

**Ipotesi e obiettivi.** Il progetto si propone di (i) studiare l'effetto dei due peptidi Esc sulle correnti ioniche di cellule bron-

chiali esprimenti CFTR con diverse mutazioni di "gating"; (ii) studiare il loro eventuale effetto sinergico nel recuperare l'attività di CFTR quando combinati con modulatori di CFTR attualmente in uso; (iii) valutare il potenziale impiego in campo clinico di NP polimeriche contenenti i peptidi Esc, andando a determinare il loro profilo di sicurezza a livello polmonare e la risposta dell'ospite in seguito a somministrazione intratracheale in topi sani.

**Metodi essenziali.** Verrà utilizzato un approccio multidisciplinare che combina metodi elettrofisiologici, biochimici, di biologia cellulare e computazionali, nonché topi sani per studi *in vivo*.

**Risultati preliminari.** Abbiamo dimostrato che entrambi i peptidi Esc sono in grado di aumentare la conduttanza transepitheliale dipendente da CFTR in linee cellulari che esprimono delF508-CFTR e di evocare un significativo aumento della corrente di ioni cloruro in cellule bronchiali primarie omozigoti per la stessa mutazione, promuovendo l'apertura del canale con un'efficacia comparabile a quella del potenziatore genisteina. Tale effetto non è una proprietà generale dei peptidi attivi su membrana, ma strettamente correlato alla struttura primaria dei peptidi Esc. Inoltre, l'instillazione intratracheale di nanoparticelle di acido poli(lattico-co-glicolico) in topi sani non altera il numero di cellule infiammatorie nel polmone né le funzioni protettive dell'epitelio respiratorio, come sottolineato dall'invariata espressione di geni coinvolti nella "clearance" mucociliare

**Conclusioni e possibili ricadute.** Si prevede che i nostri studi possano condurre allo sviluppo di nanoformulazioni inalabili contenenti i peptidi Esc con la capacità di agire non soltanto come antibiotici e di promuovere la guarigione di lesioni epiteliali delle vie aeree, ma anche di recuperare la funzione di CFTR mutata.

## 35. Peptide-nucleic acids as potential CFTR amplifier molecules for cystic fibrosis treatment

Amato F

Centro CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli, Lab. di ricerca in fibrosi cistica (FFC#1/2020. New)



Felice Amato, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** Cystic fibrosis is caused by the malfunction of the CFTR protein, we know that depending on the types of mutations we can have problems in the shape and/or functioning of the protein, with a variable residual activity. The drugs available today, such as correctors and potentiators, act on the CFTR protein helping it to take the right shape or to function better and more. Unfortunately, these drugs can only be applied to patients with particular mutations, and this is why we must continue to research new drugs, which alone or in combination with existing ones, can cure/treat all CF patients regardless of the type of mutation.

**Rationale and objectives of the project.** Thus, in addition to improve the shape and function of the protein, by correctors and potentiators, we could also modulate the quantity of the protein



itself. In fact, it is reasonable to think of compensating for the decreased activity of the protein with an increase in its quantity. For this purpose, compounds are being studied, called amplifiers, which by acting on the DNA or RNA, are able to make our cells produce more protein. Therefore, the goal of this project is to try to increase the amount of CFTR protein, mainly using peptide nucleic acids (PNA), or analogues, which can act on those parts of the gene, such as the promoter or RNA sequences, responsible of protein production. Furthermore, one of the objectives of the project is to test systems to delivery these molecules inside cells, using a particular cell model based on nasal cells collected from healthy subjects and patients.

**Essential methods.** Design and synthesis of PNA and/or PNA analogues and their loading in biodegradable nanoparticles for delivery into cellular models.

**Expected results and possible applications.** Identification and synthesis of PNA molecules as CFTR amplifiers, to evaluate their action in nasal cells collected from patients with mutations with minimal residual activity. In previous studies we have identified some of these molecules and evaluated the use of biodegradable nanoparticles for their delivery within cells. The active PNA molecules as amplifiers will be considered valid candidates for new therapies for cystic fibrosis, also in combination with the other modulators already approved, for a synergistic effect and also applicable to mutations currently not eligible for treatment.

## Acidi nucleici peptidici come potenziali amplificatori di CFTR per il trattamento della fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** La fibrosi cistica è causata dal malfunzionamento della proteina CFTR, sappiamo che a seconda dei tipi di mutazioni possiamo avere problemi nella forma e/o nel funzionamento della proteina, con una attività residua variabile. I farmaci, oggi disponibili, come i correttori e potenziatori, agiscono sulla proteina CFTR aiutandola a prendere la giusta forma o a funzionare meglio e di più. Sfortunatamente però, questi farmaci si possono applicare solo a pazienti con particolari mutazioni. Ed è per questo, che bisogna continuare a ricercare nuovi farmaci, che da soli o in combinazione con quelli già esistenti, possano curare/trattare tutti i pazienti CF a prescindere dal tipo di mutazione.

**Ipotesi ed obiettivi.** Oltre a migliorarne la forma e la funzione, con correttori e potenziatori, si potrebbe intervenire anche sulla quantità della proteina stessa. Infatti, è lecito pensare di compensare la diminuita attività della proteina con un aumento della sua quantità. A questo scopo, sono allo studio dei composti, gli amplificatori, che agendo sul DNA o RNA, riescono a far produrre dalle nostre cellule più proteina. Quindi, l'obiettivo di questo progetto è cercare di aumentare la quantità di proteina CFTR, utilizzando, principalmente, acidi nucleici peptidici (PNA), o analoghi, che possano agire su quelle parti del gene, come il promotore o l'RNA, responsabili della produzione della proteina. Inoltre, tra gli obiettivi del progetto c'è quello di testare sistemi per veicolare queste molecole all'interno delle cellule, utilizzando un particolare modello cellulare basato su cellule nasali prelevate da soggetti sani e pazienti.

**Metodi essenziali.** Progettazione e sintesi di PNA e/o analoghi di PNA e loro caricamento in nanoparticelle biodegradabili per la veicolazione in modelli cellulari.

**Risultati attesi e possibili ricadute.** Identificazione e sintesi di molecole di PNA come amplificatori di CFTR, valutare la loro azione in cellule nasali prelevate da pazienti con mutazioni con attività residua minima. In precedenti studi abbiamo individuato alcune di queste molecole e valutato l'uso di nanoparticelle biodegradabili per il loro trasporto all'interno delle cellule. Le molecole di PNA attive come amplificatori saranno considerate candidate valide per nuove terapie per la fibrosi cistica, anche in combinazione agli altri modulatori già approvati, per un effetto sinergico ed applicabile anche a mutazioni oggi non elegibili al trattamento.

## 36. Lipid-based therapeutic strategies to optimize the effectiveness of innovative drugs to rescue F508del-CFTR

Tamanini A<sup>2</sup>, Loberto N<sup>1</sup>, Carsana EV<sup>1</sup>, Bassi R<sup>1</sup>, Mauri L<sup>1</sup>, Dececchi MC<sup>4</sup>, Santangelo A<sup>2</sup>, Oliosio D<sup>4</sup>, Pedemonte N<sup>3</sup>, Cabrini G<sup>4</sup>, Aureli A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Sezione di Patologia Molecolare, UOC Laboratorio Analisi (Sede di Borgo Trento), Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona; <sup>3</sup>U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova; <sup>4</sup>Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Università di Verona (FFC#2/2020. New)



Massimo Aureli (a sx), responsabile del progetto, e Anna Tamanini, dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Despite the development of new generation of correctors, in bronchial epithelial cells the rescued F508del-CFTR is characterized by a low stability at the plasma membrane level, condition enhanced by the use of CFTR potentiator VX-770 and by infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Several pieces of evidence suggest that in CF bronchial epithelial cells the lack of CFTR is followed by an alteration in the content of two lipids involved in the PM stability of transmembrane proteins such as the sphingolipid monosialo-ganglioside GM1 and cholesterol. In addition, we found that GM1 interacts with CFTR suggesting its active role in the organization of the plasma membrane macromolecular complex of channel.

**Rationale and objectives of the project.** The aim of this project is to investigate the role of GM1, or cholesterol or its derivative  $\beta$ -sitosterol (BSS), on the effectiveness of the new modulators on the functional rescue of F508del-CFTR also in the presence of *P. aeruginosa* infection.

**Essential methods.** Plasma membrane lipid composition of bronchial epithelial cells will be modulated by administration of GM1, cholesterol or BSS. The effect of lipid modulation on the efficacy of F508del-CFTR rescue by VX-661 and VX-445 will be tested in CF bronchial cell lines and primary cells exposed to VX-770 and/or infected by *P. aeruginosa*. In parallel, the impact of plasma membrane lipid modulation on the inflammatory response will be explored in these experimental models.

**Preliminary results.** Thanks to a previous grant (FFC #2/2018), we found an alteration of lipid composition in CF bronchial epithelial cells and we discovered that the exogenous administration of GM1 counteracted the negative effects of VX-770 and *P. aeruginosa* infection on rescued F508del-CFTR expression.

**Conclusions.** Optimization of the effectiveness of F508del-CFTR rescue and the control of the excessive inflammatory response in patients infected with *P. aeruginosa* still represents an unmet need. Combination of lipids and CFTR modulators is an innovative strategy that could ameliorate the response of CF patients to new therapies. GM1, cholesterol and BSS are already in use for other diseases, thus they could be repositioned as adjuvants of correctors and potentiators to optimize their effect on rescue of F508del-CFTR.

## Strategie terapeutiche basate sui lipidi per ottimizzare l'efficacia dei farmaci innovativi per la cura della Fibrosi Cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Uno dei principali ostacoli nel recupero funzionale di CFTR con mutazione F508del risiede nell'effetto collaterale che il potenziatore VX-770 esercita sulla membrana cellulare con conseguente riduzione del CFTR mutato a livello apicale, fenomeno contrastato dalla somministrazione esogena del ganglioside GM1. Essendo il VX-770 componente anche della recente formulazione Trikafta, ci proponiamo di indagare i possibili effetti del potenziatore sulla stabilità in membrana del CFTR recuperato dai due correttori. Inoltre, ad oggi non sono disponibili dati relativi all'efficacia di questo nuovo farmaco in presenza di infezioni croniche da *P.aeruginosa*, responsabile di una maggiore internalizzazione della proteina CFTR. Risulta pertanto rilevante sviluppare nuovi approcci terapeutici capaci di aumentare la stabilità in membrana di CFTR anche in presenza di infezioni batteriche, condizione comune nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC).

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro obiettivo è quello di studiare la possibilità che la somministrazione esogena del ganglioside GM1, e di un ulteriore lipide stabilizzatore di membrana come il colesterolo o di un suo derivato vegetale, il  $\beta$ -sitosterolo, possa aumentare l'efficienza di correttori e potenziatori nel recupero funzionale della CFTR con mutazione F508del, anche in presenza di infezioni da *P.aeruginosa*.

**Metodi essenziali.** Nello studio utilizzeremo cellule epiteliali bronchiali e colture primarie FC sulle quali verrà valutato il recupero e l'attività della proteina CFTR con mutazione F508del a seguito della somministrazione dei composti lipidici in associazione con differenti combinazioni di VX-661, VX-445 e VX-770 anche in presenza di infezione con diversi ceppi di *P.aeruginosa*.

**Risultati.** Le indagini condotte hanno evidenziato una diversa composizione lipidica nelle cellule bronchiali FC dove è stata riscontrata una riduzione nel contenuto di GM1 e colesterolo. Inoltre abbiamo dimostrato che il ripristino in membrana del contenuto di GM1 contrasta l'effetto negativo di VX-770 e dell'infezione da *P.aeruginosa* stabilizzando la CFTR mutata in membrana.

**Conclusioni.** Il GM1 e il  $\beta$ -sitosterolo sono molecole già in uso per la cura di altre patologie. I risultati di questo studio potrebbero rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'associazione di lipidi con correttori e potenziatori, per migliorare l'efficacia dei trattamenti nei pazienti FC.

### 37. Validation of the biodistribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems

Lentini L<sup>1\*</sup>, Pace A<sup>1\*\*</sup>, Tutone M<sup>1\*\*</sup>, Perriera R<sup>1\*</sup>, Carlon M<sup>2</sup>, Vermeulen F<sup>2</sup>, Melfi R<sup>1\*</sup>, Zizzo MG<sup>1\*</sup>, Di Leonardo A<sup>1\*</sup>, Pibiri I<sup>1\*\*</sup>

<sup>1\*</sup>Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF) <sup>\*</sup>CELLULAR BIOLOGY-Section and <sup>\*\*</sup>CHEMISTRY-Section, University of Palermo. <sup>2</sup>Laboratory for Molecular Virology and Gene Therapy, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, KU Leuven (FFC#6/2020. New)



Laura Lentini (a sx), responsabile del progetto, con Ivana Pibiri, partner

**Background/problem/Hypothesis.** Among the mutations of the Cystic Fibrosis Transconductance Regulator (CFTR) gene, causing Cystic Fibrosis (CF), nonsense mutations are the second most diffused

mutations. A proposed approach restoring the nonsense mutated CFTR gene is translational readthrough of premature termination codons (PTCs) by Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs).

**Razionale and objectives of the project.** The main aims are to assess the drug biodistribution, to assay the CFTR expression and functionality after treatment with studied TRIDs *in vivo*, and to support the hypothesized MOA. We will evaluate CFTR expression in a CFTR UGA stop mouse model system after treatment with three different TRIDs and estimate the activity of the new lead molecules in human organoids expressing a nonsense-CFTR-mRNA. Moreover, we will detect the TRIDs biodistribution *in vivo*. Finally, we will study the biological target by computational approach.

**Essential methods.** The project will start with the scale up of the molecules synthesis to obtain adequate amounts of the selected TRIDs to study the drugs biodistribution in a mouse model. Analysis of CFTR expression and functionality after treatment with proposed TRIDs will be performed in CFTR UGA stop mouse model and in human CF intestinal organoids carrying nonsense CFTR mutations. Finally, TRIDs biological targets and MOA will be studied by computational evaluation.

**Preliminary results.** By computational and biological screening, we identified three new small molecules showing high readthrough activity in CF cell model system. Next steps for the development of these TRIDs drug candidates are the study of: i) biodistribution; ii) bioactivity in advanced nonsense CF models; iii) mechanism of action (MOA).

**Conclusions.** Demonstration of reproducible readthrough activity of the studied TRIDs in human intestinal organoids and a CF mouse model; record of biodistribution data; definition of TRIDs MOA.

### Studio della biodistribuzione e attività di nuove molecole ad azione readthrough sul modello murino e su sistemi modello di fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Le mutazioni stop rappresentano, per frequenza, il secondo tipo di mutazione del gene CFTR. Sono delle mutazioni associate ad un fenotipo severo della malattia, in quanto comportano la completa assenza della proteina canale del cloro. Tali mutazioni sono responsabili della formazione dei così detti "codoni di stop prematuri", che in posizione normale determinano la fine della traduzione di una proteina, ma che in questo caso si vengono a trovare in una posizione anticipata sull'mRNA. Ciò comporta un'interruzione della sintesi della proteina e produzione di una proteina non funzionale. Un approccio terapeutico per questo tipo di mutazione è rappresentato dal "readthrough", cioè il "superamento" del codone di stop prematuro, portando a termine la sintesi di una proteina completa. Questo è reso possibile da farmaci noti come TRIDs (Translational Read-Through-Inducing Drugs, Farmaci Induttori di Lettura Completa Translazionale)

**Ipotesi e obiettivi.** Lo studio è volto all'estensione dei dati ottenuti *in vitro* nel nostro lavoro precedente (FFC#3/2017), al fine di valutare se sistemi modello di fibrosi cistica, quali il modello di topo CFTR<sup>UGAstop</sup> organoidi umani da pazienti affetti da FC con mutazioni stop, rispondono in maniera simile a quanto già osservato *in vitro*. Oltre alla più approfondita comprensione del meccanismo d'azione e target biologico delle molecole TRIDs.

**Metodi essenziali.** Valuteremo l'espressione del canale CFTR in un sistema modello topo CFTR<sup>UGAstop</sup> dopo il trattamento con tre differenti molecole TRIDs e stimeremo l'attività delle nuove molecole in tessuto intestinale del topo mutante e su organoidi umani intestinali con mutazioni di stop del gene CFTR. Ceppi di topi sani verranno invece utilizzati per la valutazione della biodistribuzione dei TRIDs *in vivo*. Il target biologico sarà studiato mediante approcci computazionali.

**Risultati preliminari.** Nel nostro precedente progetto siamo riusciti ad identificare tre molecole che presentano una elevata attività di readthrough su codoni di stop prematuri. Molecole che sembrano essere alquanto promettenti dal momento che hanno mostrato una bassa tossicità, sia *in vitro* sia *in vivo* (modello Zebrafish).

**Conclusioni.** I risultati di tale lavoro, qualora positivi, saranno da considerarsi di notevole importanza come sperimentazione pre-clinica delle tre molecole studiate.



### 38. New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other nontuberculous mycobacteria\*

Degiacomi G<sup>1</sup>, Chiarelli LR<sup>1</sup>, Recchia D<sup>1</sup>, Riva C<sup>2</sup>, Muñoz Muñoz L<sup>3</sup>, Riabova O<sup>4</sup>, Monakhova N<sup>4</sup>, Cirillo DM<sup>2</sup>, Manetti F<sup>5</sup>, (Ramon-Garcia S<sup>3</sup>, Tortoli E<sup>2</sup>, Makarov V<sup>4</sup>, in extension prject), Pasca MR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia; <sup>2</sup>Emerging Bacterial Pathogens Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, IRCCS San Raffaele, Milano; <sup>3</sup>Research and Development Agency of Aragón (ARAID) Foundation/Dep. Microbiology/Fac.Medicine, University of Zaragoza, Spain; <sup>4</sup>Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Department of Biotechnology, Chemistry e Pharmacy, University di Siena, Siena(FFC#19/2018. Concluded – FFC#14/2020. Extension Project)



Maria Rosalia Pasca, responsabile del progetto, e i ricercatori delle tre unità partner (V. Makarov, S. Ramon Garcia, E. Tortoli)

**Background, problem, hypothesis.** Cystic Fibrosis (CF) patients can be infected by nontuberculous mycobacteria (NTM) with a prevalence of 3.3-22.6% worldwide. Among NTM, *Mycobacterium abscessus* (Mab) is the most challenging pathogen due to its intrinsic/acquired resistance to antibiotics. Mab drug therapy takes up to 2 years and it is successful only for about 30% of patients.

**Rationale and objectives of the project.** Since Mab infection is spreading among CF patients and there is a lack of antibiotics active against Mab, we aimed to find and characterize new active molecules.

**Essential methods.** The MIC values were determined using REMA method. An RNAseq experiment was carried out to understand the mechanism of action (MOA) of the compound named 11326083. Time killing assay was used to assess the bactericidal activity of this compound.

**Results.** After a screening of more than 700 compounds, we found one promising molecule (11326083, MIC: 1 µg/ml), which is bactericidal at high concentrations. Using a transcriptomic approach, we obtained interesting clues about its MOA. Out of 22 derivatives of 11326083, the 11826384 compound was selected as the most active one (MIC: 0.25 µg/ml). Both compounds are active against Mab clinical isolates, also multi-drug resistant (MDR) ones, and other NTM species. Isolation of mutants resistant to 11826384 is in progress, as well as the determination of its bactericidal activity. MmpL3, a transporter of essential cell-wall components, is a new druggable target in Mab2. For this reason, we searched for MmpL3 inhibitors taking advantage of in silico docking studies. Three compounds (mefluoquine, benzoimidazole derivative and arylurea derivative) were selected (MIC: 16 µg/ml) and are active against Mab clinical isolates (also MDR) and other NTM species. The arylurea de-

rivative was discarded for cytotoxicity issue.

**Conclusions.** We identified two promising compounds synthesized ad hoc for this project and their characterization is on-going. After docking studies, two compounds belonging to public libraries were found as possible inhibitors of Mab MmpL3 transporter.

**Project Extension (FFC#14/2020).** We will characterize the MOA of the most promising 11826384, the best 11326083 derivative. Further studies will be performed, such as: activity against Mab biofilm; drug combination; cytotoxicity; in vivo evaluation of its activity in a murine model infected by Mab3. Finally, the validation of MmpL3 as target of mefluoquine and benzoimidazole derivative is ongoing.

### Nuove armi contro *Mycobacterium abscessus* e altri micobatteri non tubercolari

**Problema e ragioni dello studio.** Le infezioni causate da micobatteri non tubercolari (MNT) si stanno diffondendo tra i pazienti con fibrosi cistica (FC) con una prevalenza globale che va dal 3,3 al 22,6%. *Mycobacterium abscessus* (Mab) è il patogeno più difficile da trattare per la resistenza intrinseca e acquisita agli antibiotici. La terapia farmacologica dura fino a 2 anni e ha successo solo per circa il 30% dei pazienti.

**Ipotesi e obiettivi.** Poiché si riscontrano sempre più spesso infezioni causate da Mab tra i pazienti con FC e vi è una carenza di antibiotici, stiamo cercando e caratterizzando nuove molecole attive contro tale patogeno.

**Metodi essenziali.** Per selezionare antibiotici promettenti, abbiamo valutato la minima concentrazione inibente la crescita di Mab tramite il metodo REMA. Per comprendere poi il meccanismo d'azione del composto 11326083, è stato condotto un esperimento di RNAseq. Inoltre si è valutata la sua attività battericida.

**Risultati.** Oltre 700 composti sono stati valutati per la loro capacità di inibire la crescita di Mab, ma solo una molecola, 11326083, è risultata attiva con azione battericida ad alte concentrazioni. Per comprenderne il meccanismo d'azione, abbiamo utilizzato un approccio trascrittomico ottenendo risultati interessanti. Derivati di 11326083 sono stati valutati e tra questi il 11826384 è risultato più attivo, anche rispetto al primo composto. Entrambi i composti sono attivi contro gli isolati clinici di Mab, anche quelli resistenti a più farmaci (MDR) e ad altre specie di MNT. Un nuovo bersaglio farmacologico per Mab è MmpL3, un trasportatore di componenti della parete cellulare. Abbiamo quindi cercato possibili inibitori di MmpL3 che blocchino anche la crescita di Mab, selezionando due composti (mefluochina e un derivato del benzoimidazolo). Tali composti sono attivi contro gli isolati clinici di Mab (anche MDR) e altre specie MNT.

**Conclusioni.** Abbiamo identificato due composti promettenti che inibiscono la crescita di Mab. Altri due composti attivi sono possibili inibitori del trasportatore MmpL3.

**Estensione del progetto (FFC#14/2020).** Sarà studiato il meccanismo di azione di 11826384, la molecola più promettente. Inoltre, saranno valutate diverse altre proprietà, come: la sua attività contro il biofilm di Mab e in combinazione con altri antibiotici, la sua citotossicità e la sua attività in topi infettati con Mab3. Infine, è in corso la validazione di MmpL3, un trasportatore di componenti della parete cellulare degli MNT, come bersaglio farmacologico della mefluochina e di un derivato del benzoimidazolo.

### 39. Preclinical evaluation of liposomes carrying bioactive lipids as an immune therapeutic tool against in vitro and vivo infection with *Mycobacterium abscessus*\*

Riva C<sup>1</sup>, Poerio N<sup>2</sup>, Rossi M<sup>1</sup>, Saliu F<sup>1</sup>, Tortoli E<sup>1</sup>, Fraziano M<sup>2</sup>, Cirillo DM<sup>2</sup>





Daniela Maria Cirillo, responsabile del progetto

**Background and rationale.** *M. abscessus* (MA) is an emerging multidrug resistant (MDR) non-tuberculous mycobacterium (NTM) that affects cystic fibrosis (CF) patients, and is often associated with a dramatic decline in lung function<sup>1</sup>. Persistence of infection in CF patients is partly due to ineffective uptake and killing of pathogens due to a defect in macrophage phagocytosis. Liposomes carrying bioactive lipids have been demonstrated to significantly enhance bactericidal response in macrophages from CF patients and bronchoalveolar lavage (BAL) cells from non-CF patients with pneumonia caused by different bacterial pathogens, irrespective of bacterial species and multidrug resistance. Furthermore, in our laboratory, we have established a model for MA chronic infection in mice.

**Hypothesis and objectives.** The main goal of the present study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* MA infection the synergistic effect of the liposome ABL/PI5P, selected in the previous FFC #16/2018 project, with the amikacin, an antibiotic commonly used in the treatment of MA infection.

**Essential methods.** The effect of amikacin, ABL/PI5P and the combination of both compounds were tested against MA reference strain (ATCC 19977) infection: i) on human pro-monocytic THP-1 leukemia cell line (dTHP-1) and ii) on immunocompetent C57Bl/6 mice with lung chronically infected with MA; after 8 and 30 days of treatment, mice lungs were processed for microbiological analysis, inflammatory response and histological analysis.

**Results.** *In vitro* results showed that the combination of ABL/PI5P and amikacin increase the intracellular microbicidal activity of human dTHP1 infected with MA than the antibiotic or the ABL/PI5P alone. We tested "in vivo" response of mice infected with MA to ABL/PI5P, amikacin and ABL/PI5P+amikacin after 7 and 36 days of treatment. At 7 days, we observed a statistical decrease of the lung bacterial load and of the inflammatory response in comparison to control mice but without differences related to the treatment protocols. After 36 days of mice treatment, we could appreciate the synergist effect of ABL/PI5P and the antibiotic in term of statistical reduction of lung bacterial load in comparison to ABL/PI5P and amikacin alone. Histological analysis revealed that treatments reduced the number of typical granuloma lesions caused by MA infection.

**Conclusions.** We identified a combined treatment that may enhance the innate antibacterial response against MA infection and to increase the killing capacity of macrophages with CF mutations. Liposomes delivering bioactive lipid could represent a novel immunotherapeutic strategy to treat pulmonary infection by drug-resistant MA in CF patients.

## Studio pre-clinico *in vitro* e *in vivo* di un approccio immunoterapeutico basato su liposomi bioattivi per il controllo dell'infezione causata da *Mycobacterium abscessus*

**Problema e ragione dello studio.** *M. abscessus* (MA) è un pa-

togeno emergente multi-resistente che colpisce pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) ed è spesso associato a un drammatico declino delle funzioni polmonari. La persistenza dell'infezione nei pazienti FC è in parte dovuta a un difetto nell'azione delle cellule macrofagiche. È stato dimostrato che liposomi che trasportano lipidi bioattivi aumentano in modo significativo la risposta battericida nei macrofagi di pazienti con FC e nelle cellule di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti non-FC con polmonite causata da diversi patogeni multi-resistenti.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di valutare *in vitro* e *in vivo* l'effetto sinergico contro l'infezione causata da MA del liposoma ABL/PI5P, selezionato nel precedente progetto FFC # 16/2018, e l'amikacina, comunemente utilizzata nel trattamento dell'infezione da MA.

**Metodi essenziali.** L'effetto dell'amikacina, del liposoma ABL/PI5P e la combinazione di entrambi i composti sono stati testati contro l'infezione del ceppo di riferimento MA (ATCC 19977): i) sulla linea cellulare macrofagica (dTHP1) e ii) su topi immunocompetenti C57Bl/6 con polmoni cronicamente infetti da MA; dopo 7 e 36 giorni di trattamento i polmoni dei topi sono stati processati per l'analisi microbiologica, la risposta infiammatoria e l'analisi istologica.

**Risultati.** I risultati *in vitro* hanno mostrato che la combinazione del liposoma ABL/PI5P e lamikacina aumenta l'attività microbicida intracellulare delle cellule dTHP1 infettate con MA rispetto all'azione del singolo liposoma e del solo antibiotico. Dopo 7 giorni, nei topi trattati il liposoma ABL/PI5P, l'amikacina e la combinazione di entrambi i composti hanno ridotto statisticamente la carica batterica polmonare e la risposta infiammatoria rispetto ai topi di controllo, ma senza differenze in relazione al tipo di trattamento. Dopo 36 giorni di trattamento dei topi, invece, abbiamo potuto apprezzare l'effetto sinergico del liposoma ABL/PI5P e dell'antibiotico in termini di riduzione statistica della carica batterica polmonare rispetto all'effetto del liposoma ABL/PI5P e all'amikacina da soli. L'analisi istologica ha rivelato che i trattamenti hanno ridotto il numero di lesioni tipiche del granuloma causate dall'infezione da MA.

**Conclusioni.** Abbiamo identificato un trattamento combinato che potrebbe migliorare la risposta antibatterica innata contro l'infezione da MA e aumentare la capacità di uccisione dei macrofagi con mutazioni FC. I liposomi potrebbero rappresentare nei pazienti FC una nuova strategia immunoterapeutica per il trattamento dell'infezione polmonare da MA resistente ai farmaci.

## 40. *In vitro* and *in vivo* efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens\*

**Notomista E, Pizzo E**

Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia (FFC#18/2018. Concluded)



Eugenio Notomista, responsabile del progetto, e Elio Pizzo, dell'unità partner

**Background and rationale.** Pathogenic bacteria easily develop resistance to conventional antibiotics, this urges the development of new antimicrobials especially for the treatment of biofilm-associated chronic infections. Antimicrobial peptides (AMPs), essential com-

ponents of innate immune system, show broad range antimicrobial, antibiofilm and anti-inflammatory activity. Unfortunately, their sensitivity to proteases limits their usefulness as drugs. A possible solution is to develop antimicrobial peptidomimetics, structurally and functionally similar to AMPs, but resistant to proteases.

**Hypothesis and objectives.** The aim of the project is to explore the efficacy *in vitro* and *in vivo* of P13#1, an antimicrobial peptidomimetic designed to mimic cathelicidins (AMPs from vertebrates).

**Essential methods.** MIC values were measured on a wide panel of strains for P13#1 alone and in combination with common antibiotics. Antibiofilm studies were performed on *P. aeruginosa* PAO1 and RP73 (a CF clinical strain). The efficacy *in vivo* was evaluated on PAO1 and RP73 in the mouse model of acute and chronic lung infection developed by the FFC facility CFaCore.

**Preliminary results.** P13#1 showed wide spectrum antimicrobial activity, additivity with ciprofloxacin, weak synergy with tobramycin and full synergy with colistin. Moreover, P13#1 showed antibiofilm activity on *P. aeruginosa* PAO1 and RP73 (MBEC = 25  $\mu$ M). In the acute lung infection model P13#1 significantly reduced PAO1 CFU counts when administered concomitantly with bacteria, but not when administered by aerosol (using PennCentury) after bacterial cell infection. In order to reduce toxicity and improve biodistribution, the experiment was repeated by administering P13#1 in the presence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD), an excipient commonly used to promote the solubility of some drugs. The variability of the results and a strong immunomodulatory effect of CD alone did not allow to reach significant conclusions. In the chronic infection model, P13#1 showed the ability to significantly reduce RP73 CFU in BAL but not in the lung. Further experiments are underway to evaluate the possible negative impact on the biodistribution of P13#1 by agar beads, used as a support to induce chronic infection.

**Conclusions.** P13#1 has high antimicrobial activity both *in vitro* and *in vivo*, however, in the mouse model of lung infection its poor biodistribution and a local toxicity likely reduce its efficacy. Strategies to optimize the administration of P13#1 could greatly improve its usefulness in lung infection.

## Efficacia *in vitro* e *in vivo* di un peptidomimetico antimicrobico e antibiofilm contro patogeni polmonari rilevanti nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** A causa del diffondersi dei ceppi batterici resistenti agli antibiotici è richiesto con urgenza lo sviluppo di nuovi antimicrobici per il trattamento delle infezioni croniche associate alla presenza di biofilm. I peptidi antimicrobici (AMP), componenti essenziali del sistema immunitario innato, possiedono attività antimicrobica, antibiofilm e antinfiammatoria. Purtroppo, la loro sensibilità alle proteasi ne limita l'utilità come farmaci. Una soluzione promettente è lo sviluppo di peptidomimetic resistenti alle proteasi ma strutturalmente e funzionalmente simili ai AMP.

**Ipotesi e obiettivi.** Lo scopo del progetto è esplorare l'efficacia *in vitro* e *in vivo* di P13#1, un peptidomimetico antimicrobico progettato per mimare le catelicidine (AMP caratteristici dei vertebrati).

**Metodi essenziali.** Sono stati misurati i valori di MIC su numerosi ceppi di P13#1 da solo ed in combinazione con vari antibiotici, ed i valori di MBEC su *P. aeruginosa* PAO1 e RP73 (ceppo clinico FC). Sugli stessi due ceppi sono stati condotti studi di efficacia *in vivo* nei modelli murini di infezione polmonare acuta e cronica sviluppati dalla CFaCore.

**Risultati.** P13#1 ha mostrato attività antimicrobica ad ampio spettro, addittività con ciprofloxacina, debole sinergia con tobramicina e piena sinergia con la colistina ed inoltre attività antibiofilm su *P. aeruginosa* PAO1 e RP73 (MBEC minima concentrazione di eradicazione del biofilm = 25  $\mu$ M). Nel modello di infezione polmonare acuta P13#1 riduce significativamente la conta delle CFU (Unità Formanti Colonie) di PAO1 se somministrato contemporaneamente ai batteri, ma non se somministrato dopo le cellule batteriche mediante aerosol (PennCentury). Allo scopo di ridurre la tossicità e migliorare la biodistribuzione, l'esperimento è stato

ripetuto somministrando P13#1 in presenza di idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrina (CD), un eccipiente comunemente utilizzato per promuovere la solubilità di alcuni farmaci. La variabilità dei risultati ottenuti e un forte effetto immunomodulatorio della sola CD non hanno permesso di arrivare a conclusioni significative. Nel modello di infezione cronica, P13#1 ha mostrato la capacità di ridurre significativamente le CFU nel BAL (Liquido BroncoAlveolare) ma non nel polmone. Sono in corso ulteriori esperimenti per valutare il possibile impatto negativo sulla biodistribuzione di P13#1 delle sferette di agar utilizzate per indurre l'infezione cronica.

**Conclusioni.** P13#1 ha un'elevata attività antimicrobica sia *in vitro* che *in vivo*, tuttavia, nei modelli murini di infezione polmonare, una scarsa biodistribuzione e la tossicità locale probabilmente ne compromettono l'efficacia. In futuro, strategie per ottimizzare la somministrazione di P13#1 potrebbero migliorare notevolmente la sua utilità nel trattamento delle infezioni polmonari.

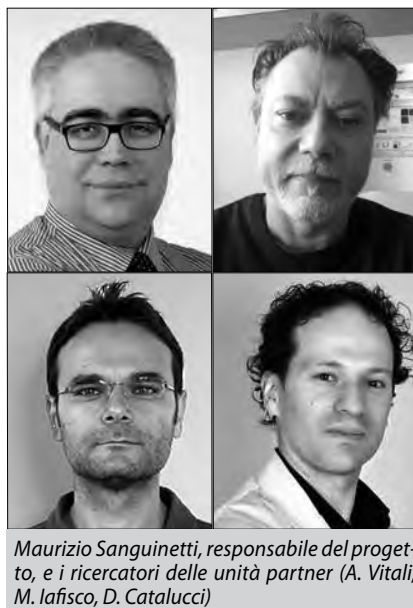
## 41. Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections\*

Sanguinetti M<sup>1</sup>, Vitali A<sup>2</sup>, Iafisco M<sup>3</sup>, Catalucci D<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma; <sup>2</sup>Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR-ICRM;

<sup>3</sup>Istituto di Scienza e Tecnologia dei materiali ceramici ISTEC - CNR, Faenza;

<sup>4</sup>Istituto di Genetica e Ricerca biomedica -IRGB, Milano (FFC#20/2018. Concluded)



**Problems and reason for the study.** In the search for new antibiotics to combat the persistence of antibiotic-resistant bacterial strains that cause chronic lung infections in CF patients, antimicrobial peptides (AMPs) are a viable alternative to conventional drugs. The idea of our project, now in its second year of activity, is to convey AMPs with inhalable nanoparticles (NPs) to increase their effectiveness, especially against bacterial biofilm. The formulation of our NPs is based on the use of calcium phosphate (CaP), an inorganic molecule also present in our body (bones and teeth) to make them biocompatible, and "armed" with AMPs. The research held during the second year of the project has been carried out essentially following the original proposed project planning. In particular, the optimization of the synthesis of functionalized CaP-NPs has been completed leading to the production of two typologies of nanomaterials, one Colistin-loaded CaP-NPs and CaP-NPs functionalized with the antibiofilm peptide 1018.



**Methods.** Synthesis was achieved adding peptides in the reaction mix to obtain an encapsulation of the molecules into the one-pot synthesis of CaP or by a post synthesis surface functionalization. The materials characterization has been performed by UV-Vis Spectrometry, HPLC, Thermogravimetric analysis (TGA), Attenuated total reflectance (ATR) and Dynamic Light Scattering (DLS). To test their efficacy, functionalized CaP-NPs has been tested in several biological and functional *in vitro* studies comprehending antibiofilm activity assessed by confocal microscopy, scanning electronic microscopy (SEM) and Colony Forming Units (CFU) count.

**Results.** Functionalized CaP-NPs showed to possess a good antibiofilm activity reducing the pre-formed biofilm and inhibiting the *de-novo* biofilm formation. SEM and confocal images of *P. aeruginosa* RP73 biofilm treated with functionalized CaP-NPs are extremely convincing, demonstrating the ability of AMPs to disrupt bacterial biofilm, data confirmed by the CFU count obtained from the bacterial biofilm treated samples compared to the controls. The ability of CaP-NPs to permeate through artificial mucus (AM) was also studied showing that both typologies of functionalized CaPs can trespass the mucus barrier within few hours upon application. Finally, at the time of writing this abstract, *in vivo* test have been started inhaling free and CaP-NPs conjugated peptides by using a Penn Century device in Balb c mice. As a preliminary result, the animals did not show toxicity effects upon treatment in the used conditions.

**Conclusions.** The experiments carried out in these two years of activity have made it possible to obtain stable CaP-NPs functionalised with AMPs. *In vitro* tests have validated the effectiveness of CaP-NPs against *P. aeruginosa* biofilm and animal tests have made it possible to verify their lack of toxicity. These results are very encouraging to consider this antibiotic formulation as an effective weapon to fight chronic infections in CF patients, but at the same time further studies are needed to investigate the effects in animal models (effectiveness against infection, inflammation and biodistribution) which we hope to carry out in a possible continuation of the project.

## Nanoparticelle biocompatibili ed inalabili funzionalizzate con peptidi antimicrobici per contrastare la formazione di biofilm e l'antibiotico resistenza: verso una nuova potenziale terapia per le infezioni correlate alla FC

**Problemi e ragione dello studio.** Nella ricerca di nuovi antibiotici per contrastare la persistenza dei ceppi batterici antibiotico-resistenti, causa delle infezioni polmonari croniche a carico dei pazienti di FC, i peptidi antimicrobici (AMPs) rappresentano una valida alternativa ai farmaci convenzionali. L'idea del nostro progetto, giunto al secondo anno di attività, è di veicolare gli AMP con nanoparticelle (NPs) inalabili per aumentarne l'efficacia, soprattutto contro il biofilm batterico, una sorta di matrice protettiva che i batteri si costruiscono nei tessuti polmonari per difendersi anche dagli antibiotici. La formulazione delle nostre NPs si è basata sull'uso del calcio fosfato (CaP), una fase inorganica presente anche nel nostro organismo, in particolare nelle ossa e nei denti e di conseguenza totalmente biocompatibile.

**Metodi.** Le NPs sono state preparate mediante un approccio sintetico di tipo one-pot, ovvero aggiungendo una soluzione di calcio ad una di fosfato, ottimizzando le condizioni (concentrazione dei reagenti, temperatura e tempi di reazione) anche in base ai peptidi utilizzati. Questo processo è stato effettuato mediante interazione di una soluzione a concentrazione nota dei peptidi antimicrobici e antibiofilm (Colistina e peptide 1018), e del nanomateriale. Le CaP-NPs sono state poi testate *in vitro* per valutarne l'efficacia su modelli di biofilm e di muco artificiale ed infine su modelli *in vivo* utilizzando topi C57Bl/6c sia per studi di tossicità che per studi di efficacia.

**Risultati.** Dai processi di sintesi abbiamo ottenuto nanoparticelle stabili funzionalizzate con Colistina, un peptide utilizzato come standard di riferimento, e con il peptide antibiofilm 1018. Per validare le proprietà antibiofilm di entrambe le formulazioni

di CaP-NPs, abbiamo effettuato diversi test biologici e funzionali nei confronti di isolati clinici di *Pseudomonas aeruginosa*. Le formulazioni sono risultate efficaci sia nell'inibire le fasi precoci della formazione del biofilm, sia nella disgregazione di biofilm pre-formato. Inoltre, hanno anche mostrato una buona capacità di penetrare il muco. Nei test *in vivo* hanno, al momento, dimostrato di non avere effetti tossici sugli animali trattati.

**Conclusioni.** Gli esperimenti condotti in questo anno conclusivo di attività hanno permesso di ottimizzare la sintesi delle CaP-NPs funzionalizzate con peptidi antimicrobici. I test *in vitro* hanno validato l'efficacia delle CaP-NPs contro il biofilm ed i test su animali hanno permesso di verificarne la mancanza di tossicità. Questi risultati sono molto incoraggianti per poter considerare questa formulazione antibiotica una efficace arma per contrastare le infezioni croniche nei pazienti FC, al contempo però sono necessari ulteriori studi per approfondire gli effetti nei modelli animali (contrasto all'infezione, infiammazione e biodistribuzione) che speriamo di poter effettuare in un eventuale proseguimento del progetto.

## 42. Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens

Ascenzioni F<sup>1</sup>, Imperi F<sup>2</sup>, Botta B<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma; <sup>2</sup>Dip. Scienze, Università Roma Tre; <sup>3</sup>Dip. Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università La Sapienza, Roma (FFC#15/2019. In progress)



Fiorentina Ascenzioni, responsabile del progetto, Francesco Imperi e B. Botta dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** *Pseudomonas aeruginosa* is among the bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Colistin is often used as the last-resort treatment for *P. aeruginosa* infections, also in cystic fibrosis (CF) patients. However, the spread of resistance to this antibiotic is becoming critical. The antibacterial activity of colistin relies on its interaction with LPS, and it has been demonstrated that aminoarabinose modification of the lipid A moiety of LPS is crucial for the development of colistin resistance in *P. aeruginosa*.

**Rationale and objectives.** Using a structure-guided *in silico* approach to search for potential inhibitors of ArnT, i.e. the enzyme which catalyses the last step of lipid A aminoarabinylation (2), we have previously identified a lead natural compound (BBN149) that reverts colistin resistance in a colistin-resistant reference isolate. The aim of the project was to further validate this inhibitor and optimize it through the generation of derivatives with improved potency and/or specificity.

**Essential methods.** BBN149 derivatives were designed and synthesized by combining computational and chemistry approaches. Colistin synergistic activity was investigated through MIC, time-killing and checkerboard assays. Lipid A modifications were detected by MALDI-TOF mass spectrometry. Cytotoxicity was measured through the standard MTT assay.

**Preliminary results.** In the first year, we verified the capability of the lead compound to reduce lipid A aminoarabinylation and confirmed its activity against a small number of colistin-resistant clinical strains. 15 derivatives of the lead compound were successfully synthesized and compared to the latter for colistin synergistic activity



against the reference isolate and toxicity to CF bronchial cell lines. One of these compounds showed slightly improved potency without inherent cytotoxicity.

**Conclusions.** We identified a BBN149 derivative with promising colistin adjuvant activity. This and the lead compound BBN149 will be further investigated in the second year for activity against biofilms and efficacy in an insect infection model, as well as range of activity using a large panel of CF isolates.

## Inibizione farmacologica della resistenza alla colistina nei patogeni Gram-negativi della fibrosi cistica.

**Problema e ragioni dello studio.** *Pseudomonas aeruginosa* è tra i batteri per i quali è urgente la scoperta di nuovi antibiotici. La colistina può essere l'ultimo antibiotico disponibile per il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* anche nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Tuttavia, la rapida diffusione della resistenza alla colistina lo sta rendendo inutilizzabile. L'attività antibatterica della colistina si basa sulla sua interazione con la componente più esterna della membrana cellulare dei batteri (LPS). In *P. aeruginosa* l'LPS viene modificata mediante l'aggiunta di un residuo di aminoarabinosio rendendo il batterio resistente alla colistina.

**Ipotesi e obiettivi.** Usando un approccio guidato da modelli di interazione virtuali, il nostro gruppo ha isolato un inibitore di ArnT, l'enzima che catalizza l'ultimo step delle reazioni che modificano l'LPS. Si tratta dell'inibitore BBN149, un composto naturale in grado di bloccare la resistenza alla colistina in un ceppo di riferimento. Lo scopo del progetto è quello di validare l'attività di questo inibitore e di ottimizzarlo attraverso la generazione di derivati più potenti e più specifici.

**Metodi essenziali.** Derivati di BBN149 sono stati disegnati e sintetizzati mediante approcci computazionali e chimici. L'attività sinergica con la colistina dei risultanti composti è stata valutata attraverso diversi saggi volti a valutare la sensibilità dei batteri agli antibiotici. Le modificazioni del componente Lipide A dell'LPS sono state valutate mediante spettrometria di massa. Il potenziale citotossico è stato valutato su cellule in coltura con il saggio MTT.

**Risultati preliminari.** Nel primo anno di attività abbiamo verificato la capacità di BBN149, di ridurre le modificazioni del lipide A, responsabile della resistenza alla colistina, e ne abbiamo confermato la sua attività contro un piccolo numero di isolati resistenti alla colistina. Inoltre, 15 derivati di BBN149 sono stati sintetizzati con successo e la loro attività è stata saggiata con il ceppo di riferimento. Uno di questi ha dimostrato un incremento della sua attività, seppur lieve, senza mostrare citotossicità.

**Conclusioni.** Abbiamo identificato un derivato del composto BBN149 come adiuvante della colistina. Questo composto, in aggiunta a BBN149, sarà ulteriormente investigato nel secondo anno di attività del progetto. Ne verificheremo l'attività contro biofilm batterici e altri isolati clinici FC. Inoltre, ne testeremo l'attività in un modello di infezione di insetto.

## 43. Fighting *Pseudomonas aeruginosa* persists in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies

Biavasco F<sup>1</sup>, Citterio B<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze Ambientali e della Vita, Università Politecnica delle Marche, Ancona; <sup>2</sup>Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università di Urbino (FFC#16/2019. In progress)

**Background, problem, hypothesis.** Bacterial persister cells, including Viable But Non-Culturable (VBNC) forms, may be involved in the recurrence of Chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cystic Fibrosis (CF) patients. Antibiotic treatment may contribute to the induction of these dormant forms, which are undetected by the routine cultural diagnostic assays.



Francesca Biavasco (a sx), responsabile del progetto, e Barbara Citterio dell'unità partner

**Rationale and objectives of the project.** The specific aims of the project are: 1) to evaluate the role of different antibiotics in inducing *P. aeruginosa* VBNC cells in starved in vitro biofilms; 2) to develop a species-specific flow cytometry protocol capable of detecting all viable (culturable and VBNC) *P. aeruginosa* cells.

**Essential methods.** In vitro GFP-expressing *P. aeruginosa* PAEG1 biofilms were exposed to 1000xMIC piperacillin; survivors were maintained in nutrient-depleted medium with/without 1/4x MIC of different antibiotics (ceftazidime, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, meropenem, tobramycin, ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam) for 45 days. The presence of viable (culturable and VBNC) cells was checked 15-days intervals by plate count, qPCR and flow cytometry via GFP detection. *P. aeruginosa*-free sputum samples were spiked with  $1 \times 10^7$  cells/ml of *P. aeruginosa* PAO1 and analyzed by flow cytometry, using Cy3-labeled *P. aeruginosa* specific antibodies.

**Preliminary Results.** After exposure to 100xMIC piperacillin, most (98.7%) *P. aeruginosa* cells shifted to the VBNC state. The exposure of survivors to sub-inhibitory concentrations of the antibiotics exerted a drug-dependent effect: tobramycin and all cell wall-targeting drugs, except ceftazidime/avibactam, caused a higher and earlier induction of the VBNC state than did starvation alone and exposure to ciprofloxacin and ceftazidime/avibactam. The highest amount of VBNC cells ( $4.60 \times 10^6$  cells/ml) was detected in fosfomicin-exposed biofilms. Using labelled antibodies, *P. aeruginosa* cells were reliably detected by flow cytometry in spiked sputum samples, thus excluding sample matrix interference.

**Conclusions.** These results i) further highlight the need for a culture-independent microbiological diagnosis of CF lung infection and ii) suggest the importance of assessing the influence of antibiotic treatment on the maintenance of the VBNC state when selecting the most appropriate drugs. In the second year, the *P. aeruginosa* flow cytometry protocol will be further optimized to analyse polymicrobial sputum samples.

## Lotta contro le forme persistenti di *Pseudomonas aeruginosa* nell'infezione polmonare FC: miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle strategie terapeutiche

**Problema e ragioni dello studio.** Le forme batteriche persistenti, incluse quelle vitali ma non coltivabili (VBNC), sono coinvolte nella recrudescenza dell'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (PA) nei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF). La terapia antibiotica potrebbe influire sullo sviluppo di tali forme, non rilevabili con la diagnosi culturale di routine.

**Ipotesi e obiettivi.** Gli obiettivi principali del progetto sono: 1) saggiare il ruolo di diversi antibiotici sull'abbondanza di forme VBNC in biofilm in vitro di PA 2) sviluppare un protocollo di citofluorimetria in grado di rilevare tutte le cellule vitali di PA, incluse le VBNC.

**Metodi essenziali.** Biofilm in vitro di *P. aeruginosa* PAEG1 (che esprime la GFP, Green Fluorescent Protein) erano esposti a piperacillina 1000x MIC e mantenuti per 45 giorni in terreno privo di nutrienti, addizionato o meno di 1/4x MIC di ceftazidime, ciprofloxacin, colistina, fosfomicina, meropenem, tobramicina, cefto-

lozano/tazobactam o ceftazidime/avibactam. Ogni 15 gg erano contaminate le cellule coltivabili (conta in piastra) e le VBNC (qPCR e citofluorimetria basata sulla GFP). Anticorpi specie-specifici fluorescenti sono stati utilizzati per rilevare al citofluorimetro PA in campioni di espettorato sterile inoculati con  $1 \times 10^7$  cellule/ml di PAO1.

**Risultati.** Dopo esposizione ad alte dosi di antibiotico la maggior parte (98.7%) delle cellule di PA risultavano VBNC. L'esposizione a concentrazioni subinibenti ha avuto un effetto farmaco-specifico: la tobramicina e gli antibiotici attivi contro la sintesi della parete, eccetto ceftazidime/avibactam, sono risultati quelli con la maggiore influenza sullo sviluppo di forme VBNC, in particolare la fosfomicina ( $4,60 \times 10^6$  VBNC/ml). Il protocollo di citofluorimetria con anticorpi fluorescenti è risultato efficace nel rilevare PA nei campioni di espettorato inoculati, escludendo l'interferenza della matrice.

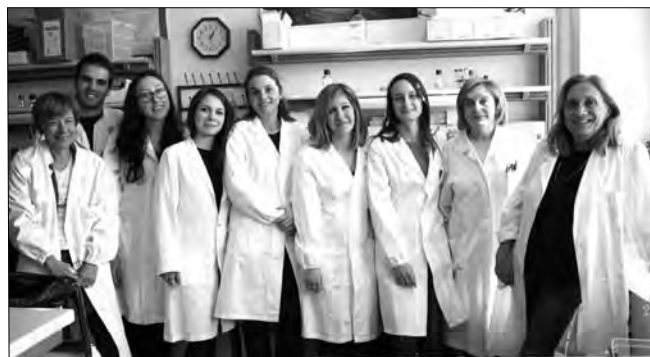
**Conclusioni.** Si conferma la necessità: i) di utilizzare approcci non colturali per poter rilevare tutte le cellule vitali di PA; ii) di tenere in considerazione l'influenza degli antibiotici nello sviluppo di forme batteriche VBNC nell'adottare uno specifico trattamento per debellare biofilm polmonari di PA. Durante il secondo anno di progetto, il protocollo di citofluorimetria specie-specifico per PA sarà ulteriormente ottimizzato per l'analisi di espettorati CF polimicrobici.

#### 44. Investigating *Achromobacter* spp. pathogenicity and clinical role in CF lung infection

Sandri A<sup>1</sup>, Veschetti L<sup>2</sup>, Passarelli Mantovani R<sup>1</sup>, Burlacchini G<sup>1</sup>, Melotti P<sup>3</sup>, Boaretti M<sup>1</sup>, Signoretto C<sup>1</sup>, Malerba G<sup>2</sup>, Lleò MM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Diagnostica e salute pubblica, Università di Verona;

<sup>2</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Scienze del movimento, Università di Verona; <sup>3</sup>Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOUI Verona (FFC#18/2019. In progress)



Maria M. Lleò, prima a destra, con i ricercatori del laboratorio che collaborano al progetto

**Background.** *Achromobacter* spp are frequently isolated in sputum samples from CF patients. Although their clinical role is not fully clear yet, chronic infection has been associated with lung inflammation, increased frequency of exacerbations and decline of the respiratory function and is usually complicated by multidrug resistance.

**Rationale and objectives.** *Achromobacter* spp. pathogenicity is probably related to virulence features supporting invasion and survival in a hostile environment like CF lungs, similarly to other CF pathogens. We aim to identify these features and to evaluate their impact on host response and respiratory decline.

**Essential methods.** Fifty-four *Achromobacter* spp. clinical strains, isolated from 26 CF patients with occasional ( $n=11$ ) or chronic ( $n=15$ ) infection, underwent whole genome sequencing and genomic analysis. Virulence was evaluated in *Galleria mellonella* larvae model. Biofilm formation was assessed in static conditions.

**Preliminary results.** The phylogenetic analysis identified 67% of the isolates as *A. xylosoxidans*, followed by *A. insuavis* (13%), *A. dolens* (7%), *A. aegrifaciens* (7%) and *A. insolitus* (6%). Investigating antibiotic resistance, 87% of the isolates carried species-specific *bla*OXA genes

and 30% carried additional genes related to this function. As concerns virulence traits, occasional isolates lacked functional genes involved in invasion, chemotaxis, T3SS and anaerobic growth whereas most of chronic isolates had these features. Additionally, a variety of mobile genetic elements (phages, ICEs, ISs) carrying pathogenic genes was widespread among the isolates. In vitro, occasional isolates showed higher biofilm formation than chronic strains. Among clonal longitudinal isolates, both virulence and biofilm abilities showed a stable or decreasing trend over time of infection. Hypermutators ( $n=30$ ) were identified only within chronic isolates, particularly among those collected at a late stage of the infection.

**Conclusions.** *Achromobacter* spp. strains exhibit different patterns of antibiotic resistance and virulence, depending on the species and/or the stage of the infection. This suggests that some strains could be more likely to establish a chronic infection in CF patients, highlighting the importance of identifying pathogenic markers that could help predicting the clinical outcome of the infection and support the use of appropriate treatment regimens.

#### Studio della patogenicità e del ruolo clinico di *Achromobacter* nell'infezione polmonare in fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** *Achromobacter* viene frequentemente isolato da campioni di escreato di pazienti FC. Sebbene il suo ruolo clinico non sia ancora chiaro, l'infezione cronica è stata associata con un declino della funzionalità respiratoria e con infiammazione polmonare, ed è solitamente complicata dalla resistenza agli antibiotici.

**Ipotesi e obiettivi.** La patogenicità di *Achromobacter* è probabilmente correlata a fattori di virulenza che supportano l'invasione e la sopravvivenza in un ambiente ostile come i polmoni dei pazienti con FC in mondo simile ad altri patogeni FC. Lo scopo del progetto è identificare tali fattori e valutare il loro impatto sulla risposta dell'ospite e sul declino respiratorio.

**Metodi essenziali.** 54 ceppi clinici di *Achromobacter*, isolati da 26 pazienti CF con infezione occasionale o cronica, sono stati sottoposti a sequenziamento del genoma e relativa analisi. La virulenza e la formazione di biofilm sono stati valutati in modelli in vitro.

**Risultati preliminari.** Il 67% degli isolati sono stati identificati come *A. xylosoxidans*, seguito da *A. insuavis* (13%), *A. dolens* (7%), *A. aegrifaciens* (7%) e *A. insolitus* (6%). Nell'87% degli isolati sono stati identificati geni di resistenza (*bla*OXA) specie-specifici; inoltre il 30% presentava ulteriori geni di resistenza. Per quanto riguarda i geni di virulenza, gli isolati occasionali mancavano di geni funzionali coinvolti nell'invasione, nella chemiotassi, nei sistemi di secrezione e nella crescita anaerobica, che erano invece presenti nella maggior parte degli isolati cronici. Inoltre, abbiamo rilevato una varietà di elementi genetici mobili che trasportano geni di patogenicità. In vitro, gli isolati occasionali hanno mostrato una formazione di biofilm maggiore rispetto ai ceppi cronici. Sia la virulenza che la capacità di formare biofilm rimangono stabili o diminuiscono nel corso dell'infezione cronica. Solo tra i ceppi cronici sono stati identificati permutanti in grado di accumulare mutazioni che ne favoriscono la persistenza.

**Risultati attesi e possibili ricadute in clinica.** I ceppi clinici di *Achromobacter* mostrano resistenza agli antibiotici e virulenza variabili a seconda della specie e/o dello stadio dell'infezione. Ciò suggerisce che alcuni ceppi potrebbero avere maggiori probabilità di stabilire un'infezione cronica nei pazienti CF, evidenziando l'importanza di identificare marcatori di patogenicità che potrebbero aiutare a prevedere l'esito clinico dell'infezione e supportare l'uso di regimi di trattamento appropriati.

#### 45. Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery of inhalable formulations to the clinic



## Visca P<sup>1</sup>, Sorrentino R<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze, Unità Microbiologia, Università Roma Tre; <sup>2</sup>Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II. (FFC#19/2019. In progress)



Paolo Visca, responsabile del progetto, e Raffaella Sorrentino, responsabile dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients is ultimately attributable to persistent *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) pulmonary infection. Work from our and other groups has shown that the iron-mimetic metal Gallium [Ga(III)] inhibits Pa growth. Ga(III)-based anti-Patherapies are substantiated by clinical trials showing favourable pharmacokinetics, safety and tolerability profiles of intravenously administered Ganite® [FDA-approved Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] in CF patients chronically infected by Pa.

**Rationale and objectives of the project.** Drug delivery to the respiratory tract represents the treatment of choice for CF lung infections, since it maximizes drug concentration at the site of infection, improves therapeutic efficacy, and minimizes systemic side effects. This project aims to provide evidence of *in vivo* antibacterial activity of novel inhalable [Ga(III)] formulations, for the delivery of safer and more effective Ga(III)-based drugs to the clinic.

**Essential methods.** Project main goals include the assessment of: i) the anti-Pa activity of selected Ga(III) formulations; ii) the immunomodulatory properties of Ga(III) formulations; iii) the toxicity and distribution of Ga(III) formulations after administration [intratracheal (i.t.) or nasal instillation(n.i)] in mice; iv) the protective efficacy of Ga(III) formulations in a mouse model of Pa-pneumonia. Ga(III) formulations consist of inhalable dry powders (Ga\_Man NEM), produced by a 2-step process comprising Ga(III) encapsulation in mucus-penetrating polymer nanoparticles and their subsequent embedding in mannitol-based micron-scale powders.

**Preliminary results.** The best Ga\_Man NEM formulation selected based on Ga(III) content, *in vitro* aerosol performance and sustained release kinetics in lung lining fluids, displayed promising anti-Pa activity on a representative collection of 50 Pa CF isolates. Moreover, Ga\_Man\_NEM enhanced (up to 2-fold) Pa macrophage phagocytosis. Pa lethal dose determination in mice showed that 10<sup>7</sup> and 10<sup>6</sup> Pa cells caused a 70 and 20% lethality within 7 days post inoculum, respectively.

**Conclusions.** Preliminary *in vitro* studies indicate that Ga\_Man\_NEM formulations inhibit Pa growth and promote Pa phagocytosis. *In vivo* experiments define that 10<sup>7</sup> cells of Pa PAO1 is the suitable dose for testing efficacy of Ga(III) formulation in murine Pa lung infection. Altogether, these results will foster future clinical application of Ga(III) for inhalation therapy in CF patients.

## Il gallio come agente antibatterico in fibrosi cistica: studi preclinici di formulazioni inalabili a base di gallio in modelli animali

**Problema e ragioni dello studio.** I pazienti con fibrosi cistica (FC) incorrono in frequenti infezioni polmonari causate da ceppi di *P. aeruginosa* (Pa) multi-resistenti agli antibiotici. Studi del nostro e altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che il gallio [Ga(III)] inibisce la crescita di Pa perturbando il metabolismo batterico del ferro. Studi clinici condotti in pazienti FC con infezione cronica da Pa hanno dimostrato che la somministrazione intravenosa di Ga(III) non determina l'insorgenza di effetti collaterali.

**Ipotesi e obiettivi.** Nei pazienti FC è preferibile la somministrazione di farmaci attraverso le vie respiratorie per ottenere una maggiore concentrazione del farmaco nel polmone e ridurre gli effetti collaterali sistemici. Il nostro progetto prevede uno studio pre-clinico, condotto in modelli murini, finalizzato a dimostrare l'efficacia di formulazioni inalabili di Ga(III) per contrastare le infezioni polmonari causate da Pa.

**Metodi essenziali.** Le formulazioni inalabili di Ga(III) sono state saggiate per le loro proprietà anti-Pa *in vitro* su una collezione rappresentativa di isolati clinici. Inoltre, sono in corso studi *in vivo* finalizzati a valutarne la tossicità delle formulazioni e la loro capacità di proteggere topi da infezioni polmonari da Pa.

**Risultati preliminari.** L'attività antibatterica delle formulazioni di gallio è stata saggiata su 50 ceppi clinici di Pa. I risultati ottenuti dimostrano che formulazioni inalabili di Ga(III) possiedono proprietà anti-Pa. Inoltre, sono in grado di aumentare in maniera significativa la fagocitosi di Pa da parte di macrofagi umani. Per quanto attiene gli studi *in vivo*, sono stati condotti saggi preliminari per valutare la dose letale di Pa in un modello murino. Da questi saggi è emerso che 10<sup>7</sup> e 10<sup>6</sup> cellule di Pa causano la morte rispettivamente del 70% e 20% dei topi entro 7 giorni dall'infezione.

**Conclusioni.** Gli studi *in vitro* dimostrano che le formulazioni di Ga(III) sono in grado di inibire la crescita di Pa e aumentare la risposta immunitaria dell'ospite incrementando la fagocitosi di Pa da parte dei macrofagi. Gli esperimenti *in vivo* hanno consentito di sviluppare un modello murino d'infezione polmonare per saggiare l'efficacia delle formulazioni di Ga(III). Questo progetto promuoverà la futura applicazione clinica delle formulazioni inalabili di Ga(III) per il trattamento dell'infezione polmonare da Pa nei pazienti FC.

## 46. Targeting small RNA-mediated regulation of virulence and antibiotic resistance to develop non-traditional therapeutic options against *Pseudomonas aeruginosa*

### Bertoni G

Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano (FFC#10/2020. New)



Giovanni Bertoni, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** The rise in antimicrobial drug resistance, alongside the failure of conventional research to discover new antibiotics, is inevitably and drastically limiting our ability to combat infectious processes. Anti-virulence therapies have become an attractive approach that may yield drugs with high specificity and narrow spectra.

**Rationale and objectives of the project.** In this perspective, bacterial small RNAs (sRNAs) represent a largely unexploited category of potential targets for anti-virulence design. Recently, sRNAs have been shown to play key roles not only in modulating bacterial viru-



lence but also in resistance to the antibiotic treatments. We recently showed that the sRNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in the regulation of virulence and antibiotic resistance. The main aim of this project is to develop and test anti-*ErsA* Peptide-Peptide Nucleic Acids (PPNAs) able to block *ErsA* regulatory function and mimic the phenotypes that we observed in the *P. aeruginosa* *ersA* knock-out mutants.

**Essential methods.** PPNAs annealing to *ErsA* will be tested for the activities of interfering with the *ErsA*-mediated regulation of target genes in *P. aeruginosa* reporter strains, biofilm inhibition/eradication, and resensitization to antibiotics of clinical multi-drug resistance *P. aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.

**Preliminary results.** This project originates from previous projects FFC#13/2015 and FFC#14/2016 in which we studied three *P. aeruginosa* sRNAs, *ErsA*, *Real*, and *PesA*. We found that a *P. aeruginosa* mutant strain in which *ErsA* was knocked-out fails to form a mature biofilm and is significantly less virulent than the wild-type following the infection of both bronchial epithelial cells and murine models. Moreover, the deletion of *ErsA* induces sensitization to ceftazidime, ceftipime, and meropenem in a multidrug-resistant clinical strain.

**Conclusions and expected results.** Overall, we are interested to establish whether anti-*ErsA* PPNAs can be used for further application as anti-virulence drugs in monotherapy or combination with antibiotics currently used in the clinic for the treatment of *P. aeruginosa* airways infections.

## La regolazione della virulenza e della antibiotico resistenza mediata da piccoli RNA come bersaglio per lo sviluppo di terapie non tradizionali contro *Pseudomonas aeruginosa*

**Problema e ragioni dello studio.** L'aumento delle resistenze ai farmaci antimicrobici, associato al fallimento della ricerca convenzionale nella scoperta di nuove molecole antibiotiche, sta limitando in modo drastico ed inesorabile la nostra capacità di combattere i processi infettivi. Le terapie antivirulenza appaiono un interessante approccio che potrebbe condurre all'identificazione di nuovi farmaci con elevata specificità e spettro ristretto.

**Ipotesi e obiettivi.** In questa prospettiva, i piccoli RNA batterici rappresentano una categoria ancora poco sfruttata di potenziali bersagli. È interessante inoltre notare che i piccoli RNA hanno mostrato di giocare un ruolo chiave non solo nei meccanismi di modulazione della virulenza batterica ma anche in processi di resistenza agli antibiotici. Recentemente abbiamo mostrato che il piccolo RNA *ErsA* di *Pseudomonas aeruginosa* è coinvolto nella regolazione della virulenza e della antibiotico resistenza. L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare e saggiare molecole anti-*ErsA*, chiamate Acidi Nucleici Peptidici – PNA, capaci di bloccare la funzione regolatoria di *ErsA* e quindi di mimare i fenotipi che vediamo nei mutanti di *ErsA*.

**Metodi essenziali.** PNA che si legano ad *ErsA* saranno saggiati per la capacità di i) interferire con la regolazione di alcuni geni target di *ErsA* in ceppi reporter di *P. aeruginosa*, ii) inibire/eradicare il biofilm, iii) indurre ri-sensibilizzazione agli antibiotici in ceppi multi-resistenti di *P. aeruginosa* isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica.

**Risultati preliminari.** Questo progetto si origina dai progetti FFC#13/2015 e FFC#14/2016 in cui abbiamo studiato tre piccoli RNA di *P. aeruginosa* chiamati *ErsA*, *Real* e *PesA*. Abbiamo mostrato che un mutante di *ErsA* non riesce a formare un biofilm maturo ed è significativamente meno virulento del wild-type dopo infezione sia di cellule epiteliali bronchiali che di sistemi murini. Inoltre, la delezione di *ErsA* induce sensibilità agli antibiotici ceftazidime, ceftipime e meropenem in un ceppo clinico multiresistente.

**Conclusioni e risultati attesi.** Nel complesso, siamo interessati a stabilire se questi PNA anti-*ErsA* possono essere usati per future applicazioni come farmaci anti-virulenza da soli o in combinazione con antibiotici di uso clinico nel trattamento delle infezioni del polmone da *P. aeruginosa*.

## 47. Disrupting *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing signalling in Cystic Fibrosis patients as a new frontier for antibacterial therapy

Brun P<sup>1</sup>, Marzaro G<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova; <sup>2</sup>Dip. di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche Università di Padova (FFC#11/2020. New)



Paola Brun, responsabile del progetto, e Giovanni Marzaro dell'unità partner

**Background.** Respiratory tract infections remain the leading cause of morbidity and mortality in persons with cystic fibrosis (CF). The microbiota of the lung in CF includes a complex community of microbes where bacteria act collectively in response to a process known as quorum sensing (QS). The QS coordinates the expression of virulence factors eventually affecting host health and ecological dynamics. *P. aeruginosa*, the dominant pathogen in CF, takes advantage of multiple QS signaling systems to subjugate other microbial species and to prevail in lung ecology.

**Objectives.** In this proposal we hypothesize that disruption of the QS in *P. aeruginosa* hampers its virulence, restores the ecological interactions in the lung polymicrobial community, and finally limits pathogenicity of *P. aeruginosa* in CF patients. Therefore, we point at developing new inhibitors of QS signaling in *P. aeruginosa*.

**Essential methods.** Starting from a library of 62 molecules synthesized in our laboratories, we have already identified four compounds active as QS inhibitors. By in silico docking simulations, in this proposal we aim to evaluate already clinically used compounds whose chemical structures match with QS inhibitors. The selected compounds will be evaluated for their ability to silencing virulence of *P. aeruginosa* by assessing inhibition of QS-dependent gene expression and toxin production. As clinically relevant bacterial strains may not be responsive to QS signaling, isolates of *P. aeruginosa* from CF patients will be characterized for mutation in QS-related genes using multilocus sequence typing and tested in different growth media.

**Preliminary results.** Using qRT-PCR we revealed that the identified four compounds significantly reduced mRNA levels of *lasI*, *rhII*, *rhIR*, and *lasR*, genes involved in the synthesis of QS molecules or their receptors. The same compounds reduced *P. aeruginosa* biofilm formation and production of virulence factors such as pyocyanin and LasB protease.

**Conclusions.** Our preliminary data indicate that we have identified promising compounds able to successfully interfere with QS signaling in *P. aeruginosa*. We expect that these molecules represent a fascinating starting point to identify and develop a brand of new chemical classes of QS inhibitors active in *P. aeruginosa* infections thus accomplishing one of the most important missions of the Italian CFF that is the patent of novel drugs for the treatment of lung infections in CF.

## L'alterazione dei segnali del quorum sensing di *Pseudomonas aeruginosa* nei pazienti con fibrosi cistica quale nuova frontiera di terapia antimicrobica

**Problema e ragioni dello studio.** Nonostante i progressi della terapia antibiotica, le infezioni polmonari sono a tutt'oggi la causa principale della compromissione della qualità di vita nei pazienti con fibrosi cistica. Il principale problema della terapia antibiotica è la rapida comparsa di batteri resistenti che rendono inefficaci i trattamenti. Un aspetto a lungo sottovalutato nelle infezioni delle vie respiratorie è il fatto che esse sono generalmente causate da più specie microbiche che agiscono in concerto, coordinando la loro azione mediante la produzione di segnali chimici. Questi segnali chimici, recepiti dalle diverse specie batteriche presenti, sono in grado sia di regolare la produzione di fattori di virulenza quali le tossine e gli enzimi che danneggiano i tessuti dell'ospite e creano un ambiente favorevole alla crescita dei patogeni.

**Obiettivi.** Questo progetto di ricerca mette assieme competenze interdisciplinari e si propone di indagare e ri-proporre molecole in grado di interferire con i segnali chimici scambiati tra i batteri per limitarne la capacità di danneggiare i tessuti dell'ospite. Questo approccio, rispettando il microbiota polmonare, consentirà alle specie batteriche residenti ma non patogene di prendere il sopravvento sui patogeni garantendo la presenza di una popolazione microbica normale nelle vie respiratorie.

**Metodi essenziali.** Nel corso di questo progetto, partendo dagli incoraggianti risultati preliminari già raccolti, saranno valutate molecole attive nella inibizione del quorum sensing di *Pseudomonas aeruginosa*, uno dei batteri maggiormente responsabili di complicanze nei soggetti con fibrosi cistica. Tali molecole saranno valutate mediante saggi molecolari e funzionali anche su ceppi batterici clinicamente rilevanti e isolati da soggetti che soffrono di fibrosi cistica.

**Risultati attesi.** Nel corso di questo progetto sarà quindi possibile identificare e testare una nuova classe di farmaci antibatterici il cui meccanismo di azione prevede l'inibizione dei segnali chimici tra i batteri patogeni. In questo modo contribuiremo anche a una delle più importanti missioni della FFC: sviluppare nuovi farmaci per un innovativo approccio terapeutico per le infezioni delle vie respiratorie.

## 48. New drug combinations against non-tuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis

Fattorini L<sup>1</sup>, Borroni E<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma, Dip. di Malattie Infettive, <sup>2</sup>Ospedale San Raffaele, Milano, Unità patogeni batterici emergenti (FFC#12/2020. New)



Lanfranco Fattorini, responsabile del progetto, ed Emanuele Borroni dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** Nontuberculous mycobacteria (NTM) can cause chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis (CF). *Mycobacterium abscessus* (Mab) and *M. avium-intracellulare* complex (MAC) are the most common species isolated. A major problem is that antibiotic therapy does not eradicate NTM infections despite being administered for long time periods. It has been hypothesized that NTM persist in biofilms within thickened alveolar walls of the airways of CF patients, in which oxygen depletion occurs. Hypoxia restricts NTM growth from actively replicating (AR), to dormant, nonreplicating (NR) stages, which are much less sensitive to drugs than AR cells (a, b).

**Rationale and objectives.** To combat NTM infections we need to find novel combinations containing current antibiotics and other drugs on the market, to kill both AR and NR cells, the latter living in biofilms. Killing of Mab and MAC by novel combinations is determined using *in vitro* models of AR, NR and biofilm conditions, all encountered in CF patients. After initial studies with few strains, the most promising combination/s will be tested against clinical isolates collected from CF patients characterized by Whole Genome Sequencing and other studies. The goal is to find at least 1 novel combination of currently used and repurposed drugs able to kill AR+NR cells, with the aim to shorten present therapies.

**Essential methods.** NR cells are obtained in the Wayne dormancy model set up in our laboratory to measure drug activity against NR *M. tuberculosis*. After drug exposure, killing of AR and NR cells is measured by viable counts (CFU/ml) and lack of regrowth in liquid medium (day-to-positivity in MGIT-960 system). Drug tested will be: clarithromycin (CLA), amikacin (AK), rifabutin, bedaquiline, tigecycline, singly and in combinations with  $\geq 1$  drug targeting anaerobic bacterial metabolism (e.g. the nitrocompounds metronidazole, niclosamide, nitazoxanide, pretomanid, delamanid, ornidazole, tinidazole, nimorazole, etc).

**Preliminary results.** In *M. avium*, the most active drugs against NR cells were AK and rifampin (RIF), while CLA showed little activity; the best drugs against AR cells were RIF, AK, CLA, linezolid, ethambutol. Setup of the Mab Wayne model is in progress.

**Conclusions.** We expect to find  $\geq 1$  novel sterilizing combination/s, to be tested in future studies in animal models, in order to shorten the long NTM therapies in CF.

## Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da micobatteri non tubercolari nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** I micobatteri non tubercolari (MNT) possono causare infezioni polmonari croniche in pazienti con fibrosi cistica (CF). *Mycobacterium abscessus* (Mab) e *M. avium-intracellulare* complex (MAC) sono le specie più isolate. Le terapie dei MNT sono lunghe e non sempre portano alla loro eradicazione. Si pensa che i MNT persistano nel biofilm all'interno delle pareti alveolari ispessite delle vie aeree dei pazienti CF, in cui si ha carenza di ossigeno. L'ipossia limita la replicazione dei MNT, che entrano in uno stato nonreplicativo (dormiente) molto meno sensibile agli antibiotici di quello replicativo (a, b).

**Ipotesi e obiettivi.** Per combattere le infezioni da MNT occorre trovare nuove combinazioni contenenti sia antibiotici in uso che altri farmaci, capaci di uccidere sia le forme in attiva replicazione (AR) che quelle non replicative (NR). L'uccisione di Mab e MAC viene determinata utilizzando modelli *in vitro* che mimano le fasi AR e NR e il biofilm, tutte riscontrate nei pazienti CF. Dopo studi iniziali con pochi ceppi, le combinazioni più promettenti saranno saggiate in stitipi isolati da pazienti CF caratterizzati mediante Whole Genome Sequencing e altri studi. L'obiettivo è trovare almeno 1 combinazione in grado di uccidere Mab e MAC in qualsiasi fase di crescita.

**Metodi essenziali.** Le cellule NR vengono ottenute mediante il modello di dormienza di Wayne messo a punto nel nostro laboratorio per misurare l'attività dei farmaci verso cellule NR di *M. tuberculosis*. Dopo l'esposizione ai farmaci, l'uccisione di cellule AR+NR sarà misurata mediante conte vitali (CFU/ml) e mancanza di ricrescita in mezzo liquido nel sistema MGIT-960. I farmaci saggiati saranno: claritromicina (CLA), amikacina (AK), rifabutina, bedaquilina, tigeciclina, da soli e in associazione con  $\geq 1$  farmaci inibenti il metabolismo batterico anaerobio (soprattutto i nitrocomposti metronidazolo, niclosamide, nitazoxanide, pretomanid, delamanid, ornidazolo, tinidazolo, nimorazolo, ecc.).

**Risultati preliminari.** In *M. avium*, i farmaci più attivi verso le cellule NR erano AK e rifampicina (RIF), mentre CLA era poco attiva; RIF, AK, CLA, linezolid, etambutolo erano attivi verso le cellule AR. La messa a punto del modello di Wayne per Mab è in corso.

**Conclusioni.** L'obiettivo è di trovare almeno 1 nuova combinazione che uccida Mab e MAC in qualsiasi fase di crescita, da saggiare in futuro in modelli animali, per una possibile sperimentazione clinica.



## 49. Can old and new sweet glycomimetics act as antibacterial and antibiofilm agents in the treatment of CF lung disease infections?

Guaragna A<sup>1</sup>, De Gregorio E<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università di Napoli Federico II (FFC#13/2020. New)



**Background, problem, hypothesis.** Irreversible lung damage, caused by progressive neutrophilic inflammation and chronic bacterial airway infections, is still the leading cause of morbidity and mortality in CF patients. In particular, bacteria, such as *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* complex, *A. xylosoxidans*, and non-tuberculous Mycobacteria, are able to rapidly evolve and develop protective biofilm that makes them resistant to the action of conventional drugs. Consequently, the identification of new therapeutic agents, with low or no toxicity and able to act as antimicrobials and/or antibiofilms against common bacterial CF pathogens, plays a fundamental role in the development of effective drugs for the treatment of lung disease in CF patients. In this context, it would be useful to be able to identify molecules that at the same time are able to act also as antivirulence agents by inhibiting the production of pathogenic toxins and other virulence factors that are the main responsible for the inability of the immune system to fight the infection.

**Rationale and objectives of the project.** The use of new glycomimetics (molecules whose structures mimic that of sugars) such as iminosugars, which are known to interfere with a plethora of biochemical processes, including inflammatory ones in CF disease, appears to be a promising therapeutic approach in CF. Some analogues of the iminosugar L-Miglustat have shown antimicrobial and antibiofilm activity, together with the ability to inhibit the expression of important virulence genes in *S. aureus*. The aim of the project is therefore to synthesize a small iminosugar library and to evaluate their pharmacological potential against common pathogens in CF disease. For the most promising candidate(s), *in vitro* studies will be performed to evaluate: a) cytotoxicity and apoptotic effects in CF bronchial cells; b) antimicrobial activity, as well as the ability to inhibit and/or eradicate the biofilm using a panel of bacteria (including resistant strains) and the ability to inhibit the production of virulence factors; c) a possible synergy with classes of common antibiotics; d) their potential to act as correctors of F508del-CFTR; moreover, e) the most active compound will be evaluated in mouse models of acute and chronic *S. aureus* infection and then validated in FC mice.

**Essential methods.** A multidisciplinary approach based on the experience of the various project participants in different fields such as organic chemistry, biochemistry, cell biology, immunology and *in vivo* infections will be used.

**Preliminary results.** Preliminary *in vitro* studies have shown that some iminosugar derivatives are able to inhibit the growth of *S. aureus*. One of the compounds showed an interesting, concentration-dependent bactericidal effect for *S. aureus* planktonic cells and also exhibited an additive effect in the presence of gentamicin and oxacillin with a methicillin-resistant *S. aureus* isolate. The same iminosugar at sub-inhibitory concentrations decreased *S. aureus*

biofilm formation and counteracted the expression of various *S. aureus* virulence factors, including toxins and crucial global regulators. These data associated with the previously observed anti-inflammatory effect (FFC#22/2015) of some other iminosugars suggest a potential use of these compounds as drugs capable of exerting a double action, the anti-inflammatory and the antimicrobial one.

**Conclusions.** The preliminary antimicrobial assays of the small library of iminosugars will allow the selection of the most effective derivative that will be evaluated in mouse models of acute and chronic infection and validated in CF mice. What we propose with the development of this project is the evaluation of the antibacterial potential, against CF respiratory infections, of compounds belonging to a class of molecules that has already shown interesting therapeutic activities in many other fields. The iminosugars, thanks to their structural similarity with natural sugars, are generally non-toxic compounds, water soluble and so easy to administer, essential requirements needed for the development of a possible drug.

### Studio del potenziale antimicrobico di glicomimetici iminosaccaridici nel trattamento di infezioni polmonari da fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Il danno polmonare progressivo ed irreversibile, causato da stati infiammatori e da infezioni batteriche croniche delle vie aeree, è ancora la principale causa di malattia e mortalità nei pazienti FC. In particolare, batteri, come *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* complex, *A. xylosoxidans* e micobatteri non tubercolari, sono in grado di evolversi rapidamente e di sviluppare un biofilm protettivo che li rende resistenti all'azione dei farmaci convenzionali. Di conseguenza, l'identificazione di nuovi agenti terapeutici, dotati di tossicità bassa o nulla ed in grado di agire come antimicrobici e/o antibiofilm contro i comuni patogeni batterici FC, occupa un ruolo fondamentale nello sviluppo di farmaci efficaci per il trattamento della malattia polmonare in pazienti FC. In questo ambito, sarebbe utile poter individuare molecole che siano in grado di agire allo stesso tempo anche come agenti antivirulenza andando a inibire la produzione di tossine patogene e altri fattori di virulenza che rappresentano i principali responsabili della incapacità del sistema immunitario di combattere l'infezione.

**Ipotesi e obiettivi.** L'uso di nuovi glicomimetici (molecole le cui strutture sono in grado di mimare quella degli zuccheri) quali gli imminozuccheri, che sono noti per essere in grado di interferire con una pletera di processi biochimici, inclusi quelli infiammatori nella malattia da FC, sembra essere un approccio terapeutico promettente nella FC. Alcuni analoghi dell'imminozucchero L-Miglustat hanno mostrato possedere attività antimicrobica e antibiofilm, insieme alla capacità di inibire l'espressione di importanti geni di virulenza in *S. aureus*. Lo scopo quindi del progetto è di sintetizzare una piccola libreria di imminozuccheri e di valutare il loro potenziale farmacologico contro patogeni comuni nella malattia FC. Una volta individuato il/i candidato/i più promettente/i verranno effettuati studi *in vitro* per valutare: a) la citotossicità e gli effetti apoptotici in cellule bronchiali FC; b) l'attività antimicrobica, nonché la capacità di inibire e/o eradicare il biofilm utilizzando un pannello di batteri (compresi ceppi resistenti) e la capacità di inibire la produzione di fattori di virulenza; c) un possibile sinergismo con classi di comuni antibiotici; d) la loro potenzialità di agire come correctori di F508del-CFTR; inoltre, e) il composto più attivo verrà valutato in modelli murini di infezione acuta e cronica da *S. aureus* e validato poi in topi FC.

**Metodi essenziali.** Verrà utilizzato un approccio multidisciplinare basato sull'esperienza, dei vari partecipanti al progetto, in diversi campi come la chimica organica, la biochimica, la biologia cellulare, l'immunologia e le infezioni *in vivo*.

**Risultati preliminari.** Studi preliminari *in vitro* hanno evidenziato che alcuni derivati iminosaccaridici sono in grado di inibire la crescita di *S. aureus*. Uno dei composti ha mostrato un interessante effetto battericida, concentrazione-dipendente, per cellule planctoniche di *S. aureus* e ha anche mostrato un effetto additivo



in presenza di gentamicina e oxacillina con un isolato di *S. aureus* resistente alla meticillina. Lo stesso imminozucchero a concentrazioni sub-inibitorie ha diminuito la formazione di biofilm di *S. aureus* e contrastato l'espressione dei diversi fattori di virulenza di *S. aureus*, comprese tossine e regolatori globali cruciali. Questi dati associati all'effetto antinfiammatorio precedentemente osservato (FFC#22/2015) di alcuni altri imminozuccheri suggeriscono un potenziale utilizzo di questi composti come farmaci in grado di esercitare una doppia azione, quella antinfiammatoria e quella antimicrobica.

**Conclusioni.** I saggi antimicrobici preliminari della piccola libreria di imminozuccheri permetteranno la selezione del derivato più efficace che sarà valutato in modelli murini di infezione acuta e cronica e validato in topi FC. Quello che ci si propone con lo sviluppo di questo progetto è la valutazione del potenziale antibatterico contro le infezioni respiratorie da FC di composti appartenenti ad una classe di molecole che ha già mostrato interessanti attività terapeutiche in altri ambiti. Gli imminozuccheri, grazie alla loro somiglianza strutturale con gli zuccheri naturali, sono composti generalmente non tossici e di semplice somministrazione, requisiti imprescindibili per lo sviluppo di un possibile farmaco.

## 50. Unravelling novel biomarkers to define the progression of *Mycobacterium abscessus* lung disease in cystic fibrosis

Gramegna A<sup>1</sup>, Tortoli E<sup>2</sup>, Saliu F<sup>2</sup>, Giannese F<sup>3</sup>, Lazarevic D<sup>3</sup>, Tonon G<sup>3</sup>, Aliberti S<sup>1</sup>, Blasi F<sup>1</sup>, Cirillo DM<sup>2</sup>, Lorè N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Milano; <sup>2</sup>IRCCS Ospedale San Raffaele, Emerging Bacterial Pathogens Unit, Milano; <sup>3</sup>IRCCS Ospedale San Raffaele, Centre for Omics Sciences, Milano. (FFC#23/2020. New)



Nicola Ivan Lorè, responsabile del progetto

**Background.** Nontuberculous mycobacteria (NTM) are ubiquitous environmental microorganisms causing opportunistic infections. NTMs have emerged as relevant pathogens in cystic fibrosis (CF) patients. The *Mycobacterium abscessus* complex is commonly isolated in the European CF population and CF patients with culture positivity for *M. abscessus* display heterogeneous clinical outcomes, ranging from asymptomatic colonization to severe *M. abscessus* – pulmonary disease (PD).

**Hypothesis and objectives.** *M. abscessus* infection is challenged by difficulties in providing a proper diagnosis, and by few therapeutic options once diagnosed. In addition, the factors predisposing toward the development of *M. abscessus* -PD and influencing disease progression remain unclear. Therefore, new biomarkers are urgently required to better define the different pulmonary disease stages in order to improve the decision-making processes associated with *M. abscessus* infection. In this project we aim at i) identifying pathologic contribution of *M. abscessus* clinical strains isolated from

CF patients; and ii) determining unique inflammatory response associated with *M. abscessus* pulmonary disease.

**Essential methods.** i) We will exploit a unique Italian bio-bank of *M. abscessus* clinical CF strains collected by a previous project FFC #27/2014 and available at the host unit of the PI. The bacterial cytotoxicity and immune response induced by these isolates will be tested in a cellular model of CF epithelia. ii) We will use biological samples from CF patients with or without *M. abscessus* pulmonary disease exploiting a prospective clinical study. We will apply the latest genomic technology approach called "Single Cells RNA sequencing" in order to determine novel biomarkers of disease progression.

**Expected results and spin-off.** This project will potentially identify novel biomarkers to improve the decision-making processes associated with NTM infection in CF patients. The results obtained in this project will be available for a future translation in CF clinics in order to better understand and define the different pulmonary disease stages during *M. abscessus* infections, with a potential widening to other NTM infections.

## Identificazione di nuovi marcatori biologici per la progressione della malattia polmonare indotta da *Mycobacterium abscessus* in fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** I micobatteri non tubercolari (NTM) sono microrganismi ubiquitari che possono essere isolati dall'ambiente e causare infezioni opportunistiche. Gli NTM sono emersi come patogeni rilevanti nella malattia della fibrosi cistica (FC). Gli NTM appartenenti al *Mycobacterium abscessus* complex, risultano essere tra i più comuni batteri presenti nella popolazione FC europea. I pazienti con positività alla coltura di *M. abscessus* mostrano esiti clinici eterogenei, che vanno dalla colonizzazione asintomatica alla grave malattia polmonare.

**Ipotesi e obiettivi.** È evidente che difficoltà di diagnosi e poche opzioni terapeutiche, rendano difficile il successo del trattamento dell'infezione da *M. abscessus*. Inoltre, i fattori che predispongono allo sviluppo e alla progressione della malattia polmonare associata a *M. abscessus* sono ancora da determinare. Pertanto, sono urgentemente necessari nuovi marcatori biologici per definire in modo dettagliato le diverse fasi della malattia polmonare al fine di migliorare i processi decisionali clinici di trattamento delle infezioni da *M. abscessus*. In questo progetto miriamo a identificare nuovi marcatori biologici i) definendo il contributo patologico dei ceppi clinici *M. abscessus* isolati da pazienti con FC; e ii) caratterizzando la risposta infiammatoria associata alla malattia polmonare da *M. abscessus*.

**Metodi essenziali.** Per scoprire questi biomarcatori i) sfrutteremo un modello cellulare epiteliale in vitro per valutare la potenziale diversa virulenza di ceppi clinici di *M. abscessus* ed ii) utilizzeremo campioni biologici da paziente per identificare nuovi biomarcatori utilizzando nuove tecniche di Omica (analisi che consentono la produzione di informazioni biologiche, in numero molto elevato e nello stesso intervallo di tempo. *n.d.r.*). Per quest'ultimo obiettivo in particolare sfrutteremo la tecnologia chiamata sequenziamento dell'RNA di singole cellule.

**Risultati attesi / Possibili ricadute.** I risultati ottenuti in questo progetto avranno un potenziale impatto nella realtà clinica FC definendo meglio le diverse fasi della malattia polmonare durante le infezioni *M. abscessus*, con un potenziale approccio traslazionale alle infezioni più generali degli NTM. Pertanto, il progetto mira a determinare nuovi marcatori biologici per migliorare i processi decisionali associati all'infezione da NTM nei pazienti con FC.

## 51. Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis animal models

Sipione B<sup>1</sup>, Marco D'aurora<sup>1</sup>, Colombi F<sup>1</sup>, Rossi G<sup>2</sup>, Sanvito F<sup>3</sup>, Cigana C<sup>1</sup>, Livraghi A<sup>4</sup>, Pedemonte N<sup>5</sup>, Bragonzi A<sup>1</sup>



Alessandra Bragonzi, responsabile del progetto di ricerca

<sup>1</sup>Infection and Cystic Fibrosis Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milano; <sup>2</sup>School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino, Matelica; <sup>3</sup>Pathological Anatomy Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano; <sup>4</sup>Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, The University of North Carolina at Chapel Hill, USA; <sup>5</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova. (FFC#2/2019. In progress)

**Background.** In humans, absence of CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion causes airway surface dehydration, which leads to mucus stasis, inflammation, infection and bronchiectasis. However, functional ablation of Cfr in mice has never produced an overt pulmonary phenotype. Since gene modifiers have been shown to modulate CF lung pathology, we leveraged the Collaborative Cross (CC) mice to recapitulate the allelic diversity of the human population and introduced delF508 Cfr mutation to generate new CF mice. IL72 CC line was selected for its extreme susceptibility to *P. aeruginosa* infection.

**Hypothesis and objectives.** The objectives of this project are to establish whether the host genetic background directly impacts: 1) distribution of airway mucus-secreting cells and the abundance of secreted mucus; 2) airway ion transport and expression of CFTR; and 3) airway mucus composition through modification of the host microbiome.

**Preliminary results.** Bronchial mucosa of wt-IL72 mice was characterized by a thin monolayer of epithelial cells with no mucus plugs as wt-C57Bl/6 at post-natal day 28. Unlike previous models in C57Bl/6 background, F508del mutation in IL72 exhibited major mucobstructive alterations in the lungs and trachea. Bronchial epithelium of F508del-IL72 mice was diffusely hyperplastic with multiple-layers of epithelial and goblet cells (GCs). A great amount of acidic-sialylated and intimately epithelial-adhering mucous was observed in the bronchi. The abundance of GCs differs between IL72 and C57Bl/6 mice indicating that host genetic background may influence cellular composition and predispose to lung phenotype. Genome sequence analysis showed that IL72 mouse strain has the NOD/ShiLtJ founder haplotype for the Cfr locus in chromosome 6, being F508del located in exon 11. Within Cfr locus, IL72 showed 1321 SNPs, of which the 53.8% are located in introns, 44 of which are unique to IL72 compared to other CC lines. When Cfr gene expression was tested, we showed that IL72 mice expressed two folds more Cfr in the trachea compared to C57Bl/6 mice, while similar levels of Cfr were detected in the lung.

**Conclusions.** These data support the role of host genetic on top of CFTR mutation as major contributor to CF pathology. New CF mouse model can lead basic and translational studies focused on disease mechanisms and causes of phenotypic variation.

## Correlare muco-microbiota-genotipo per definire nuovi modelli animali di fibrosi cistica

**Ragioni dello studio.** Nei pazienti con FC, il gene difettivo CFTR provoca una malattia polmonare principalmente caratterizzata da: disidratazione delle vie aeree, stasi di muco, infiammazione, infezioni e bronchiectasie. Ulteriori fattori critici che possono influenzare la gravità della patologia polmonare FC sono i geni modificatori di CFTR. I modelli animali FC di piccola taglia generati fino ad ora hanno mostrato minori alterazioni patologiche

nei polmoni. Nonostante nell'uomo vi siano evidenze che oltre a mutazioni in CFTR anche la diversità genetica individuale possa determinare una sostanziale variazione fenotipica, non sono stati generati modelli animali che replichino tali caratteristiche della popolazione umana. Sfruttando i topi Collaborative Cross (CC) per replicare le variazioni genotipiche/fenotipiche della popolazione umana abbiamo generato un nuovo modello murino con la mutazione CFTR-delF508.

**Ipotesi e obiettivo.** In questo progetto, stabiliremo se, come e in che misura il profilo genetico dell'ospite influisca: 1) sull'abbondanza e/o la composizione del muco delle vie aeree; 2) sul muco delle vie aeree attraverso la modulazione del trasporto ionico epiteliale; 3) impatti sul muco delle vie aeree attraverso l'alterazione del microbioma dell'ospite.

**Risultati attesi.** Diversamente dai modelli precedenti realizzati nel profilo genetico C57Bl/6, la mutazione F508del in topi CC della linea IL72 mostra alterazioni ostruttive nei polmoni e nella trachea con presenza di muco intimamente aderente all'epitelio. L'epitelio bronchiale dei topi F508del-IL72 appare iperplastico con più strati di cellule epiteliali e abbondanza di cellule calcificiformi con patofisiologia che mima quella umana. Questo dato indica che il profilo genetico dell'ospite può influenzare la composizione cellulare e predisporre al fenotipo polmonare. L'analisi della sequenza del genoma ha mostrato che il ceppo di topo IL72 presenta il locus Cfr nel cromosoma 6 e la mutazione F508del situato nell'esone 11. Nel Cfr sono stati evidenziati un grande numero di polimorfismi, alcuni dei quali esclusivi per il ceppo di topo IL72. Inoltre, abbiamo dimostrato che il livello di espressione del gene Cfr nella trachea e polmone è influenzato dal profilo genetico dell'ospite.

**Conclusioni.** Questi dati supportano il ruolo chiave del profilo genetico dell'ospite in aggiunta alla mutazione CFTR nel determinare la patologia FC. I nuovi modelli murini di FC possono contribuire a studi di base e traslazionali focalizzati sui meccanismi della malattia e sulle cause della variazione fenotipica.

## 52. Preclinical study of a combined host- and pathogen-directed approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against Mycobacterium abscessus infection

Poerio N<sup>1</sup>, Riva C<sup>2</sup>, De Santis F<sup>1</sup>, Cirillo DM<sup>2</sup>, Lucidi V<sup>3</sup>, Thaller MC<sup>1</sup>, De Angelis HL<sup>1,4</sup>, D'Andrea M<sup>1</sup>, Fraziano M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma; <sup>2</sup>Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milano; <sup>3</sup>Unità Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma; <sup>4</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università di Siena (FFC#21/2019. New)



Maurizio Fraziano, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** We have developed apoptotic body like liposomes (ABL) loaded with selected bioactive lipids able to enhance bactericidal innate immunity against multidrug resistant (MDR) pulmonary infections and to limit inflammatory

response. In addition, phage therapy is a promising strategy in the fight against MDR bacteria and may represent an additional therapeutic tool for their management.

**Rationale and objectives of the project.** The main aim of this project is the validation and optimization of a combined host- and pathogen- directed approach based on ABL carrying bioactive lipids and phages for the control of *Mycobacterium abscessus* (MA) infection.

**Essential methods.** Differentiated THP-1 cells (dTHP-1), used as a model of human macrophage, and primary macrophages derived by CF patients or by healthy donors (HD) treated or not with CFTR inhibitor, were *in vitro* infected or not with MA, and finally stimulated with selected liposome formulations. ABL efficacy was evaluated in terms of i) bacterial uptake, ii) ROS (Reactive Oxygen Species) production and iii) intracellular MA killing. The efficacy of treatment with selected liposome formulations was also evaluated in *in vivo* model of chronic infection with MA, in terms of leukocyte recruitment and pulmonary bacterial burden.

**Preliminary results.** Results show that *in vitro* stimulation with ABL of dTHP-1 promotes both MA internalization and intracellular killing and induce a significant ROS production. Moreover, treatment with liposome formulation is able to enhance intracellular mycobacterial killing in primary macrophages derived by CF patients or HD. Finally, the aerosolic treatment with selected ABL in the CF murine model of chronic MA infection induces a significant improvement in pulmonary mycobacterial clearance, associated to leukocyte recruitment reduction.

**Expected results and their significance.** Expected results will consist in the identification and purification of phages specific for MA, which will be associated with selected ABLs in order to design a novel host- and pathogen- directed combination therapy. This approach will be useful against MA infections in patients with CF and may represent the proof of concept for a novel therapeutic approach against MDR infections caused by different pathogenic bacteria.

## Studio pre-clinico di una strategia terapeutica combinata basata su liposomi bioattivi e batteriofagi contro le infezioni causate da *Mycobacterium abscessus*

**Problema e ragioni dello studio.** Abbiamo generato dei liposomi simili a corpi apoptotici (Apoptotic body like liposomes, ABL) caricati con lipidi bioattivi, in grado di potenziare la risposta antimicrobica innata nei confronti di batteri patogeni multifarmaco-resistenti (MDR) e limitare la risposta infiammatoria. Inoltre, le nuove terapie basate su batteriofagi possono rappresentare un ulteriore strumento terapeutico teso a fronteggiare l'emergenza di ceppi batterici antibiotico resistenti.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo principale di questo progetto è quello di validare *in vitro* ed *in vivo* un nuovo trattamento basato su ABL e batteriofagi per il controllo delle infezioni causate da *Mycobacterium abscessus* (MA) in pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC).

**Metodi essenziali.** Macrofagi di linea e macrofagi primari derivati da pazienti con FC o da donatori sani trattati o no con l'inibitore del CFTR, sono state infettate o meno con MA, e successivamente stimulate con gli ABL selezionati. L'efficienza degli ABL è stata valutata in termini di i) fagocitosi, ii) produzione di ROS ("Reactive Oxygen Species") e iii) uccisione batterica intracellulare. L'efficacia del trattamento è stata inoltre valutata in un modello *in vivo* di infezione cronica con MA in termini di attività micobattericida e reclutamento leucocitario.

**Risultati preliminari.** I nostri risultati preliminari mostrano che la stimolazione *in vitro* di macrofagi di linea promuove sia l'internalizzazione che l'uccisione intracellulare di MA e induce una significativa produzione di ROS. Inoltre, il trattamento con le formulazioni liposomiali è in grado di potenziare l'uccisione intracellulare di MA anche in macrofagi primari provenienti sia dai pazienti che dai controlli. In ultimo, i risultati *in vivo* mostrano che il trattamento aerosolico con gli ABL induce una forte diminuzione nella carica micobatterica polmonare, associata ad una diminuzione della risposta infiammatoria.

**Risultati attesi e loro significato.** I risultati attesi consistono nell'identificazione di una formulazione terapeutica che sia in grado da una parte di potenziare la risposta antimicrobica innata (tramite ABL), dall'altra di avere un effetto microbicida diretto sul patogeno (tramite batteriofagi specifici per MA). Questo approccio sarà utile contro le infezioni da MA in pazienti FC e potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica applicabile anche a infezioni sostenute da altri batteri patogeni multiresistenti.

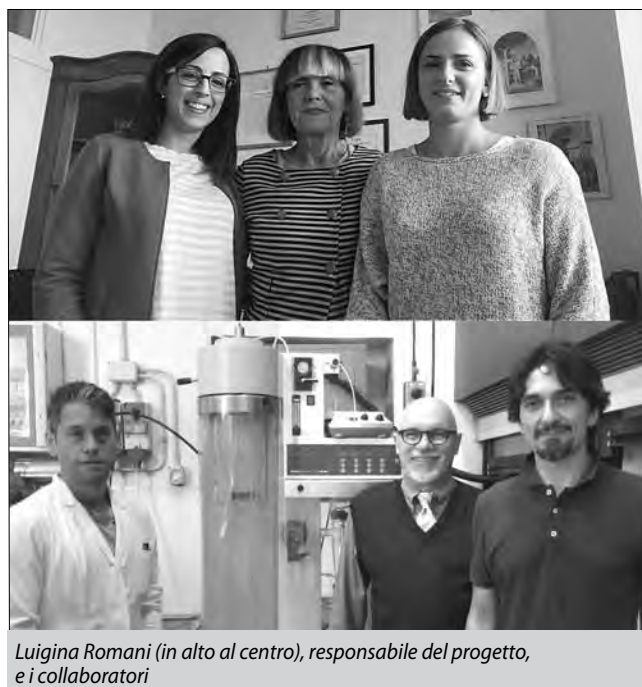
## INFLAMMATION IN CYSTIC FIBROSIS: WAITING FOR CLINICAL APPLICATIONS

### 53. Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis \*

Pariano M<sup>1</sup>, Puccetti P<sup>2</sup>, Borghi M<sup>1</sup>, Stincardini C<sup>1</sup>, Sforza L<sup>1</sup>, Renga G<sup>1</sup>, Costantini C<sup>1</sup>, Ricci M<sup>2</sup>, Giovagnoli S<sup>2</sup>, Romani L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine; <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Science, University of Perugia, Perugia, Italy (FFC#24/2018. Concluded)

**Background and rationale.** Chronic lung inflammation and infections contribute to disease progression in CF patients. Due to their ability to promote host/microbe homeostasis in the lung through the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), indoles may act as potential novel therapeutics in CF. The ability of AhR to modulate many aspects of the innate and adaptive immune response, including antimicrobial activity via Th17 cell activation, epithelial cell repair and protection via IL-22 production, and control of inflammation via activation of regulatory T cells (Treg) creates exciting opportunities to harness the immunomodulatory action of AhR to adapt host responses to infection. The indole-3-aldehyde (3-IAld), produced by endogenous Lactobacilli, has recently been shown to preserve immune physiology at mucosal surfaces while inducing antimicrobial resistance. Much like probiotics, this microbial-derived



Luigina Romani (in alto al centro), responsabile del progetto, e i collaboratori



metabolite protected mice from infection and immunopathologies in different experimental settings.

**Hypothesis and objectives.** The aim of the present project was the therapeutic exploitation of 3-IAld for tissue immune homeostasis, microbial symbiosis and pathogen resistance in CF. To this purpose, we have: i) developed a dry powder formulation of 3-IAld for drug delivery through inhalation; ii) performed murine preclinical studies to define the safety and the immunological and antimicrobial profile of aerosolized 3-IAld in CF.

**Essential methods.** The project included murine studies consisting of i) development of 3-IAld inhalable dry powder for pulmonary drug delivery and assessment of pharmacokinetics in CF mice; ii) in vivo studies in mice with the  $\Delta 508$  mutation.

**Results.** Our results showed that AhR activity is defective in CF but restored upon appropriate prophylactic treatment with inhalable 3-IAld. As AhR agonist, 3-IAld exerted beneficial effects in the lung of mice with aspergillosis by decreasing inflammation and restoring immunocompetence.

**Conclusions.** Should AhR agonism prevents or delays development of pathogenic inflammation in CF, our study represents a patentable, proof-of-concept demonstration, that targeting AhR may have therapeutic utility in CF.

## Uso e sviluppo di derivati indolici per via inalatoria quali attivatori del recettore AhR nella fibrosi cistica

**Ragioni dello studio.** Combattere le infezioni e diminuire l'infiammazione cronica a livello polmonare sono interventi necessari nel paziente con fibrosi cistica. Per questo l'aumento della resistenza agli antibiotici nonché la tossicità legata alla somministrazione cronica dei farmaci anti-infiammatori possono rappresentare un serio problema. Questo progetto vuole portare un contributo nuovo in questa direzione. Infatti, proponiamo uno studio sulle proprietà anti-infiammatorie ed antimicrobiche di un derivato indolico chiamato indolo-3-aldeide (3-IAld). Gli indoli sono sostanze endogene di derivazione microbica di cui sono note le proprietà antimicrobiche, non associate a resistenza, nonché regolatrici della funzionalità mucosale. Da qui il crescente interesse allo studio di tali sostanze, chiamate più generalmente "postbiotici", finalizzato ad un loro possibile utilizzo in ambito terapeutico, quali possibili sostituti di probiotici.

**Ipotesi e obiettivi.** Avendo 3-IAld già dimostrato effetti benefici in modelli sperimentali di allergia polmonare nonché potenti attività antimicrobiche nei riguardi di diverse specie batteriche, in questo progetto abbiamo già valutato l'efficacia di 3-IAld in modelli preclinici di CF ed abbiamo sviluppato la formulazione farmaceutica per via inalatoria pronta per essere saggiata in ulteriori studi in vivo ed in vitro.

**Metodi essenziali.** Stiamo utilizzando approcci sperimentali sia in vitro che in vivo in topi con la mutazione F508.

**Risultati.** I risultati hanno mostrato che 3-IAld ha significativamente migliorato la patologia infiammatoria in modelli sperimentali di CF attraverso l'attivazione del recettore degli idrocarburi arilici (AhR), noto per regolare l'omeostasi immunologica polmonare.

**Conclusioni.** Le possibili ricadute di questo studio potrebbero essere molteplici e di natura sia traslazionale (possibile ed ovvio sviluppo terapeutico di derivati indolici, possibile determinazione dei livelli di 3-IAld in matrici biologiche quali fattori predittivi di malattia) che culturale, come lo sviluppo di postbiotici quali farmaci "innovativi" grazie alla loro intrinseca capacità di regolare sia l'ospite (infiammazione) che i suoi microbi (virulenza).

## 54. Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of $\beta$ -sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-miglustat \*

Dehecchi MC<sup>1</sup>, Guaragna A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Neuroscienze, Bimedica e Movimento – Sez. Biochimica Clinica, Università di Verona; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II (FFC#20/2019. Concluded)



Maria Cristina Dehecchi, responsabile del progetto, e Annalisa Guaragna dell'unità partner

**Background, problem, hypothesis.** New CFTR modulators will have a positive impact on CF care over the coming years. However, considering that clinical response to modulators is limited when lung damage is already established and scarce changes of inflammatory markers following treatments with CFTR modulators have been found, research on new anti-inflammatories and antibiotics remains a priority in CF care. Thanks to previous FFC grants we described two promising molecules: beta-sitosterol (BSS) and miglustat that have been widely tested for efficacy and safety in clinical pharmacology.

**Rationale and objectives of the project.** BSS reduced the amounts of bacteria recovered in the airways of mice after acute infection by *P. aeruginosa*. Decreased neutrophils recruited in broncholavage (BAL) accompanied by improvement of health status was observed in BSS treated mice. On the other hand, L-enantiomer of miglustat produced an anti-inflammatory effect in mice acutely infected by *P. aeruginosa* without increasing the bacterial load or inducing toxicity. This project was aimed to evaluate the effect of BSS and L- miglustat in relevant murine models of chronic lung infection.

**Essential methods.** BSS is commercially available whereas L-miglustat was synthesized and purified by A. Guaragna (Department of Chemical Sciences, University of Napoli Federico II- Napoli, Italy). BSS and L-miglustat were evaluated in wt mice chronically infected by *P. aeruginosa*. Mice were treated with BSS or L- miglustat by gavage before infection and their effect on inflammatory response was tested in terms of: i) safety; ii) lung inflammation; iii) ability of mice to clear bacteria. The antimicrobial and anti-biofilm activity of L- miglustat against clinical isolates of *P. aeruginosa* in vitro was also tested.

**Results.** BSS reduced both neutrophils recruited in BAL and bacteria recovered in the airways of mice after chronic infection by *P. aeruginosa* and increased bacterial clearance, thus confirming that it could be effective to control CF lung inflammation. A dose-dependent anti-inflammatory and anti-infective effect was observed in mice treated with L-miglustat before established chronic infection. L-Miglustat did not exert any appreciable growth inhibition of *P. aeruginosa* isolates up to the concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and did not improve the effectiveness of tobramycin, ciprofloxacin and amikacin. Sub-inhibitory concentrations of L-miglustat were not able to reduce biofilm formation of both *P. aeruginosa* RP73 and 90224 strains, thus excluding any antimicrobial or anti-biofilm activity. These data suggest that L-miglustat could facilitate key host defenses playing protective role against respiratory infection.

**Conclusions.** This pre-clinical study strengthens the anti-inflammatory and anti-infective properties of BSS and L-miglustat and provides a proof of concept for planning clinical trials. BSS and L- miglustat could obtain an orphan drug designation as anti-inflammatory/anti-infective agents against chronic *P. aeruginosa* infections.

## Studio di trattamenti anti-infiammatori per la patologia polmonare della fibrosi cistica, in modelli murini di infezione delle vie aeree: approfondimenti sull'effetto anti-infiammatorio del beta-sitosterolo e sull'attività anti-infiammatoria/anti-infettiva del L-miglustat

**Problema e ragioni dello studio.** Nei prossimi anni i nuovi modulatori di CFTR avranno un impatto positivo nella cura dei pazienti FC. Tuttavia, poiché la risposta clinica ai nuovi farmaci è limitata in presenza di un danno polmonare già presente e vi sono scarsi miglioramenti dell'infiammazione polmonare nei pazienti trattati, la ricerca di nuovi anti-infiammatori e anti-microbici rimane prioritaria. Grazie a precedenti finanziamenti da FFC abbiamo identificato due molecole promettenti: beta-sitosterolo (BSS) e l'enantiomero L del miglustat. Entrambe le molecole hanno mostrato un interessante effetto anti-infiammatorio in modelli murini di infezione polmonare acuta.

**Ipotesi e obiettivi.** Considerando che BSS e miglustat sono stati ampiamente studiati in farmacologia clinica e se ne conosce l'efficacia e la sicurezza, una strategia di riposizionamento verso l'infiammazione polmonare FC potrebbe portare alla luce un trattamento efficace per questi pazienti. Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare gli effetti anti-infiammatori e anti-infettivi del BSS e del L-miglustat in modelli murini di infezione polmonare cronica.

**Metodi essenziali.** Il BSS è disponibile commercialmente e L-miglustat è stato sintetizzato, purificato e caratterizzato nel laboratorio della professoressa A. Guaragna. BSS e L-miglustat sono stati studiati in topi wt con infezione cronica da *P. aeruginosa*. I topi sono stati trattati con le due molecole prima dell'infezione e il loro effetto è stato valutato in termini di sicurezza, efficacia nel ridurre l'infiammazione polmonare e capacità nel contrastare l'infezione. L'attività anti-microbica e anti-biofilm di L-miglustat contro isolati clinici di *P. aeruginosa* è stata indagata *in vitro*.

**Risultati.** BSS riduce il numero di granulociti neutrofilici e batteri nelle vie aeree dei topi con infezione cronica e aumenta la "clearance" batterica, confermando così che potrebbe rappresentare un trattamento efficace per controllare l'infiammazione polmonare FC. In topi trattati con L-miglustat abbiamo osservato una riduzione dosaggio-dipendente sia dell'infiammazione che dell'infezione batterica. D'altra parte, L-miglustat non inibisce la crescita di isolati clinici di *P. aeruginosa* e non presenta alcun sinergismo con gli antibiotici convenzionali; inoltre, non ha mostrato alcuna attività anti-biofilm *in vitro*, escludendo così una possibile attività antibatterica. Questi dati suggeriscono che L-miglustat potrebbe facilitare i meccanismi di risposta immunitaria e proteggere l'organismo contro le infezioni respiratorie.

**Conclusioni.** Questo studio pre-clinico rafforza le proprietà anti-infiammatorie e anti-infettive, precedentemente osservate, del BSS e di L-miglustat e fornisce una prova di principio su cui impostare studi clinici futuri. Queste due molecole potrebbero ottenere la designazione di farmaci orfani come agenti anti-infiammatori/anti-infettivi contro l'infezione cronica da *P. aeruginosa*.

## 55. Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus-bacteria interactions in fibrosis cystic patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy \*

Antonelli G<sup>1</sup>, Scagnolari C<sup>1</sup>, Pierangeli A<sup>2</sup>, Trancassini M<sup>3</sup>, Pietropaolo V<sup>3</sup>, Bitossi C<sup>1</sup>, Palange P<sup>3</sup>, Cimino G<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, La Sapienza Roma; Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I; <sup>2</sup>Dip. Medicina Molecolare, Università La Sapienza, Roma; <sup>3</sup>Dip. Sanità Pubblica e Malattie infettive, Università La Sapienza, Roma; <sup>4</sup>Centro Fibrosi Cistica, Policlinico Umberto I, Roma (FFC#14/2018. Concluded)



Guido Antonelli, responsabile del progetto

**Background and rationale.** The host prolonged inflammatory status in cystic fibrosis (CF) lung disease has long been recognized as a key pathological feature and a central therapeutic target. As part of innate immunity, type I and III interferon (IFN) response might be one of the causes of an overly exuberant inflammatory response, perpetuated by viral and bacterial infection.

**Hypothesis and objectives.** Since the evaluation of respiratory viruses prevalence on CF disease requires further investigation and considering that the virus-bacteria coinfection may contribute to a chronic inflammatory response, we sought to analyze the rate of respiratory viruses infection and the IFN signature in CF patients.

**Essential methods.** Respiratory samples collected from CF patients enrolled at the regional reference center of Cystic Fibrosis at Sapienza University Hospital "Policlinico Umberto I" were tested for canonical microbiological investigation and for respiratory viruses detection through RT-PCR method (Flu-A, RSV, HRV, hMPV, hCoV) including the novel SARS-CoV-2 and MCPyV. Evaluation of the expression of genes of the IFN-pathways and innate immunity receptors was performed by Real time PCR.

**Results.** We examined the incidence of respiratory viruses in 265 patients who attended the CF center from November 2019 to March 2020. Ninety-five patients (36%) were positive to one or more viruses: HRV was the most frequently detected (58.9%), followed by RSV (11.6%), and FluA (10.5%). No SARS-CoV-2 positive result was identified. HRV detection was associated with the occurrence of pulmonary exacerbations in 20% of CF patients analyzed. Only Flu-A is associated with hospitalization. In addition, MCPyV was tested in the upper respiratory tract of 249 CF patients. MCPyV DNA was detected in 65 out of 249 samples analyzed (26%), higher than what is reported for individuals not affected by CF (0.8%). Our data point out that MCPyV detection was significantly associated with the presence of *S. aureus*. Since HRV is the more frequent respiratory virus in CF patients, we investigated whether HRV infection may alter the expression of toll like receptors (TLRs), involved in microbial recognition and HRV detection, in the airway environment of CF patients. Expression of TLRs was compared between 55 HRV infected patients and 55 HRV negative CF patients. Results showed that HRV infected patients express higher levels of TLR2 and TLR4 compared to HRV negative ones. Increased expression of TLR2 and TLR4 correlated with high level of HRV viral load. Moreover, HRV positive patients coinfecting with *S. aureus* or *P. aeruginosa* had enhanced amounts of TLR2, TLR4, TLR8 and TLR9-mRNAs.

**Conclusions.** Our results highlight that the synergic prolonged virus-bacteria coinfection in CF patients contributes to a dysregulated IFN-I response affecting immunopathogenesis and disease progression.

## Studio ex vivo sulla risposta dell'interferon di tipo I/III e sull'interazione virus-batteri nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica: un nuovo approccio nello sviluppo di strategie terapeutiche alternative

**Ragioni dello studio.** Gli interferon di tipo I e III (IFN) sono coinvolti principalmente nella difesa antimicrobica e nell'induzione di una risposta infiammatoria, ma sembrano esercitare anche



un ruolo negativo nel controllo di alcune infezioni respiratorie. Il profilo di espressione dell'IFN nei pazienti FC rimane tuttavia ancora poco caratterizzato.

**Ipotesi e obiettivi.** Benché associati a episodi di esacerbazione polmonare, il ruolo dei virus in FC rimane ad oggi ancora poco indagato. L'ipotesi del progetto è che l'attivazione del pathway dell'IFN, stimolata da infezioni virali e batteriche prolungate, giochi un ruolo decisivo nel controllo della risposta immunitaria.

**Metodi essenziali.** Per i nostri studi sono stati raccolti i campioni respiratori di pazienti afferenti al Centro di riferimento FC dell'Ospedale Policlinico Umberto I di Roma. Oltre ai tradizionali metodi di indagine microbiologica, il rilevamento e la quantificazione di diversi virus respiratori (Flu-A, RSV, HRV, hMPV, hCoVs incluso SARS-CoV-2, e MCPyV) sono stati eseguiti mediante tecniche di PCR. Il profilo di espressione genica del pathway degli IFN e dei recettori dell'immunità innata è stato esaminato mediante Real time PCR.

**Risultati preliminari.** L'incidenza delle infezioni virali respiratorie è stata indagata in 265 pazienti visitati presso il centro FC tra Novembre 2019 e Marzo 2020. Il 36% dei pazienti è risultato positivo a uno o più virus: HRV (Rhinovirus Umano, il più frequente, 58.9%), seguito da RSV (Virus Respiratorio Sinciziale, 11.6%), e FluA (Virus Influenza A, 10.5%). Nei campioni respiratori analizzati non è stata rilevata la presenza di SARS-CoV-2. Il 20% dei pazienti positivi a HRV era in riacutizzazione, mentre solo l'infezione da Flu-A si associa ad ospedalizzazione. Inoltre, al fine di acquisire nuove conoscenze su MCPyV come virus del tratto respiratorio, abbiamo studiato la prevalenza e l'epidemiologia del virus in 249 pazienti FC. I principali risultati ottenuti dalla ricerca indicano un'elevata positività al virus (26%) nei campioni respiratori dei pazienti FC, in particolare in quelli con una infezione da *S. aureus*. Per comprendere se l'infezione da HRV, il più comune dei virus respiratori in FC, possa alterare l'espressione dei toll like receptors (TLRs), recettori dell'immunità innata coinvolti nel pathway degli IFN, abbiamo analizzato l'espressione genica dei TLRs in 55 pazienti FC HRV positivi e in 55 negativi. I pazienti con infezione da HRV presentano livelli più elevati di TLR2 e TLR4. Inoltre, un'espressione maggiore di TLR2 e TLR4 correla con una carica virale più elevata. I livelli dei TLRs sembrano variare anche in funzione delle specie batteriche, *S. aureus* e/o *P. aeruginosa*, che colonizzano il tratto respiratorio dei pazienti FC.

**Conclusioni.** I nostri risultati evidenziano come le infezioni virali e batteriche nei pazienti FC contribuiscano a modificare l'ambiente respiratorio generando, tramite modulazione della risposta IFN, uno stato infiammatorio alterato.

## 56. Off-target effects of CFTR-modulators in pre-clinical infection models \*

Alcalá-Franco B, Giannella R, Mancini G, Caslini C, D'Aurora M, Bragonzi A, Cigana C

Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano (FFC#15/2018. Concluded)

**Background and rationale.** CFTR-modulators are increasingly proving to ameliorate outcomes in individuals with CF. However, their use is associated with markedly variable response. Recently, CFTR-modulators have been shown to possess *in vitro* CFTR-independent activities, including an antibacterial profile.

**Hypothesis and objectives.** We aim to define whether, how and to what extent CFTR-modulators have an antibacterial effect - alone or in combination with standard treatments - and/or impact on host response/defense.

**Essential methods.** A bio-bank of longitudinal isolates recovered from CF patients was *in vitro* tested for susceptibility to CFTR-modulators alone or in combination with antibiotics by minimum inhibitory concentration and checkerboard assays. CFTR expression was quantified by western blot in CF bronchial epithelial cells treat-



Cristina Cigana, responsabile del progetto

ed with exoproducts of bacterial isolates previously incubated with CFTR-modulators. Pharmacokinetics of ivacaftor, administered by intraperitoneal route, was evaluated in mice infected or non-infected with *P. aeruginosa*.

**Results.** Ivacaftor and lumacaftor inhibited *S. aureus* growth, demonstrating a direct antibacterial activity, but were ineffective against *P. aeruginosa*. In addition, they synergized with several antibiotics anti-*P. aeruginosa* and anti-*S. aureus*. In contrast, tezacaftor showed minimal or no antimicrobial activity, even when associated with antibiotics. Furthermore, we demonstrated that CFTR-modulators modify *P. aeruginosa* virulence, decreasing its inhibitory activity against CFTR. Pharmacokinetic analysis showed that ivacaftor distributes more readily to airway epithelial lining fluid than plasma in mice. Interestingly, *P. aeruginosa* infection increases exposure to ivacaftor, potentially affecting efficacy.

**Conclusions.** Overall, our findings showed that CFTR modulators have antimicrobial activity and can synergize with standard antibiotics against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In addition, they are able to reduce *P. aeruginosa* virulence, reducing its negative impact on the expression of CFTR. These results will be instrumental in implementing guidelines and in the provision of specific recommendations for the use of CFTR-modulators, alone or in combination with other therapies, in CF patients chronically infected by *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

## Effetti non CFTR-dipendenti dei modulatori di CFTR in modelli preclinici di infezione polmonare

**Ragioni dello studio.** Sebbene i farmaci modulatori di CFTR abbiano una grande potenzialità di migliorare lo stato di salute nei soggetti con FC, la risposta clinica è molto variabile. A tal proposito, recenti dati sperimentali suggeriscono che i modulatori di CFTR abbiano anche attività indipendenti dalla proteina stessa.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro obiettivo è definire se i modulatori di CFTR abbiano un effetto antibatterico, da soli e/o in combinazione con antibiotici usati in clinica, o se abbiano un impatto, indipendente dall'attività di correzione della CFTR, sulla risposta dell'ospite.

**Metodi essenziali.** Una biobanca di ceppi batterici da FC è stata testata *in vitro* per indagare la loro suscettibilità ai modulatori di CFTR (ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor), da soli e/o in combinazione con gli antibiotici più frequentemente usati in clinica. In seguito, è stata valutata l'espressione di CFTR mediante western blot in cellule epiteliali bronchiali FC trattate con i soprannati dei terreni di cultura di ceppi cresciuti in presenza dei modulatori. Infine, è stato condotto uno studio di farmacocinetica dell'ivacaftor per valutare la concentrazione effettiva nelle vie aeree in presenza o meno di infezione polmonare.

**Risultati.** Ivacaftor e lumacaftor sono in grado di inibire la crescita di *S. aureus* di per sé, dimostrando un'attività antibatterica diretta, ma tale risultato non si osserva in *P. aeruginosa*. Nonostante ciò, entrambi i modulatori sono in grado di incrementare l'efficacia di diversi antibiotici anti-*P. aeruginosa* e anti-*S. aureus*. Tezacaftor, al contrario, ha mostrato minima o nulla attività antimicrobica, anche se associato ad antibiotici. Inoltre, i modulatori hanno anche



la capacità di modificare la virulenza di *P. aeruginosa*, diminuendo la sua attività inibitoria nei confronti di CFTR. Infine, lo studio di farmacocinetica ha evidenziato come l'infezione può modulare la concentrazione dell'ivacaftor nelle vie aeree murine.

**Conclusioni.** Nel corso di questo progetto, abbiamo dimostrato che i modulatori di CFTR hanno un'attività antimicrobica e possono potenziare antibiotici standard contro *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Inoltre, sono in grado di diminuire la virulenza di *P. aeruginosa*, riducendone l'impatto negativo sull'espressione di CFTR. Questi risultati potranno essere trasferiti in ambito clinico, migliorando le linee guida per l'uso dei modulatori di CFTR e generando raccomandazioni per le combinazioni con antibiotici.

## 57. Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-directed approach to fight bacterial infections in Cystic Fibrosis

Piacentini M

Università di Roma Tor Vergata, Dip. di Biologia (FFC#15/2020. New)



Mauro Piacentini (al centro), responsabile del progetto

**Background/Rationale.** Bacterial infections play a pivotal role in infectious disease, such as cystic fibrosis (CF). Innate immunity is the first line of defence to fight microbial pathogens and the STING signalling is the main host pathway that triggers the immune response upon infections. STING is activated upon bacterial infection and has a major role on the induction of type I interferons (IFN1) [1]. The action of IFN1 in host defence against bacteria may be beneficial or not depending on the type of infection. We have recently shown that genetic and pharmacologic inhibition of Transglutaminase 2 (TG2), a multifunctional enzyme that catalyzes post-translational modifications of proteins, results in an enhanced anti-microbial response. Indeed, TG2 KO mice affected by CF, exhibited an improved clearance of *P. aeruginosa* [2-4].

**Rationale and Objectives.** The goal of this project is to dissect out the role of STING signaling in CF models with the aim to find new possible targets to develop host-directed therapies (HDTs). Sputum samples from CF patients, carrying different mutations, will be used to identify the present bacterial strains. Primary nasal epithelial cells, from the same CF patients, will be collected to characterize alterations in the STING pathway. We will also elucidate TG2 dependent regulation of STING pathway in CF mouse models infected with pathogens typically affecting cystic fibrosis patients (*P. aeruginosa* and Mabs) correlating the infection outcome levels with alterations in STING signalling.

**Essential methods.** Whole-blood, sputum and nasal epithelial cells will be collected from CF patients. STING regulators will be analysed by measuring both protein-protein interaction and protein phosphorylation. CF mouse models will be used for in vivo and ex vivo infections.

**Preliminary results.** Our preliminary results indicate that TG2 inhibition prevents the growth of Mabs, a significant pathogen in CF.

Interestingly, we found that TG2 regulates STING signalling promoting expression of IFN1.

**Conclusions.** We propose to correlate STING activation to the pathogenic properties of significant pathogens in CF. This approach should allow us to define new targets to manipulate immune responses in CF enhancing host cell response. The use of antibiotics has played a major role in the increasing median survival of CF patients, however, alternative therapies are required to overcome microbial resistance. In this scenario, the development of HDTs is a new and promising approach to modulate specific host immune pathways with the aim to limit bacterial infections.

## Utilizzare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Le infezioni batteriche svolgono un ruolo fondamentale nelle malattie infettive, come la fibrosi cistica (FC). Il sistema immunitario è la prima linea di difesa per combattere i patogeni e la proteina STING è il principale fattore che innesca la risposta immunitaria contro le infezioni. STING si attiva in caso di infezione batterica e ha un ruolo importante nell'induzione dell'interferone di tipo I (IFN1). L'azione dell'IFN1 nella difesa dell'ospite contro i batteri può essere benefica o meno a seconda del tipo di infezione. Abbiamo recentemente dimostrato che l'inibizione della transglutaminasi 2 (TG2), un enzima multifunzionale che modifica altre proteine, provoca una risposta anti-microbica potenziata. Infatti, topi che non hanno la TG2 e affetti da FC, mostrano una migliore eliminazione di *P. aeruginosa*.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo di questo progetto è analizzare il ruolo di STING, correlato a specifiche infezioni batteriche, nei modelli di FC con l'obiettivo di sviluppare terapie specifiche per l'ospite (Host-Directed Therapies, HDT). Proponiamo un piano volto a correlare l'attivazione di STING alle proprietà patogene di batteri presenti nella FC. Campioni di sputum di pazienti con FC, portatori di mutazioni diverse, verranno utilizzati per identificare i ceppi batterici presenti. Le cellule epiteliali nasali primarie, provenienti dagli stessi pazienti, saranno raccolte per caratterizzare alterazioni in STING. Studieremo anche la regolazione TG2 dipendente di STING nei modelli di topo con FC infettati da agenti patogeni tipicamente presenti nei pazienti con fibrosi cistica, correlando i livelli dell'infezione con alterazioni nell'attivazione di STING.

**Metodi essenziali.** Campioni di sangue, sputum e cellule epiteliali nasali verranno prelevati da pazienti con FC. I regolatori di STING saranno analizzati nei modelli umani e nei modelli murini infettati con patogeni tipici della FC.

**Risultati preliminari.** I nostri risultati preliminari confermano queste evidenze anche contro i micobatteri non tubercolari come Mabs, un patogeno presente nei pazienti con FC. Inoltre, abbiamo scoperto che la TG2 regola STING promuovendo l'espressione di IFN1.

**Conclusioni.** Questo approccio ci consentirà di utilizzare STING come obiettivo per manipolare le risposte immunitarie nella FC. L'uso di antibiotici ha svolto un ruolo importante nella sopravvivenza dei pazienti con FC. Tuttavia, sviluppo di HDT è un nuovo e promettente approccio per modulare specifici percorsi immunitari dell'ospite con l'obiettivo di limitare le infezioni batteriche.

## 58. Exploring the dual targeting of host and microbial sphingosine-1-phosphate lyase as anti-fungal strategy in cystic fibrosis

Costantini C<sup>1</sup>, Pariano M<sup>1</sup>, Pampalone G<sup>1</sup>, Zelante T<sup>1</sup>, Macchioni L<sup>1</sup>, Bellet MM<sup>1</sup>, Giovagnoli S<sup>2</sup>, Romani L<sup>1</sup>, Cellini B<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Perugia;  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università of Perugia  
(FFC#16/2020. New)



Barbara Cellini, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** Fungal infections represent a significant health problem in cystic fibrosis (CF) patients, and *Aspergillus fumigatus* is the most common fungal species associated with pulmonary exacerbations. Current drugs are directed against fungi-selective components and proved ineffective in some clinical settings, thus prompting for the development of novel therapeutic targets. In particular, the possibility to target a common pathway in the host and the fungus with opposite functional outcomes may provide a unique opportunity to increase the resistance to infection.

**Rationale and objectives of the project.** The pyridoxal phosphate-dependent enzyme sphingosine-1-phosphate lyase (SPL) is involved in the catabolism of sphingosine-1-phosphate (S1P) in man and microbes. CF patients suffers from multiple defects in the sphingolipid metabolism that are associated with lung inflammation and susceptibility to infection. Administration of an SPL inhibitor to a mouse model of CF ameliorated inflammation in response to an inflammatory challenge. On the contrary, elevation of S1P levels is toxic in fungi. Therefore, the objective of the project is the identification of inhibitors that work efficiently against both the host and *Aspergillus* SPL to promote a more effective antifungal response.

**Essential methods.** We will purify human, murine and fungal SPL from bacterial sources and test known SPL inhibitors for their efficacy in the dual targeting of host and pathogen SPL. We will then resort to *in vitro* and *in vivo* models to evaluate the ability of the inhibitors to restrain fungal growth and increase anti-fungal resistance. In particular, we will use *in vitro* cultures of *Aspergillus*, human bronchial epithelial cells from CF patients challenged with *Aspergillus* conidia, and a murine model of CF with aspergillosis.

**Results.** A known SPL inhibitor, potentially able to bind *Aspergillus* SPL by *in silico* modelling, partially inhibited the growth of the fungus in *in vitro* cultures and reduced fungal colonization and lung pathology in a CF mouse model.

**Conclusions.** The identification of an SPL inhibitor able to restrain fungal growth and increase anti-fungal resistance by binding to fungal and host SPL, respectively, is expected at the end of the project, with the potential for further optimization in future studies.

## Blocco della sfingosina-1-fosfato liasi nel paziente e nel fungo come strategia antifungina nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** L'infezione da parte di funghi come *Aspergillus fumigatus* può avere effetti gravi in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). I farmaci attualmente utilizzati per il trattamento di infezioni fungine mostrano una ridotta efficacia in alcune situazioni cliniche. Pertanto, lo sviluppo di nuovi farmaci rappresenta una priorità per i pazienti con FC.

**Ipotesi e obiettivi.** La nostra ipotesi è lo sviluppo di un possibile farmaco a doppia azione. Da un lato, migliorare le difese dei pazienti con FC per aumentarne la capacità di resistere alle infezioni da parte di funghi. Dall'altro lato, limitare la capacità del fungo di causare una infezione nel paziente. Una proteina chiamata sfingosina 1-fosfato liasi (SPL), che partecipa al metabolismo di una classe di lipidi chiamati sfingolipidi, è presente sia nell'uomo che nel fungo e potrebbe rappresentare un bersaglio per questo

tipo di farmaco. Infatti, da un lato i pazienti con FC presentano diversi difetti nel metabolismo degli sfingolipidi e, in un modello sperimentale, si è visto che bloccando SPL si riduce l'infiammazione. Dall'altro lato, l'inibizione di SPL è tossica per il fungo. Quindi, individuare un farmaco in grado di bloccare SPL sia nell'uomo che nel fungo avrebbe le potenzialità di migliorare la risposta immunitaria del paziente e contemporaneamente indebolire il fungo.

**Metodi essenziali.** In questo progetto verranno utilizzati diversi modelli per stabilire che cosa succede bloccando la proteina SPL. Partiremo da composti che sono già noti per la loro capacità di inibire SPL nell'uomo e nel topo e li valuteremo sulla proteina SPL purificata di origine umana, murina o fungina. Poi valuteremo gli effetti di queste molecole sul fungo, sulle cellule umane a contatto con il fungo e su un modello sperimentale di topo con FC.

**Risultati.** Abbiamo testato un composto in grado di bloccare SPL in modelli sperimentali e ne abbiamo osservato la capacità di bloccare la crescita di *Aspergillus* e di proteggere il modello sperimentale di topo con FC dall'infezione.

**Conclusioni.** Il progetto permetterà di individuare composti in grado di migliorare il trattamento delle infezioni da funghi nei pazienti con FC in quanto in grado di agire sia sul paziente che sul fungo. Inoltre, questi composti permetteranno di semplificare la terapia, in quanto un'unica molecola sarà in grado sia di migliorare l'infiammazione che di proteggere dall'infezione.

## 59. Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis

Giovagnoli S

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Perugia (FFC#17/2020. New)



Stefano Giovagnoli, responsabile del progetto

**Background, problem, hypothesis.** Although lung disease in cystic fibrosis (CF) is primarily an infectious disorder, the associated inflammation is pathogenic and ineffective at clearing pathogens in CF [1] and this condition could be successfully rescued by anakinra (Kineret®) through inhibition of the NLRP3/IL-1 inflammatory pathway.

**Rationale and objectives of the project.** A strong rationale supports anakinra repurposing in CF. Upon such premises, a phase IIa study to evaluate safety and efficacy of Kineret® in patients with CF (EudraCT Number: 2016-004786-80) has been undertaken. However, the current anakinra daily subcutaneous injection shows low compliance, self-medication issues and unfavorable features for application to CF patients. Therefore, this project aims at developing highly translational and compliant oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in CF by 1) formulating delivery platforms by spray-drying to obtain enteric microparticles and inhalable dry powders and 2) assessing the therapeutic efficacy in murine CF models and in human preclinical *in vitro* systems.

**Essential methods.** The project will include *in vitro* studies with murine and human cells and *in vivo* studies in CfrF508del C57BL/6 mice to define the therapeutic activity of the obtained anakinra for-



formulations in CF by investigating the pharmacokinetics as well as the efficacy in CF mice with either *A. fumigatus* or *P. aeruginosa* infection. Inflammation expression and activity, cytokine production and cellular proteostasis in vivo as well as in vitro in HBE cells from control or patients homozygous for the p.Phe508del-CFTR mutation will be evaluated.

**Preliminary Results.** Further reinforcing the repurposing of anakinra in CF, our preliminary results show that subcutaneous injections of anakinra were able to restore cellular proteostasis and improve CF disease in in vitro and in vivo CF models.

**Conclusions.** Should both or one of the obtained formulations show suitable features to grant anakinra delivery through the oral or pulmonary routes, a rapid translation to the clinic could be expected in light of their compliance and potential scalability. A positive outcome of this project may pave the way to a new therapeutic opportunity to greatly improve the quality of life of CF patients.

## Piattaforme di veicolazione orale e polmonare per il riposizionamento di anakinra nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** L'infiammazione esagerata contribuisce a infezioni respiratorie e patologia in soggetti con fibrosi cistica (FC). Perciò, terapie atte a ridurre l'infiammazione potrebbero portare a sostanziale miglioramento della patologia e qualità di vita dei pazienti FC. Anakinra (Kineret®), un farmaco potenzialmente utile che è già impiegato per trattare patologie infiammatorie umane. Tuttavia, l'attuale trattamento mostra limiti di bassa accettabilità, problemi di automedicazione e caratteristiche sfavorevoli per un'applicazione nella FC. Perciò questo studio è rivolto a sviluppare nuovi sistemi di veicolazione per anakinra che ne permettano un impiego sicuro e semplice attraverso vie di somministrazione altamente accettabili da parte del paziente come quelle polmonare e orale.

**Ipotesi e obiettivi.** Confermando le sopracitate premesse, uno studio clinico è stato recentemente intrapreso per valutare la sicurezza ed efficacia di Kineret® su pazienti con FC. Perciò, al fine di risolvere i sopracitati limiti dell'attuale trattamento, questo progetto di ricerca mira a sviluppare piattaforme di veicolazione orale e polmonare altamente traslazionali per il riposizionamento di anakinra nella FC. Tale obiettivo sarà perseguito sviluppando sistemi capaci di veicolare anakinra a livello dell'intestino e dei polmoni e valutando l'efficienza delle nuove formulazioni in vitro ed in vivo.

**Metodi essenziali.** Il progetto includerà studi in vitro con modelli di cellule murine e umane ed in vivo su topi entrambi che mimano la patologia FC. I topi saranno infettati con microrganismi comunemente responsabili di infezione nella FC. Ciò permetterà di valutare l'attività terapeutica delle formulazioni polmonare ed orale di anakinra in confronto a Kineret. Lo studio sarà articolato in una prima fase di sviluppo e caratterizzazione dei preparati ed una seconda fase di studio della farmacocinetica ed efficacia.

**Risultati preliminari.** Studi preliminari sono stati condotti in vitro ed in vivo valutando l'effetto della somministrazione di kineret su modelli rappresentativi della patologia. I nostri risultati mostrano che anakinra somministrato per via sottocutanea è stato in grado di ripristinare le normali funzioni cellulari e migliorare la patologia da FC.

**Conclusioni.** Qualora entrambe o una delle formulazioni ottenute mostrassero caratteristiche idonee a garantire la somministrazione di anakinra per via orale o polmonare, si potrebbe attendere una rapida traslazione in clinica alla luce della loro accettabilità e potenziale scalabilità. In caso di successo, questo progetto potrebbe aprire la strada a una nuova opportunità terapeutica per migliorare notevolmente la qualità di vita dei pazienti con CF.

## 60. Counteracting inflammation triggered by *P. aeruginosa*-activated lung-infiltrating Th1/17 cells: a novel approach for precision medicine in CF

Krogh Johansen H<sup>1</sup>, Rossi E<sup>2</sup>, Kyrkou I<sup>1</sup>, Costa A<sup>2</sup>, Pavesi G<sup>2</sup>, Pallese A<sup>3</sup>, Nosotti M<sup>3</sup>, Landini P<sup>2</sup>, Paroni P<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Microbiology – Rigshospitalet of Denmark;

<sup>2</sup> Dipartimento di Bioscienze – Università degli studi di Milano; <sup>3</sup>

Dipartimento di Chirurgia toracica e trapianti di polmone – Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico di Milano (FFC#18/2020. New)



Moira Paroni, responsabile del progetto, e H.J. Krogh dell'unità partner

**Background and rationale.** Chronic lung infections caused by *P. aeruginosa* (*Pa*), are the main cause of mortality in CF patients. During infection, *Pa* undergoes a characteristic evolutionary adaptation that, despite leading to loss of virulence factors, triggers an overly activation of the immune system. Indeed, the main cause of lung function decline in CF is the persistent activation of various immune cells that, while failing to eradicate *Pa* infections, promotes tissue damage and pulmonary failure. So far, anti-inflammatory therapies have mostly proven ineffective, possibly due to their inability to impair the activation of pathogenic components of the immune system. In addition, the poor knowledge of the molecular interactions between *Pa* and the CF immune system hinders the discovery and development of targeted and more efficient anti-inflammatory drugs. In this respect, the recent identification of a new subset of T lymphocytes (Th1/17), that produce pro-inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-17), highly enriched in CF patients chronically infected by *Pa* and that strongly correlate with disease severity and lung injury, has represented a turning point.

**Hypothesis and objectives.** In CF the excessive activation of Th1/17 cells by CF adapted *Pa* strains can induce epithelial damage by IFN- $\gamma$  production, and also further increases neutrophils recruitment by IL-17 secretion, ultimately leading to lung failure. The main objective of the project is to characterize the precise role of Th1/17 in CF pathogenesis and the *Pa* genetic-determinants responsible for pathogenic Th1/17 proliferation.

**Essential methods.** To this aim, we will characterize both the genes involved in the activation of pathogenic lung-infiltrating Th1/17 cells in response to *Pa*, and *Pa* genetic-determinants responsible for pathogenic Th1/17 proliferation using the RNA-sequencing approach. Moreover, we will confirm the role of *Pa* genes involved in Th1/17 activation using an ex-vivo 3D model of human airway organoids, testing the ability of *Pa* mutants to promote tissue damage by recruiting pathogenic Th1/17 cells.

**Preliminary results.** Our preliminary data show that only two the several Th1/17 subsets are selectively enriched in the CF lungs chronically infected with *Pa*. Notably, these Th1/17 cells are more strongly activated by *Pa* isolates from CF lungs than by laboratory strain, further confirming their potential pathogenic role in CF.

**Conclusions.** We expect that our results will provide a new indicator of overall inflammation in CF, showing a specific role of Th1/17 cells. In particular, they will elucidate both Th1/17-specific immunological pathways and *Pa* determinants for their activation, paving the way for totally new pharmaceutical strategies able to counteract the pathogenic inflammation, providing a new precision medicine approach that might have an unprecedented impact on future CF treatments.



## Combattere l'infiammazione cronica polmonare scatenata dalle cellule Th1/17 patogeniche attivate da *P. aeruginosa*: un nuovo approccio di medicina di precisione in Fibrosi Cistica

**Ragioni dello studio.** Le infezioni croniche polmonari causate da *P. aeruginosa* (Pa), sono la principale causa di mortalità nei pazienti CF. Durante la permanenza nel polmone CF Pa va incontro ad un processo di adattamento che, pur determinando la perdita dei suoi principali fattori di virulenza, induce un'esagerata risposta infiammatoria. Infatti, è proprio la massiva infiltrazione di diverse componenti del sistema immunitario in risposta alle infezioni croniche di Pa a causare il danno tissutale che porta alla perdita delle funzionalità polmonari. Attualmente la maggior parte delle terapie anti-infiammatorie in CF risultano inefficienti e la mancanza di una conoscenza approfondita dei meccanismi molecolari dell'interazione tra Pa e sistema immunitario CF è un grosso limite nello sviluppo di farmaci anti-infiammatori più mirati ed efficaci. La recente identificazione di una nuova classe di linfociti T (Th1/17) altamente arricchita nei polmoni dei pazienti CF con infezioni croniche di Pa e direttamente coinvolta nel processo di danno polmonare, ha rappresentato un importante punto di svolta.

**Ipotesi e Obiettivi.** In CF l'eccessiva attivazione delle cellule Th1/17 in risposta a ceppi clinici di Pa adattati all'ambiente polmonare CF può indurre direttamente un danno epiteliale mediante la produzione di IFN- $\gamma$  e aumentare ulteriormente il reclutamento di neutrofili tramite la secrezione di elevate quantità di IL-17, portando infine al declino polmonare. Il principale obiettivo del progetto è quello di definire i fattori di virulenza di Pa responsabili della proliferazione dei linfociti Th1/17 ed il ruolo di questi ultimi nella patogenesi della CF.

**Metodi essenziali.** Utilizzando un approccio di trascrittomico (RNA-sequencing), identificheremo sia i geni dei linfociti Th1/17 polmonari che vengono regolati durante la loro attivazione in risposta a Pa, che i fattori di virulenza di Pa responsabili della proliferazione delle Th1/17 patogeniche. Infine, il ruolo effettivo di questi fattori di virulenza di Pa nel promuovere il danno tissutale mediante l'attivazione delle cellule Th1/17 verrà testato su un modello 3D di organoidi epiteliali polmonari.

**Risultati preliminari.** I nostri risultati preliminari mostrano che specifiche sottopopolazioni di linfociti Th1/17 sono selettivamente arricchite nei polmoni dei pazienti CF con infezione cronica da Pa. Inoltre, queste sottopopolazioni di Th1/17 proliferano significativamente in risposta a ceppi clinici di Pa isolati dopo anni di persistenza nei polmoni CF, confermando ulteriormente il loro potenziale ruolo patogenico.

**Conclusioni.** Grazie a questi risultati saremo in grado di individuare nuovi potenziali bersagli terapeutici, per lo sviluppo nel breve periodo di nuovi farmaci, in grado di contrastare l'infiammazione patogenica agendo sugli stimoli che la innescano, in un approccio di medicina di precisione in CF.

### 61. Nanotechnology-based Resolvin D1 as Pro-resolving Therapy in Cystic Fibrosis: Preclinical Studies for the Delivery of Innovative Formulations to the Clinic

Recchiuti A<sup>1</sup>, Aloisi A<sup>2</sup>, Caci E<sup>3</sup>, Pantano S<sup>4</sup>, Tirouvanziam R<sup>5</sup>, Mall M<sup>6</sup>, Bragonzi A<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Università "G. d'Annunzio" di Chieti – Pescara, Chieti; <sup>2</sup>Institute for Microelectronics and Microsystems -National Research Council, Lecce; <sup>3</sup>IRCCS "G. Gaslini", Genoa; <sup>4</sup>CRFC, San Liberatore Hospital, Atri; <sup>5</sup>Emory University, Atlanta, GA; <sup>6</sup>Charité – Universitätsmedizin, Berlin; <sup>7</sup>CFaCORE, San Raffaele Scientific Institute, Milan (FFC#19/2020. New)

**Background, problem, hypothesis.** The ambitious goal of this project is to develop nanotechnology-based formulations of



Antonio Recchiuti, secondo da sinistra, con i collaboratori del progetto

resolvin (Rv) D1 to foster the delivery of therapies for CF based on augmentation of resolution, since failure to resolve inflammation contributes to the morbidity of CF even in the era of modulators, rendering paramount the discovery of innovative therapies. Evidence from preclinical studies by this group signifies RvD1 holds therapeutic potential for people with CF, including those that do not benefit from modulators. However, to advance clinical development of RvD1, a proper drug formulation must be constructed and tested in relevant preclinical studies. The overarching hypothesis tested here is that spermidine-silica nanoparticles (sSNP) can be assembled and serve as a formulation to deliver RvD1 with improved potency in vivo and in vitro.

**Rationale and objectives of the project.** Evidence indicates that sSNP can represent a viable strategy for the therapeutic delivery of pro-resolving active molecules that can reduce lung pathology in CF.

– To this end, 2 specific aims are proposed in this multidisciplinary and multipronged project

– Construction of sSNP-RvD1 nanodrugs

– Testing safety, pharmacokinetics, and efficacy of sSNP-RvD1 in CF.

**Essential methods.** RvD1-loaded sSNP will be constructed and characterized. Toxicity and pharmacokinetics will be determined in vitro and in vivo. Efficacy of sSNP-RvD1 will be tested in CFTR<sup>-/-</sup> mice bearing chronic pulmonary infection and  $\beta$ ENAC Tg mice with spontaneous mucus plugging and lung disease.

**Results.** RvD1 activated resolution of infections and inflammation in vivo, blunted PMN pathological phenotypes in vitro and enhanced bacterial clearance by CF leukocytes and epithelial cells. sSNP-RvD1 retained chemical stability, activated phagocytosis, and reduced mouse pneumonia at 10-times lower doses than RvD1

**Conclusions.** Completion of these aims will generate innovative formulation for the pharmacological delivery of RvD1 that are stable and easy to handle. Nanoformulations can improve RvD1 therapeutic effects and can be adapted to different administration routes. Optimized sSNP-RvD1 can be further evaluated for pharmacokinetics and activity prior to the request of human studies This project is relevant to the FFC mission because it aims at promoting the clinical development of innovative therapies that can reduce lung pathology, alleviate morbidity, and improve lives of people with CF.

### Terapie pro-risolutive per la fibrosi cistica mediante resolvina D1 e nanotecnologie: studi pre-clinici per la consegna alla clinica di formulazioni innovative

**Problema e ragioni dello studio.** La mancata risoluzione dell'infiammazione polmonare, scatenata da infezioni eppure dall'accumulo di muco nelle vie aeree, ha gravi effetti sulla vita delle persone affette da fibrosi cistica (FC). Il nostro corpo normalmente produce molecole chimiche in grado di velocizzare la risoluzione dell'infiammazione ma alcune di esse sono difettose nelle persone con FC. Il nostro gruppo ha dimostrato precedentemente che una di queste molecole, chiamata resolvina D1 (RvD1), possiede un potenziale terapeutico per i pazienti con FC, compresi

quelli che non beneficiano della terapia con modulatori. Al fine di far progredire lo sviluppo clinico di RvD1 per la FC, tuttavia, occorre sviluppare opportune formulazioni che devono essere testate, con appropriati studi preclinici, prima di passare agli studi clinici con volontari e pazienti.

**Ipotesi ed obiettivi.** Per venire incontro a questa esigenza, in questo progetto di ricerca fabbricheremo formulazioni innovative di RvD1 e le testeremo in esperimenti preclinici. Ciò rappresenterà un passo avanti verso la consegna di RvD1 alla clinica. La nostra ipotesi è che RvD1 possa essere caricata all'interno di piccole particelle (chiamate *nanoparticelle* o sSNP) che ne migliorano la stabilità e l'efficacia nel ridurre l'infiammazione, l'accumulo di muco, il danno polmonare e l'infezione nella FC.

**Metodi essenziali.** Per testare questa ipotesi e raggiungere questo obiettivo ambizioso, nel corso di questo progetto, produrranno e caratterizzeranno nanofarmaci chiamati sSNP-RvD1. Valuteranno la tossicità, le proprietà farmacologiche e l'efficacia nel ridurre l'infiammazione, l'accumulo di muco ed il grado di infezione.

**Risultati.** Gli esperimenti in corso dimostrano che i nanofarmaci sSNP-RvD1 fin qui ottenuti mantengono l'attività biologica di RvD1 e sono 10 volte più potenti nell'attivare la risoluzione dell'infiammazione e dell'infezione batterica.

**Conclusioni.** I risultati di questi esperimenti aiuteranno a definire la potenza e l'efficacia di sSNP-RvD1, le quali rappresenteranno strategie di formulazione intelligenti per la somministrazione di RvD1, aumentandone l'efficacia. Queste sSNP-RvD1 sono adattabili a diverse vie di somministrazione e possono essere migliorate e valutate in studi futuri, come richiesto prima di iniziare indagini cliniche. Questo progetto è estremamente rilevante perché ha lo scopo di promuovere lo sviluppo clinico di terapie innovative per ridurre la patologia polmonare e migliorare la vita delle persone con FC.

## 62. Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis

Summa V<sup>1</sup>, Altucci L<sup>2</sup>, Brindisi M<sup>1</sup>, Barone S<sup>1</sup>, Lange H<sup>1</sup>, Del Gaudio N<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Farmacia; <sup>2</sup>Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dip. di Medicina di Precisione (FFC#20/2020. New)



Vincenzo Summa, responsabile del progetto, e Lucia Altucci dell'unità partner

**Background-Hypothesis.** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are particularly difficult to treat in patients with cystic fibrosis (CF) and they have the tendency of persisting and becoming chronic. This process catalyses insurgence of inflammation, uncontrolled tissue rearrangement and fibrosis, with deadly consequences. The efficacy of current anti-inflammatory treatments is restricted to symptomatic control of CF-associated airway inflammation, therefore novel and effective therapeutic options are urgently needed.

**Rationale and objectives.** The objective of the project is to unveil a novel therapeutic option for inflammation in CF. The activity of

an enzyme, namely histone deacetylase 6 (HDAC6), has been related to crucial patho-mechanisms associated to inflammation and fibrosis. HDAC6 is therefore an exciting new target to be explored to this aim. Inhibiting its function with small molecules displaying high potency and selectivity could represent an innovative strategy to tackle inflammation and prevent fibrotic damage.

**Methods.** The experimental plan involves: 1. Selection among known selective HDAC6 inhibitors (HDAC6i) for in vivo POC in the mouse models of lung infection/inflammation; 2. Design, synthesis and biological assessment of novel patentable selective HDAC6i; 3. Detailed studies on inflammation and fibrosis markers in vitro; 4. Optimization of the compounds and selection of a candidate for evaluation in mouse models of PA acute/chronic infection. Collaboration with the CFaCore (Cystic Fibrosis Animal Core Facility) will be key to validate the in vivo efficacy of HDAC6i.

**Preliminary Results.** The team owns a solid experience in the drug discovery process, in the discovery of HDACi and biology for several applications, including the development of novel and selective HDAC6i, as well as their biological characterization. X-ray structures of HDAC6i complexed with the enzyme are available to team members for design. Selection of the compound for the first POC in mouse models of lung infection/inflammation is almost completed and the design, synthesis, and biological evaluation of novel HDAC6i are currently ongoing.

**Conclusions.** Complementary anti-inflammatory treatments used in conjunction with correctors of the genetic defect underlying CF would be extremely beneficial. More importantly, patients that are not currently responsive to other treatments would notably benefit from therapies that could restore inflammatory regulation in CF.

## L'inibizione selettiva dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6) quale nuova strategia per combattere l'infiammazione e il rimodellamento fibrotico nella fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** Le infezioni causate da *Pseudomonas aeruginosa* sono estremamente difficili da trattare nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) e hanno la tendenza a persistere e divenire croniche. Ciò catalizza l'insorgenza di processi infiammatori e dà luogo al riarrangiamento incontrollato dei tessuti e alla fibrosi, con conseguenze mortali. L'efficacia delle attuali strategie antinfiammatorie nella FC è limitata al controllo sintomatico dell'infiammazione delle vie aeree, pertanto sono assolutamente necessarie nuove ed efficaci opzioni terapeutiche.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo del progetto è quello di offrire una nuova opzione terapeutica per l'infiammazione associata alla FC. Recentemente l'attività di una proteina, l'istone deacetilasi 6 (HDAC6), è stata correlata all'insorgenza dell'infiammazione e del processo fibrotico associati alla FC. HDAC6 rappresenta, pertanto, un nuovo entusiasmante bersaglio biologico da esplorare a questo scopo. In particolare, bloccare la funzione di questa proteina attraverso piccole molecole dotate di elevata potenza e selettività, potrebbe rappresentare una strategia innovativa per il trattamento della FC.

**Metodi essenziali.** Il piano sperimentale del progetto è suddiviso in diverse fasi, in cui varie competenze e discipline quali chimica farmaceutica, chimica organica, biochimica, biologia molecolare e farmacologia in vitro e in vivo si integreranno al fine di identificare nuovi inibitori di HDAC6 con efficacia nei modelli animali di infezioni polmonari e di FC. La collaborazione con il CFaCore (Cystic Fibrosis Animal Core Facility) sarà essenziale per valutare l'efficacia delle nuove molecole prodotte su modelli animali.

**Risultati preliminari.** Il team ha una solida esperienza nel processo di scoperta di nuovi farmaci, incluso lo sviluppo di nuove molecole inibitrici di HDAC6 e la loro caratterizzazione biologica. La sintesi e la valutazione biologica di queste molecole sono attualmente in corso.

**Conclusioni.** Nuovi trattamenti antinfiammatori da utilizzare in combinazione con i correttori del difetto genetico alla base della FC sarebbero estremamente utili. Inoltre, una nuova opzione



terapeutica è assolutamente indispensabile per quei pazienti che non rispondono ad altri trattamenti e che trarrebbero notevole beneficio da terapie in grado ripristinare la regolazione del processo infiammatorio nella FC.

### 63. Multi-task evaluation of TMA analogues as anti-inflammatory treatments for CF lung disease \*

Lampronti I<sup>1</sup>, Chilin A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della vita e biotecnologie, Sez. biochimica e biologia molecolare, Università di Ferrara; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova (FFC#22/2019. Concluded)



Ilaria Lampronti, responsabile del progetto, e Adriana Chilin dell'unità partner

**Background and rationale.** In order to identify compounds with biological properties similar to those of the known isopropyl TMA, but with reduced or absent toxicity, new molecules have been synthesized. Some TMA analogues were previously studied for their interesting activity in CFTR correction/potentiation (Laselva O, 2018). Now the attention is shifted toward their *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects.

**Hypothesis and objectives of the project.** We have implemented the knowledge on new-generation TMA analogues, in order to evaluate possible dualistic activity (anti-inflammation and modulating activities). Since the TF NF- $\kappa$ B plays a critical role in IL-8 expression, the use of agents able to interfere with the NF- $\kappa$ B pathway represents an interesting therapeutic strategy (Cabrini G, 2020).

**Essential methods.** Optimized analogues were prepared taking advantage of the microwave assisted organic synthesis (MAOS). As reference cell model CFBE41 o- and IB3-1 cells were utilized. Cells were treated with TMA analogues and then infected with PAO1 or stimulated with TNF- $\alpha$ . The toxicity assays were performed with Ames tests, Annexin V assay and detection of DNA-compound photo adducts under UVA irradiation. For the *in vivo* model, C57Bl/6NCR mice were used.

**Results.** Through EMSA experiments, we identified several new TMA derivatives able to inhibit the NF- $\kappa$ B/DNA complex. The selected active molecules were analyzed to evaluate the anti-inflammatory effect using both *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) infection and TNF- $\alpha$  stimulus on CF cell lines and in murine model. It was demonstrated that three TMA analogues were able to deeply decrease the gene expression of IL-8 on CFBE41o- and IB3-1 cells. At the same time, these molecules were found to have no pro-apoptotic, mutagenic and phototoxic effects, facilitating our decision to test them also *in vivo*, in a mouse model of acute and chronic lung inflammation. The experiments confirmed the anti-inflammatory effect of the selected molecules also *in vivo*, decreasing the bacterial load and the neutrophils count in the murine lungs and BAL.

**Conclusions.** Starting from different synthetic TMA derivatives studied to improve the chemical-pharmaceutical aspects (solubility in water and absence of cytotoxic effects) and pharmacological ones (anti-inflammatory effect added to modulation activity), we were able to identify two molecules with very interesting activities both *in vitro* and *in vivo*, not phototoxic, nor pro-apoptotic or mutagenic, and on which we are performing pharmacokinetic and toxicity studies.

### Valutazione multitasking di analoghi della TMA come agenti antinfiammatori per il trattamento della fibrosi cistica

**Ragioni dello studio.** La trimetilangelicina (TMA) è stata oggetto di numerosi studi. Con un recente progetto abbiamo identificato analoghi sintetici della molecola originale, privi degli effetti tossici di questa, che abbiamo voluto caratterizzare *in vitro* ed *in vivo*.

**Ipotesi e obiettivi del progetto.** Abbiamo aumentato le conoscenze su analoghi della TMA di ultima generazione, per valutarne la possibile doppia attività, anti-infiammatoria e di modulazione. Poiché è noto che il fattore NF- $\kappa$ B gioca un ruolo cruciale nell'attivare dell'espressione di proteine pro-infiammatorie come Interleuchina-8 (IL-8), l'utilizzo di inibitori rappresenta un interessante strategia terapeutica per la cura della fibrosi cistica (CF).

**Metodi essenziali.** I nuovi analoghi sono stati sintetizzati con moderne tecniche di sintesi. Sono state utilizzate cellule CFBE41o- e IB3-1 trattate con i derivati ed infettate con (*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 o stimulate con TNF $\alpha$ . I saggi di tossicità sono stati eseguiti con test di Ames, Annexin V e analisi di fotoaddotti. Il modello murino è costituito da topi C57Bl/6NCR.

**Risultati.** Un primo screening ha permesso di individuare, con esperimenti EMSA, molecole in grado di inibire NF- $\kappa$ B, coinvolto nell'infiammazione. Con questi analoghi sono state trattate colture cellulari (derivate da pazienti geneticamente manipolate in modo da replicarsi senza limiti) che mimano la malattia infiammatoria caratteristica dei pazienti CF. L'analisi dell'espressione genica di IL-8 ha confermato un'interessante attività anti-infiammatoria di tre analoghi, tutti in grado di abbassare notevolmente i livelli di IL-8. Parallelamente, queste molecole sono risultate prive di effetti pro-apoptotici, mutageni e fototossici *in vitro*, facilitando la nostra decisione di saggiarle anche *in vivo* su modello murino di infiammazione polmonare acuta e cronica. Gli esperimenti hanno confermato l'effetto anti-infiammatorio, essenzialmente utilizzando due derivati della TMA.

**Conclusioni.** Partendo da un insieme di derivati sintetici analoghi alla TMA e studiati per migliorarne sia gli aspetti farmaceutici (solubilità in acqua e assenza di effetti citotossici) che quelli farmacologici (effetto anti-infiammatorio sommato ad attività di modulazione), siamo riusciti ad identificarne due con attività molto interessanti, non fototossici, pro-apoptotici né mutageni *in vitro* e su cui stiamo terminando studi di farmacocinetica e tossicità *in vivo*.

### 64. Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis\*

Cafora M<sup>1,2</sup>, Forti F<sup>3</sup>, Brix A<sup>1</sup>, Loberto N<sup>1</sup>, Briani F<sup>3</sup>, Aureli M<sup>1</sup>, Pistocchi AS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale – Università degli Studi di Milano – LITA, Segrate (MI); <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e Comunità – Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Bioscienze – Università degli Studi di Milano (FFC#23/2019. Concluded)

**Background, problem, hypothesis.** Chronic inflammation caused by bacterial infections is a common feature of patients with Cystic Fibrosis (CF). However, new evidence suggest that constitutive inflammation is present in CF patients even in the absence of bacterial infection. Surprisingly, we previously found that bacteriophages, the natural enemy of bacteria, might also mitigate the hyper-inflammation of the CF zebrafish model not infected by bacteria suggesting their role as immunomodulators.

**Rationale and objectives of the project.** We investigated the mechanism through which phages act as anti-inflammatory agents using the CF zebrafish model and primary human bronchial epithelial cells homozygous for the CFTR mutation F508del.

**Essential methods.** As a read-out of the action of phages as im-





Anna Silvia Pistocchi (seconda da destra), responsabile del progetto, con i collaboratori del progetto

*munomodulators, we assessed the expression of pro-inflammatory markers by means of qPCR techniques and we evaluated the contribution of the TLR pathway.*

**Results.** *We demonstrated that not only the complete phage cocktail but also each single phage component had anti-inflammatory effects on zebrafish embryos. Moreover, we observed that this effect depends on proteinaceous virion component, but not on phage DNA. We further addressed on the possible mechanisms through which phages modulate the inflammation in zebrafish embryos. We observed lack of immunomodulatory effects in Myd88-deficient embryos, indicating the involvement of the TOLL-like receptor pathway. Moreover, local phage cocktail administration in CF embryos altered neutrophils migration toward an inflammation site, by reducing the chemotactic stimuli. We further studied the action of the phage cocktail on the human CuFi-1 F508del cell line, characterized by a high basal pro-inflammatory state.*

**Conclusions.** *The research of new anti-inflammatory agents in a cheap and easy-of-use CF zebrafish model, together with the studies on the effects of phages on CF human cells could speed-up the translational potential of this research and the introduction of bacteriophages into clinics.*

## Potenziale azione dei fagi come agenti immunomodulatori in fibrosi cistica

**Problema e ragioni dello studio.** L'infiammazione cronica causata da infezioni batteriche è una caratteristica comune nei pazienti con fibrosi cistica (FC). Tuttavia, nuove evidenze suggeriscono che i pazienti FC presentano un'infiammazione costitutiva anche in assenza di infezione batterica. In un lavoro precedente abbiamo scoperto che i batteriofagi, i nemici naturali dei batteri, sono in grado di mitigare lo stato iper-infiammato di un modello FC di zebrafish non infettato dai batteri, suggerendo un loro ruolo come immunomodulatori.

**Ipotesi e obiettivi.** Abbiamo studiato il meccanismo attraverso il quale i fagi agiscono come agenti antinfiammatori utilizzando sia un modello FC di zebrafish, sia cellule epiteliali bronchiali umane omozigoti per la mutazione *CFTR* F508del.

**Metodi essenziali.** Per valutare l'azione dei fagi come immunomodulatori, abbiamo analizzato l'espressione di marcatori pro-infiammatori mediante tecniche qPCR e il contributo della via di segnalazione del recettore TOLL-LIKE (TLR).

**Risultati.** Abbiamo innanzitutto dimostrato che non solo il nostro cocktail di quattro fagi, ma anche ogni singolo fago ha effetti antinfiammatori sugli embrioni di zebrafish. Inoltre, abbiamo osservato che questo effetto dipende dalla componente proteica ma non dal DNA fagico. Abbiamo inoltre dimostrato un coinvolgimento della via di TLR in questo meccanismo poiché i fagi non hanno effetto anti-infiammatorio negli embrioni con deficit di Myd88. Inoltre, la somministrazione locale del cocktail fagico negli embrioni di zebrafish FC altera la migrazione dei neutrofilo verso il sito infiammato, riducendo gli stimoli chemiotattici. Abbiamo studiato anche l'azione del cocktail dei fagi sulla linea cellulare umana CuFi-1 F508del, caratterizzata da un alto stato pro-infiammatorio basale.

**Conclusioni.** La ricerca di nuovi agenti antinfiammatori in un modello FC di zebrafish, economico e di facile utilizzo, insieme agli studi degli effetti dei fagi sulle cellule umane FC potrebbero accelerare il potenziale traslazionale di questa ricerca e l'introduzione dei batteriofagi in clinica.

## Appendix 1

## Archive of Publications & Congress Abstracts from FFC Projects 2011-2020

### Publicazioni e comunicazioni congressuali dagli studi finanziati da FFC dal 2011 al 2020

#### 1. CFTR PATHOPHYSIOLOGY AND THERAPY OF THE BASIC DEFECT

##### *Fisiopatologia CFTR e terapie del difetto di base*

- FFC Project#2/2011 **"PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene"** Aldo Di Leonardo (Dip. Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università di Palermo)
  - Publications
  - Lentini L. et al. "Towards a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay" *Mol Pharm.* 2014 Mar 3;11(3):653-64. doi: 10.1021/mp400230s. Epub 2014 Feb 7.
  - Abstracts
  - Lentini L. et al. "Ptc124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature amber and ochre stop codons" 86° CONGRESSO SIBS. Palermo 24 - 25 Ottobre
  - Lentini L. et al. "Azione readthrough di derivati del ptc124 su sistemi modello cellulari e in cellule di epitelio bronchiale-fc ib3.1 (cfr Df508/w1282x)" XIX Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, IX Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica, 13-16 Novembre 2013, Hotel Città del Mare, Terrasini (PA)
  - Gallucci G. et al. "Valutazione dell'azione readthrough della molecola PTC124 su sistemi modello cellulari contenenti mutazioni non senso e in cellule di epitelio bronchiale IB3.1 (F508del-W1282X) derivate da pazienti affetti da fibrosi cistica" Convegno "Biotecnologie: ricerca di base, interdisciplinare e traslazionale in ambito biomedico" Area della Ricerca del CNR di Palermo 27 - 28 Giugno 2013
  - Lentini L. et al. "PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature amber and ochre stop codons" Convegno SIBS 2013, Palermo
- FFC Project#3/2011 **"Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy"** Lorenzo Pinna (Dip. Chimica Biologica, Università di Padova)
  - Publications
  - Tosoni K. et al. "CFTR mutations altering CFTR fragmentation" *Biochem J.* 2012 Oct 15. [Epub ahead of print]
  - Venerando A. et al. "Detection of Phospho-Sites Generated by Protein Kinase CK2 in CFTR: Mechanistic Aspects of Thr1471 Phosphorylation" *PLoS One.* 2013 Sep 18;8(9):e74232.
  - Cesaro L. et al. "Phosphorylation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) serine-511 by the combined action of tyrosine kinases and CK2. The implication of tyrosine-512 and phenylalanine-508" *AminoAcids*, 2013 Dec;45(6):1423-9
- FFC Project#4/2011 **"Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function"** Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)
  - Publications
  - Monterisi S. et al. "Local modulation of Cystic Fibrosis Conductance Regulator: cytoskeleton and compartmentalized cAMP signalling" *Br J Pharmacol.* 2012 Oct 16
  - Abstracts
  - Abbattiscianni AC et al. "Spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in primary airway cells" ECF5 Basic Science Conference, 20-24 March 2013, Malaga, Spain
- FFC Project#1/2012 **"The read-through approach for the treatment of cystic fibrosis caused by premature termination codons"** Monica Borgatti (Dipartimento Biochimica e Biologia Molecolare Università di Ferrara), Nicola Altamura (Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari), Alberto Bresciani (IRBM, Science Park, Roma)
  - Publications
  - Altamura N. et al. "Tobramycin is a suppressor of premature termination codons" *J Cyst Fibros.* 2013 Mar 26
  - Marzaro G. et al. "Psoralen derivatives as inhibitors of NF-κB/DNA interaction: synthesis, molecular modeling, 3D-QSAR and biological evaluation" *J Med Chem.* 2013 Feb 17.
  - Fabbri E. et al. "Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-Mediated Induction of Proinflammatory Responses" *American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology* 2014, Vol X, pp 1-11
  - Altamura E. et al. "Chemical-Induced Read-Through at Premature Termination Codons Determined by a Rapid Dual-Fluorescence System Based on *S. cerevisiae*" *PLoS ONE* 2016 Apr 27;11(4):e0154260. doi: 10.1371
  - Abstracts
  - Borgatti M. et al. "Biological evaluation of psoralen derivatives as inhibitors of NF-κB/DNA interaction: molecular modeling, 3D-QSAR, EMSA assays and inhibition of IL-8 gene expression" 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine, 10-12 Ottobre, 2013, Creta, Grecia.
- FFC Project#2/2012 **"Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis"** Galietta J. Luis (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Enrico Millo (Centre of Excellence for Biomedical Research, Università di Genova)
  - Publications
  - Sondo E. et al. "Non-canonical translation start sites in the TMEM16A chloride channel" *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug 28. pii: S0005-2736(13)00287-3. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.010. [Epub ahead of print]
  - Scudieri P. et al. "Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia" *Journal of Physiology* 2012; 590:6141-6155
  - Scudieri P. et al. "TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels" *Journal of Biological Chemistry* 2013 Jun 15;452(3):443-55
  - Carbone A. et al. "Correction of defective CFTR/ENaC function and tightness of cystic fibrosis airway epithelium by amniotic mesenchymal stromal (stem) cells" *J. Cell. Mol. Med.* 2014 Jun 3. doi: 10.1111/jcmm.12303.
  - Sondo E. et al. "The TMEM16A chloride channel as an alternative therapeutic target in cystic fibrosis" *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2014; 52: 73-76
  - Pedemonte N. et al. "Structure and functions of TMEM 16 Proteins (Anoctamins)" *Physiol Rev*, 2014 Apr;94(2):419-59
  - Pesce E. et al. "Synthesis and structure-activity relationship of aminoarylthiazole derivatives as correctors of the chloride transport defect in cystic fibrosis" *Eur J Med Chem.* 2015 Jun 24;99:14-35
  - Caci E. et al. "Upregulation of TMEM16A Protein in Bronchial Epithelial Cells by Bacterial Pyocyanin" *PLoS One.* 2015 Jun 29;10(6):e0131775
  - Abstracts
  - Scudieri P. et al. "Constitutive activation of the Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel TMEM16A" 12th ECF5 Basic Science Conference - 25-28 Marzo 2015, Algarve, Portugal
  - Pesce E. et al. "Aminoarylthiazoles as correctors and potentiators for mutant CFTR" 1<sup>st</sup> Italian CF Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
  - Carbone A. et al. "Amniotic mesenchymal stem cells can correct the defective CFTR/ENaC function and tightness of CF airway epithelial cells upon coculture: involvement of gap junctions" 1<sup>st</sup> Italian CF

Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy

- Pesce E. et al. "Strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis" New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta, ECFS Conference, 26-29 March 2014
- Bellotti M. et al. "Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis" ECFC Basic Science, Pisa, 2016
- Pesce E, Bellotti M, Sondo E et al. "Aminoarilthiazoles as correctors and potentiators for mutant CFTR" 1<sup>th</sup> Italian CF Young Investigators Meeting, January 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Rome
- Galiotta LJV, Pedemonte N, Bertozzi F et al. "Pharmacological modulation of ion transport in CF: CFTR and beyond" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- FFC Project#3/2012 **"Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in CF and CF-like disease"** Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma), Cristina Bombieri (Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona), Massimo Conese (Dip. Scienze Biomediche, Università di Foggia)

#### Abstracts

- Lucarelli M et al. "Espressione e metilazione dei geni ENaC" Congresso Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBIOC), Roma 5-8 ottobre 2010.
- Lucarelli M. et al. "Expression and DNA methylation of ENaC genes" European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), Valencia 16-19 June 2010
- Castellani S. et al. "Study of the role of ENaC in cystic fibrosis: Expression of ENaC subunits as an investigation tool of the interaction between CFTR and ENaC and therapeutic approaches by epigenetic manipulation and activity reduction" 1<sup>st</sup> Italian CF Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
- FFC Project#4/2012 **"The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)"** Oscar Moran (Istituto di Biofisica CNR, Genova)

#### Publications

- Baroni D, Zegarra-Moran O, Moran O. "Functional and pharmacological induced structural changes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the membrane solved using SAXS" Cell and Molecular Life Sciences 2014 Oct 2
- Baroni D. et al. "Direct interaction of a CFTR potentiator and a CFTR corrector with phospholipid bilayers" European Biophysics Journal 26 Apr 2014
- Moran O. et al. "On the structural organization of the intracellular domains of CFTR" Int J Biochem Cell Biol. 2014 Jul;52:7-14

#### Abstracts

- Pollock NL. et al. "Purification and biophysical analysis of DF508 and G551D CFTR" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, USA
- Pollock NL. et al. "From heterologous expression to homogeneous samples: large-scale production of a human ABC transporter for structural studies" In: Role of multidrug resistance proteins in pharmacokinetics and toxicology, 3-7th September 2013 (Masuria, Poland)
- Belmonte L. et al. "Molecular dynamics analysis of the normal and mutated cystic fibrosis transmembrane regulator: nucleotide-binding domain interactions" CCII Congresso della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata, 21-24 Settembre 2014 (Palermo, Italia).

- FFC Project#5/2012 **"Modulation of post-translational modification and quality control system as a novel therapeutic strategy for Cystic Fibrosis"** Nicoletta Pedemonte (Lab. Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova)

#### Publications

- Tomati V. et al. "Genetic Inhibition Of The Ubiquitin Ligase Rnf5 Attenuates Phenotypes Associated To F508del Cystic Fibrosis Mutation" Sci Rep. 2015 Jul 17;5:12138
- Sondo E, Falchi F, Caci M et al. "Pharmacological Inhibition of the Ubiquitin Ligase RNF5 Rescues F508del-CFTR in Cystic Fibrosis Airway Epithelia" Cell Chemical Biology 2018 Apr 26. pii: S2451-9456(18)30124-7
- Tomati V, Pesce E, Caci E et al. "High-throughput screening identifies FAU protein as a regulator of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel" 2018 Jan 26;293(4):1203-1217

#### Abstracts

- Pedemonte N "Novel CFTR regulators identified by means of a functional genomics approach and their possible mechanisms of action" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia

- FFC Project #1/2013 **"Mechanism of action of trimethylangelicin in rescuing F508del CFTR functional expression"** Valeria Casavola (Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari)

#### Publications

- Rubino R, Bezzeri V, Favia M et al "Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1" Pflugers Arch 2014 Mar 5
- Favia M. et al. "Trimethylangelicin promotes the functional rescue of mutant F508del CFTR protein in cystic fibrosis airway cells" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2014;May 9
- Abbattiscianni AC. et al. "Correctors of mutant CFTR enhance subcellular cAMP/PKA signaling via ezrin phosphorylation and cytoskeleton organization" J Cell Sci, 2016 Jan 28
- Laselva O. et al. "The investigational Cystic Fibrosis drug Trimethylangelicin directly modulates CFTR by stabilizing the first membrane-spanning domain" Biochemical Pharmacology 2016 Sep 8. pii: S0006-2952(16)30265-9
- Castellani S, Favia M, Guerra L et al. "Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction in cystic fibrosis airway epithelium" Histology and Histopathology, 2017 May;32(5):445-459.

#### Abstracts

- Abbattiscianni AC. et al. "Role of small molecule F508del CFTR correctors on the cAMP/PKA/ezrin compartmentalization in primary CF-BE cells" 1<sup>st</sup> Italian CF Young Investigator Meeting January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
- Laselva O. et al. "Trimethylangelicin (TMA) binds directly to purified WT-CFTR" NACF 2015
- Laselva O. et al. "Trimethylangelicin (TMA) promotes F508del.CFTR functional rescue in CF airways cells" New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta, ECFS Conference, 26-29 March 2014
- Laselva O. et al. "Trimethylangelicin (TMA) promotes F508del-CFTR functional rescue in CF airway cells", CF Basic science conference, Pisa, 2016
- Laselva O. et al. "Intramolecular assembly disrupted by ΔF508 can be modulated by structurally unrelated compounds" 13<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, 30 March - 02 April 2016, Pisa, Italy
- Abbattiscianni AC, Favia M, Monterisi S, Casavola V "Role of small molecule F508delCFTR correctors on the cAMP/PKA/ezrin compartmentalization in primary CF-BE cells" 1<sup>th</sup> Italian CF Young Investigators Meeting, January 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Rome

- FFC Project#3/2013 **"ΔF508-CFTR correctors deriving from computational design and from safe natural compounds for a prompt clinical application"** Mauro Mazzei (Dipartimento di Farmacia, Università di Genova), Paola Fossa (Dip. di Farmacia, Università di Genova), Maria Pascale (Dip. di Farmacia, Università del Salento)

#### Publications

- Nieddu E. et al. "The search for a common structural moiety among selected pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel" Future Med Chem. 2014;6(17):1857-68
- Nieddu E. et al. "Phenylhydrazones as Correctors of a Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" Arch Pharm 2016 Feb;349(2):112-23
- Marengo B, Speciale A, Senatore L et al. "Matrine in association with FD-2 stimulates F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in the presence of corrector VX809" Molecular Medicine Reports 2017 Dec;16(6):8849-8853

- FFC Project #5/2013 **"Vessel associated progenitor cells as a promising cell-based approach to treat cystic fibrosis disease"** Graziella Messina (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

#### Abstracts

- Vezzali C. et al. "Vessel associated progenitor cells in the cell-based therapy of the cystic fibrosis lung disease" 11<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, Malta, 26-29 March 2014

- FFC Project #6/2013 **"Establishment of a semi-automated evaluation of CFTR function in blood cells for clinical applications"** Claudio Sorio (Dip. di Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona), Monica Aversa (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova), Mario R. Buffelli (Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona)

#### Publications

- Johansson J et al. "Detection of CFTR protein in human Leukocytes by Flow Cytometry" Cytometry 2014 Jul;85(7):611-20. doi: 10.1002/cyto.a.22456. Epub 2014 Mar 12.
- Ettore M. et al. "Electrophysiological evaluation of Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) expression in human monocytes" Biochimica et Biophysica Acta vol 1840: 3088-3095

#### Abstracts

- Bavestrello M. et al. "Alterations of CF-PBMC induced by an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>" 1<sup>st</sup> Italian CF Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy



- Vercellone S. et al. "Measure of CFTR expression and function in peripheral blood leukocytes" 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16th - 17th 2015, Rome, Italy
  - Vercellone S. et al. "Il test con flusso-citometria per identificare l'espressione di CFTR dopo trattamento con nuovi farmaci in linee cellulari epiteliali" 39th European Cystic Fibrosis Conference, 8 - 11 June 2016, Basel, Switzerland
  - Bavestrello M, Averna M, Pedrazzi M et al. "Alterations of CF-PBMC induced by an increase in [Ca<sup>2+</sup>]" 1th Italian CF Young Investigators Meeting, January 16th-17th 2015, Rome
  - FFC Project#7/2013 "**Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for cystic fibrosis and CFTR related-disorders**" Giuseppe Castaldo (CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli)
- Publications
- Terlizzi V. et al. "Genotype-phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fibrosis bearing CFTR complex alleles" *J Med Genet* 2016;0:1-12. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103985
  - Di Lullo AM, Scorza M, Amato F, Comegna M, Raia V "An "ex vivo model" contributing to the diagnosis and evaluation of new drugs in cystic fibrosis" *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 2017 Jun;37(3):207-213. doi: 10.14639/0392-100X-1328
- Abstracts
- Scorza M. et al. "Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for Cystic Fibrosis and CFTR related disorders" 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16th - 17th 2015, Rome, Italy
  - FFC Project #1/2014 "**Identification and validation of novel molecules obtained by integrated computational and experimental approaches for the read-through of PTCs in CF cells**" Laura Lentini (Dip. di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie -STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università di Palermo), Ivana Pibiri (Dip. di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie -STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università di Palermo)
- Publications
- Pibiri I. et al. "Enhancement of premature stop codon readthrough in the CFTR gene by Ataluren (PTC124) derivatives" *Eur J Med Chem.* 2015 Aug 28;101:236-44
  - Pibiri I. et al. "Exploring the readthrough of nonsense mutations by non-acidic Ataluren analogues selected by ligand-based virtual screening" *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016 Oct 21;122:429-35. doi: 10.1016
  - Lentini L, Melfi R, Cancemi P et al. "Caffeine boosts Ataluren's readthrough activity" *Heliyon* 2019 Jun 21;5(6):e01963
- Abstracts
- Lentini L. et al. "Premature termination codon 124 derivatives as a novel approach to improve the read-through of premature amber and ochre stop codons" *J Biological Research*, Vol 88, No 1 (2015): 86th SIBS National Congress, Palermo, Italy, 24-25 October 2013
  - Pibiri I. et al. "Nonsense Mutation Readthrough Enhancement by Variation of Fluorine Number and Position in a Series of PTC124 Derivatives", *EFMC-ISMCM 2014-XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry*, Lisbon, Portugal - September 7-11, 2014
  - Lentini L, Pibiri I, Melfi R et Al. "Integrated computational and experimental approaches for the identification of new molecules with readthrough activity on premature termination codons (PTCs) in cystic fibrosis cells" *IBIM-CNR: "Biotecnologie e ricerca di base interdisciplinare e traslazionale in ambito biomedico"*, presso il CNR di Palermo, Dicembre 2015
  - Lentini L, Pibiri I, Melfi R et Al. "Identification of new molecules with readthrough activity on premature termination codons (PTCs) in cystic fibrosis cells (CFTR deltaF508/W1282X)" *XIV Congresso FISV*, Roma 20-23 settembre 2016
  - Pibiri I, Lentini L, Melfi R et Al. "PTC124 and its derivatives: A rational approach against nonsense" *Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana*. 21 Settembre 2016-Venezia (Keynote)
  - FFC Project #2/2014 "**A systems biology approach to the correction of Cystic Fibrosis: from building a network of proteostasis regulatory pathways to combinatorial targeting. (A rational approach to develop novel drugs for the treatment of Cystic Fibrosis)**" Alberto Luini (Centro Nazionale Ricerche, Dip. di Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli)
- Publications
- Hegde RN. et al. "Unravelling druggable signalling networks that control F508del-CFTR proteostasis" *Elife*, 2015 Dec 23;4. pii: e10365. doi: 10.7554
  - FFC Project#3/2014 "**Testing CFTR in epithelial organoids for drug development and diagnosis of cystic fibrosis**" Melotti Paola (Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona), Hugo de Jonge (Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam)
- Abstracts
- Caldreer S. et al. "CFTR in epithelial organoids: relevance for drug development and diagnosis of cystic fibrosis", 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16th - 17th 2015, Rome, Italy
  - Caldreer S. et al. "CFTR function in epithelial organoids" 10th European CF Young Investigator Meeting, Paris, 2016, February 10-12 .Oral Communication
  - Sorio C., et al. "Combined standardized and new CFTR functional tests for improving diagnosis" 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March - 02 April 2016, Pisa, Italy
  - Caldreer S. et al "Intestinal epithelial organoids contribute to combination of functional tests supporting drug development and diagnosis" 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March - 02 April 2016, Pisa, Italy
  - Sorio C. et al. "Una combinazione di test (sia standardizzati che nuovi) per supportare la diagnosi FC e diagnosi incerte" 39th European Cystic Fibrosis Conference, 8 - 11 June 2016, Basel, Switzerland
  - Sorio C. et al. "Combining standardized and new CFTR functional tests for diagnosis" 29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference October 8-10, 2015, Phoenix, Arizona
  - Caldreer S. et al. "Intestinal epithelial organoids contribute to combination of CFTR functional tests supporting drug development and diagnosis" 29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference October 8-10, 2015, Phoenix, Arizona
  - Caldreer S, Baruzza A, Vercellone S et al. "Studio del canale CFTR su organoidi derivati da mucosa rettale per lo sviluppo di terapie personalizzate e il supporto diagnostico in fibrosi cistica" *XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica*, Salerno, 9-12 Novembre 2016
  - FFC Project#4/2014 "**The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR): correctors sites**" Oscar Moran (Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche - CNR, Genova)
- Publications
- Pollock NL et al. "Structure of wild type and mutant F508del CFTR: A small-angle X-ray scattering study of the protein-detergent complexes" *J Struct Biol.* 2016 Apr;194(1):102-11. doi: 10.1016/
  - Moran O. "The biophysics, biochemistry and physiology of CFTR" *Cell and molecular life sciences* 2017 Jan;74(1):1-2. doi: 10.1007/s00018-016-2384-x. Epub 2016 Oct 4
  - Moran O. "The gating of the CFTR channel" *Cell and molecular life sciences* 2017; 74: 85-92
- Abstracts
- Moran O, Pollock N, Satriano L, Zegarra-Moran O, Ford R et al "A small-angle x-ray scattering study of the wild type and mutant F508del CFTR: a very thorough analysis" 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March - 02 April 2016, Pisa, Italy
  - FFC Project#6/2014 "**Development of novel methodologies for the identification of CFTR-targeted drugs: a multidisciplinary approach using Real Time Surface Plasmon Resonance interaction assay supported by bioinformatics strategies on HPC infrastructures**" Marco Rusnati (Dip. di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Unità Analisi Interazione Macromolecolare-Sez. di Oncologia Sperimentale e Immunologia)
- Publications
- Rusnati M, Sala D, Orro A et al. "Speeding Up the Identification of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Targeted Drugs: An Approach Based on Bioinformatics Strategies and Surface Plasmon Resonance" *Molecules* 2018 Jan 8;23(1).
  - Fossa P "Studi strutturali sulla proteina CFTR: opportunità e prospettive" *La chimica e l'industria*, gen/feb 2019, n.1, anno 2, pp. 48-51
  - FFC Project#7/2014 "**A kinase-directed approach to rescue functionality of F508del CFTR**" Andrea Venerando (Dip. Scienze Biomediche, Università di Padova)
- Publications
- Ibrahim SH, Turner MJ, Saint-Criq V et al "CK2 is a key regulator of SLC4A2-mediated Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in human airway epithelia" *European Journal of Physiology* 2017 Sep;469(9):1073-1091.
  - FFC Project#8/2014 "**Design and synthesis of improved analogs of trimethylangelicin (TMA) for personalized treatment of cystic fibrosis**" Roberto Gambari (Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologie,

Sez. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara) Adriana Chilini (Dip. di Farmaceutica e Scienze Farmacologiche, Università di Padova)

#### Publications

- Gambari R, Breveglieri G, Salvatori F et al. "Therapy for Cystic Fibrosis Caused by Nonsense Mutations" *Intech Open* 2015, 309-326, doi: org/10.5772/61053

#### Abstracts

- Lampronti I, Milani R, Manzione G et al. "Anti-inflammatory activity of novel 4,6,4'-trimethylangelicin's analogues: Effects on the NF-kappa B activity and IL-8 expression in Cystic Fibrosis IB3-1 cells" *International Journal of Molecular Medicine*, 38, S71-S71, 2016

- FFC Project#1/2015 "**Relationship between mitochondria and F508del-CFTR in Cystic Fibrosis**" Anna Atlante (IBBE - Istituto delle Biomembrane e Bioenergetica, CNR Bari)

#### Publications

- Atlante A. et al. "Mitochondria and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dialogue: Some News" *J Bioenerg Biomembr* DOI 10.1007/s10863-016-9663-y
- de Bari L, Favia M, Bobba A et al. "Aberrant GSH reductase and NOX activities concur with defective CFTR to pro-oxidative imbalance in cystic fibrosis airways" *J Bioenerg Biomembr* 2018 Mar 9.
- Favia M, de Bari L, Lussandro R et al. "Modulation of glucose-related metabolic pathways controls glucose level in airway surface liquid and fight oxidative stress in cystic fibrosis cells" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2019 Apr 27. doi: 10.1007/s10863-019-09797-5.

- FFC Project#2/2015 "**RNF5/RMA1 ubiquitin ligase as a drug target for mutant CFTR rescue**" Andrea Cavalli (Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie - Università di Bologna) Nicoletta Pedemonte (U.O.C. Genetica Medica - Istituto G. Gaslini, Genova)

#### Publications

- Li H, Pesce M, Sheppard DN et al. "Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: From discovery to drug development" *J Cyst Fibros*. 2018 Mar;17(2S):S14-S21
- Tomati V, Caci E, Ferrera L et al. "Thymosin  $\alpha$ -1 does not correct F508del-CFTR in cystic fibrosis airway epithelia" *JCI Insight* 2018 Feb 8;3(3)
- Ashiqul Haque AKM, Dewerth A, Antony JS et al. "Chemically modified hCFTR mRNAs recuperate lung function in a mouse model of cystic fibrosis" *SCI REP* 2018 Nov 13;8(1):16776
- Sondo E, Pesce E, Tomati V et al. "RNF5, DAB2 and Friends: Novel Drug Targets for Cystic Fibrosis" *Current Pharmaceutical Design* 2017;23(1):176-186

#### Abstracts

- Pedemonte N "Therapeutic potential of proteostasis modulation in cystic fibrosis" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 1 April 2017, Albufeira, Portugal
- Sondo E, Falchi F, Caci E et al. "RNF5 inhibitors as potential drugs for cystic fibrosis basic defect" ECFC Basic Science Conference 2018, 21-24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Brusa I, Falchi F, Sondo E et al. "Hit optimization for the development of novel ubiquitin-ligase RNF5 inhibitors" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia
- Pesce E, Sondo E, Caci E et al. "Characterization of biological activity of RNF5 inhibitors as potential drugs for cystic fibrosis basic defect" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia

- FFC Project#3/2015 "**Relationship between mitochondria and F508del-CFTR in Cystic Fibrosis**" Hugo de Jonge (Dipartimento di Gastroenterologia ed Epatologia - Centro Medico, Erasmus University, Rotterdam), Sara Calderer (Dip. di Patologia e Diagnostica, sezione di Patologia Generale - Università di Verona)

#### Abstracts

- Calderer P. et al. "Una combinazione di test per studiare il funzionamento di CFTR e favorire lo sviluppo di nuovi farmaci" 39th European Cystic Fibrosis Conference, 8 – 11 June 2016, Basel, Switzerland
- Bijvelds M, Meijssen K, Peppelenbosch M et al. "Chloride and bicarbonate transport in intestinal organoids: differential effects of CFTR modulators and mutations" 17th Scientific Meeting "Organoids as models for disease and treatment in CF" September 21st + 22nd 2017 Schloss Waldhausen/Mainz
- de Jonge H, Meijssen KF, Beekman JM "Correction of abnormalities in bicarbonate transport in CF intestinal organoids by CFTR modulators" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis

- FFC Project#5/2015 "**The plant cytokine kinetin and its analogues as potential therapeutic agents to correct CFTR splicing defects**" Stefano Duga (Università Humanitas, Milano)

#### Publications

- Straniero L, Soldà G, Costantino L et al. "Whole-gene CFTR sequencing combined with digital RT-PCR improves genetic diagnosis of cystic fibrosis" *J Hum Genet* 2016 Dec;61(12):977-984. doi: 10.1038/jhg.2016.101.

- FFC Project#6/2015 "**Evaluation of the biological and therapeutic properties of mesoangioblasts-vessel associated progenitor cells in the cell based therapy of the cystic fibrosis disease**" Graziella Messina (Dipartimento di Bioscienze - Università degli Studi di Milano)

#### Abstracts

- Bonfanti C. et al. "Mesoangioblasts - vessel associated progenitor cells- engraft epithelial tissues and express functional CFTR channel: prospects and promise for a cell therapy for Cystic Fibrosis" 10th Stem Cells, Cell Therapies and Bioengineering in Lung Biology & Lung Disease Conference; University of Vermont, Burlington VT, USA (July 27-30, 2015)
- Vezzali C. et al. "Mesoangioblasts -vessel associated progenitor cells- engraft epithelial tissues and express CFTR channel: prospects and promise for a cell therapy for Cystic Fibrosis" International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, San Francisco CA, USA (June 22-25, 2016)
- Vezzali C. et al. "Mesoangioblasts -vessel associated progenitor cells- engraft epithelial tissues and express CFTR channel: prospects and promise for a cell therapy for Cystic Fibrosis" 1<sup>st</sup> YOUNG SCIENTIST WORKSHOP on "Stem cell niche: from basic science to clinical application" Pavia, Italy (May 8-10 2016)
- Vezzali C, Celesti G, Bonfanti C et al. "Mesoangioblasts -vessel associated progenitor cells as a novel cell-based therapy for cystic fibrosis" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 01 April 2017, Albufeira, Portugal

- FFC Project#7/2015 "**Aminoarylthiazole derivatives as correctors of the chloride transport defect in novel cystic fibrosis: computer assisted drug design, synthesis and biological evaluation**" Enrico Millo (CEBR, Centro Eccellenza Ricerca Biomedica, Università di Genova)

#### Publications

- Liessi N, Cichero E, Pesce E et al. "Synthesis and biological evaluation of novel thiazole-VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors by QSAR-based filtering tools" *Eur J Med Chem*. 2017 Dec 8;144:179-200.

- FFC Project#8/2015 "**Dissecting the role of TG2 in cystic fibrosis pathogenesis: identification of possible novel therapeutic targets**" Mauro Piacentini (Dipartimento di Biologia - Università di Tor Vergata, Roma), Luigi Maiuri (IERFC, Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica - Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Diaz-Hidalgo L. et al. "Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions" *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 (2016) 2084–2092
- Antonioli M. et al. "Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy" *Trends in Biochemical Sciences* 2016 Oct 17. pii: S0968-0004(16)30171-2. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.008
- Rossin F, Vilella V, D'Eletto M et al. "TG2 regulates the heat shock response by the post-translational modification of HSF1", *Embo Reports*, 2018 May 11. pii: e45067
- Maiuri L, Raia V, Piacentini M et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and autophagy: hereditary defects in cystic fibrosis versus gluten-mediated inhibition in celiac disease" *Oncotarget*, 2019 Jul 8;10(43):4492-4500

- FFC Project#9/2015 "**Identification of molecular targets to reduce the side effect of gating potentiators on the F508del-CFTR plasma membrane stability**" Anna Tamanini (Laboratorio di Patologia Molecolare, UOC Laboratorio Analisi sede di Borgo Trento, Dipartimento di Patologia e Diagnostica - Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona), Massimo Aureli (Dip. di Biotecnologia Medica e Medicina Traslazionale - Università di Milano)

#### Publications

- Schiumarini D, Loberto N, Mancini G et al. "Evidence for the involvement of lipid rafts and plasma membrane sphingolipid-hydrolases in *Pseudomonas aeruginosa* infection of cystic fibrosis bronchial epithelial cells" *Mediators of Inflammation*, 2017;2017:1730245. doi: 10.1155/2017/1730245. Epub 2017 Dec 3

#### Abstracts

- Tamanini A., Loberto N., Mancini G. et al. "New molecular targets to reduce the side effect of potentiators on membrane stability of res-

- cued F508del CFTR protein in respiratory airways" The 30<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27–29, 2016
- Aureli M, Munari S, Mancini G et al. "vx-809 and vx-770 modulate the sphingolipid pattern of bronchial epithelial cell lines: effect on CFTR plasma membrane stabilization" 14<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, 29 March – 1 April 2017, Albufeira, Portugal
  - Mancini G, Munari S, Loberto N et al. "Role of ganglioside GM1 on CFTR stabilization at plasma membrane: a new challenge for the cystic fibrosis therapy" ECFC Basic Science Conference 2018, 21–24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
  - Mancini G, Munari S, Loberto N et al. "Ganglioside GM1 as new therapeutic strategy to improve CFTR stabilization at plasma membrane" North American Cystic Fibrosis Conference, October 18–20, 2018, Denver, CO
  - Trabucchi C, Mancini G, Munari S et al. "Ganglioside GM1 to stabilize the rescued F508del CFTR" 13<sup>th</sup> Cystic Fibrosis European Young Investigators' meeting (EYIM), February 27–28, March 1, Institut Pasteur, Paris
  - Loberto N, Mancini G, Trabucchi C et al. "Ganglioside GM1 improves the plasma membrane stabilization of F508del-CFTR rescued by the use of CFTR modulators" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, 27–30 March 2019, Dubrovnik, Croatia"
  - FFC Project#1/2016 **"New generation trimethylangelicin (TMA) analogues for selective modulation of defective CFTR or inflammation"** Adriana Chilini (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova)
- Publications
- Lampronti I, Manzoni MG, Sacchetti G et al. "Differential Effects of Angelicines Analogues on NF- $\kappa$ B activity and IL-8 expression in cystic fibrosis IB3-1 cells" *Mediators of Inflammation*, Volume 2017 (2017), Article ID 2389487
  - Laselva O, Marzaro G, Vaccarin C et al. "Molecular mechanism of action of Trimethylangelicin derivatives as CFTR modulators" *Frontiers in Pharmacology* 2018, July 4
  - Marzaro G, Lampronti I, D'Aversa E et al. "Design, synthesis and biological evaluation of novel trimethylangelicin analogues targeting nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)" *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018 May 10;151:285–293
- Abstracts
- Chilini A, Marzaro G, Lampronti I et al. "New trimethylangelicin analogues as modulators of defective CFTR" 14<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, 29 March – 01 April 2017, Albufeira, Portugal
  - Chilini A "New generation trimethylangelicin (TMA) analogues for selective modulation of defective CFTR or inflammation" 14<sup>th</sup> Convention of FFC investigators in Cystic Fibrosis, 24–26 nov 2016, Garda, Verona
  - Laselva O, Marzaro G, Lampronti I et al. "Structurally diverse Trimethylangelicin derivatives correct the primary defect in p.Phe508del-CFTR by stabilizing the first membrane-spanning domain" ECFC Basic Science Conference 2018, 21–24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
  - FFC Project#3/2016 **"MicroRNA Therapeutics in CF: Targeting CFTR and inflammation networks (MicroRNA-CF)"** Roberto Gambari (Dipartimento di Scienze della vita e Biotecnologie, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)
- Publications
- Lampronti A, Finotti A, Bianchi N et al. "Natural substances in the treatment of cystic fibrosis" *Clinical Immunology, Endocrine and Metabolic Drugs* 2016, 3, 130–139
  - Fabbri E, Tamanini A, Jakova T et al. "A Peptide Nucleic Acid against MicroRNA miR-145-5p Enhances the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Calu-3 Cells" *Molecules* 2017 Dec 29;23(1)
  - Finotti A, Gasparello J, Fabbri E et al. "Enhancing the expression of CFTR using antisense molecules against microRNA miR-145-5p" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2019 Feb 27.
  - Gasparello J, Papi C, Zurlo M et al. "Demonstrating specificity of bioactive peptide nucleic acids (PNAs) targeting microRNAs for practical laboratory classes of applied biochemistry and pharmacology" *PLoS ONE* 2019 Sep 11;14(9):e0221923
- Abstracts
- Bergamini G, Calcaterra E, Tridello G et al. "Sviluppo di un test della funzione CFTR *in vivo*: Misurazione in singole ghiandole sudoripare umane mediante immagini della sudorazione dipendente dal canale difettoso in fibrosi cistica rispetto a quella indipendente" XXII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Salerno, 9–12 Novembre 2016
  - FFC Project#4/2016 **"Development of a PI3K $\gamma$ -derived peptide as a novel F508del-CFTR potentiator"** Alessandra Ghigo (Dipartimento di Biotecnologia Molecolare e Scienze della Salute, Università di Torino)
- Abstracts
- Ghigo A, Murabito A, Ren K et al. "Targeting PI3K $\gamma$  scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis" 14<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, 29 March – 01 April 2017, Albufeira, Portugal
  - Ghigo A, Murabito A, Ren K et al. "Targeting PI3K $\gamma$  scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis" North American Cystic Fibrosis Conference 2017 - Indianapolis (USA) – November 2–4, 2017
  - FFC Project#5/2016 **"Implementation of a new imaged-controlled sweat test for *in vivo* quantification of CFTR function: value for diagnosis and efficacy of new therapies"** Teresinha Leal (Centro di Lovanio per Tossicologia e Farmacologia Applicata-LTAP, Istituto di Ricerca Clinica e Sperimentale-IREC, Università Cattolica di Lovanio), Stefano Ceri (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Università di Milano); Nguyen-Khoa Thao (Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP Laboratory of General Biochemistry, Paris)
- Publications
- Bergamini G, Tridello G, Calcaterra E et al. "Ratiometric sweat secretion optical test in cystic fibrosis, carriers and healthy subjects" *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018 Mar;17(2):186–189
  - Strazzabosco M, Fiorotto R, Cadamuro M et al. "Pathophysiologic implications of innate immunity and autoinflammation in the biliary epithelium" *BBA - Molecular Basis of Disease* 2018 Apr;1864(4 Pt B):1374–1379.
- Abstracts
- Teresinha L, Viphonephom P, Hoyep Tchanchou A. et al. "False-positive beta-sweat secretion test" The 30<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27–29, 2016
  - Calcaterra E, Tridello G, Leal T et al. "Sviluppo di un test della funzione CFTR *in vivo*: misurazione in ghiandole sudoripare umane mediante immagini della sudorazione dipendente dal canale difettoso in fibrosi cistica rispetto a quella indipendente" Congresso Nazionale SIFC, 9–11 Novembre 2016, Salerno
  - Bergamini G, Calcaterra E, Ceri S et al. "Testing CFTR function *in vivo* by imaged ratiometric measurement of beta adrenergic/cholinergic sweat rate in human sweat glands" 17<sup>th</sup> Scientific Meeting "Organoids as models for disease and treatment in CF, September 21st + 22nd 2017 Schloss Waldhausen/Mainz
  - Leal T, Noel S, Bergamini G et al. "Topical eye treatment with  $\beta$ -blocker abolishes sweat secretion triggered by intradermal isoprenaline plus aminophylline: a clinical observation" ECFS 40<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 7–10 Giugno 2017, Siviglia, Spagna
  - Reynaerts A, Melotti P, Vermeulen F et al. "Implémentation d'une version non-invasive, contrôlée par imagerie, du test de sécrétion B-adrénergique de la sueur: aide au diagnostic et marqueur d'efficacité thérapeutique" 19<sup>e</sup> Colloque français des jeunes chercheurs, 20 février 2018, Institut Pasteur, Paris
  - Melotti P, Lecca P, Esposito V et al. "Measurements of beta adrenergic vs cholinergic sweat rates in single human sweat glands" North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 18–20, 2018, Denver, CO, US
  - Nguyen-Khoa T, Drummond D, Hatton A et al. "Beta-adrenergic sweat secretion measured by evaporimetry allows resolution of inconclusive diagnosis of cystic fibrosis" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
  - Nguyen-Khoa T, Hatto A, Schlatter J et al. "Béta-adrenergic sweat evaporimetric test in patients with an inconclusive diagnosis of cystic fibrosis" 42<sup>nd</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 5–8 June 2019, Liverpool, UK
  - Nguyen-Khoa T, Hatton A, Drummond D et al. "Combination of CFTR functional tests refine CFTR genetic analysis for inconclusive CF diagnosis" North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), 21–23 October 2020, virtual conference
  - FFC Project#6/2016 **"Understanding the mode of action of regulatory pathways controlling F508del-CFTR proteostasis and developing drugs that rescue F508del-CFTR by targeting these pathways synergistically"** Alberto Luini (Consiglio Nazionale delle Ricerche, Dipartimento Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli)
- Publications
- Hedge RN, Subramanian A, Pothukuchi P et al. "Rare ER protein misfolding-mistransfolding disorders: Therapeutic developments" *Tissue and Cell* 2017 Apr;49(2 Pt A):175–185
  - FFC Project#7/2016 **"Human intestinal organoids for detecting CFTR rescue molecules in human plasma samples"** Paola Melotti



(Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)

#### Abstracts

- Cald rer S, Baruzzi A, Vercellone S et al "Intestinal epithelial organoids contribute to supporting drug development and diagnosis" 17th Scientific Meeting "Organoids as models for disease and treatment in CF" September 21st + 22nd 2017 Schloss Waldhausen/Mainz"
- Cald rer S, Baruzzi A, Vercellone S et al. "A collection of intestinal epithelial organoids to support the development of drugs and diagnostic in cystic fibrosis by combining CFTR functional tests in personalized medicine" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Baruzzi A, Cald rer S, Lecca M et al. "CORVO: a software tool for computing volume of complex biological structures in medical images and videos" SIAM Conference on Imaging Science, Bologna, June 5-8, 2018
- Lecca P, Lecca M, Cald rer S et al. "Computing volumes of organoids from 3D confocal acquisition with CORVO" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFC), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA
- Lecca P, Lecca M, Cald rer S et al. "Computing volumes of organoids from 3D confocal acquisition with CORVO" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFC), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA
- Rescigno F, Farinazzo A, Esposito V et al. "CFTR-dependent bicarbonate transport in human rectal biopsies carrying CFTR variants" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFC), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA
- Pauro F, Rescigno F, Farinazzo A et al. "CFTR modulator therotyping and functional impact of the rare CFTR genotype W57G/A234D in a cystic fibrosis patient" 42nd European Cystic Fibrosis Conference, 5-8 June 2019, Liverpool, UK
- Farinazzo A, Rescigno F, Esposito V et al. "Selective bicarbonate transport defects in human rectal biopsies with CFTR gene variants" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia"
- Melotti P, Rescigno F, Farinazzo A et al. "Functional impact of the rare CFTR variants W57G/A234D and CFTR modulator therotyping in a CF patient" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia

- FFC Project#8/2016 "**Identification of the binding sites of CFTR correctors**" Oscar Moran (Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR, Genova)

#### Publications

- Amico G, Brandas C, Moran O et al. "Unravelling the Regions of Mutant F508del-CFTR More Susceptible to the Action of Four Cystic Fibrosis Correctors" Int. J. Mol. Sci. 2019 Nov 1;20(21). pii: E5463

#### Abstracts

- Moran O "Correction of the CFTR folding defect: a pessimistic view of the state of the art. Biophysical approaches to protein folding and disease" European Biophysics Societies Association 2017 Satellite Meeting, Edinburgh, United Kingdom, 20-21 July, 2017
- Moran O "Structural insights into the action of CFTR modulators" ECFS Conference, Sevilla, Spain, 7-10 June, 2017

- FFC Project#10/2016 "**Modulation of proteinkinase CK2 in the regulation of chaperone machinery leading the F508del-CFTR fate**" Mauro Salvi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova)

#### Publications

- Franchin C, Borgo C, Cesaro L et al "Re-evaluation of protein kinase CK2 pleiotropy: new insights provided by a phosphoproteomics analysis of CK2 knockout cells" Cellular and Molecular Life Sciences 2018 Jun;75(11):2011-2026.
- Borgo C, Vilardell J, Travain-Bosello V et al. "Dependence of HSP27 cellular level on protein kinase CK2 discloses novel therapeutic strategies" BBA - General Subjects 2018 Dec;1862(12):2902-2910

- FFC Project#11/2016 "**Myriocin potential as a phenotype-modifying herapeutical in cystic fibrosis**" Paola Signorelli (Dipartimento di Scienze della Salute, Ospedale San Paolo, Università di Milano)

#### Publications

- Caretti A, Vasso M, Bonezzi FT et al "Myriocin treatment of CF lung infection and inflammation: complex analyses for enigmatic lipids" Nautyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2017 Aug;390(8):775-790.
- Dei Cas M, Zulueta A, Mingione A et al. "An Innovative Lipidomic Workflow to Investigate the Lipid Profile in a Cystic Fibrosis Cell Line" Cells 2020 May; 9(5): 1197
- Mingione A, Dei Cas M, Bonezzi F et al. "Inhibition of Sphingolipid synthesis as a phenotype-modifying therapy in cystic fibrosis" Cellular Physiology and Biochemistry 2020 Jan 31;54(1):110-125

- Mingione A, Ottaviano E, Barcella M et al. "Cystic Fibrosis Defective Response to Infection Involves Autophagy and Lipid Metabolism" Cells 2020 Aug 6;9(8):E1845

- FFC Project#12/2016 "**Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate**" Loretta Ferrera (U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova)

#### Publications

- Ferrera L, Baroni D, Moran O "Lumacaftor-rescued F508del-CFTR has a modified bicarbonate permeability" Journal of Cystic Fibrosis 2019 Feb 6. pii: S1569-1993(18)30927-5

#### Abstracts

- Ferrera L, Gianotti A, Delpiano L et al. "Bicarbonate directly reduces the mucus micro-viscosity in primary bronchial cells monolayers" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Moran O, Baroni D, Ferrera L "Lumacaftor-rescued 508del-CFTR has a reduced bicarbonate permeability" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Baroni D, Moran O and Ferrera L "Lumacaftor-rescued F508del-CFTR has a reduced bicarbonate permeability" 15th ECFS Basic Science Conference, Loutraki (Greece), March 21-24, 2018
- Ferrera L, Gianotti A, Delpiano L et al. "Bicarbonate directly reduces the mucus micro-viscosity in primary bronchial cells monolayers" 15th ECFS Basic Science Conference, Loutraki (Greece), March 21-24, 2018

- FFC Project#1/2017 "**SpliceFix: fixing splicing defects in the CFTR gene through CRISPR/Cas9 technology**" Anna Cereseto (Centro per la Biologia Integrata - CIBIO, Università degli Studi di Trento)

#### Publications

- Maule G, Casini A, Montagna C et al. "Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing" Nature Communications, 2019 Aug 7;10(1):3556.
- Maule G, D'Arosio D, Cereseto "A Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing" International Journal of Molecular Sciences 2020, 21(11), 3903

#### Abstracts

- Maule G, Casini A, Montagna C et al. "Permanent repair of splicing defect in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing" European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) - Changing Modern Medicine: Stem Cells & Gene, Lousanne, Switzerland, October 16-19, 2018
- Maule G, Ramalho A, Arosio D et al. "Genome editing strategies to restore altered splicing events in cystic fibrosis" 12th European CF Young Investigators' Meeting (EYIM), Paris, Institute Pasteur, February 21-23, 2018 (best oral presentation)

- FFC Project#2/2017 "**Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue**" Luis Juan Vicente Galieta (Istituto Telethon di Genetica e Medicina - TIGEM, Napoli)

#### Publications

- Pesce E, Sondo E, Ferrera L et al. "The Autophagy Inhibitor Spautin-1 Antagonizes Rescue of Mutant CFTR Through an Autophagy-Independent and USP13-Mediated Mechanism" Frontiers in Pharmacology 2018 Dec 13;9:1464

- FFC Project#3/2017 "**Optimization of a new lead promoting the readthrough of nonsense mutations for the CFTR rescue in human CF cells**" Laura Lentini (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Sez. Biologia Cellulare, Università degli Studi di Palermo)

#### Publications

- Pibiri I, Lentini L, Melfi R et al. "Rescuing the CFTR protein function: Introducing 1,3,4-oxadiazoles as translational readthrough inducing drugs" European Journal of Medicinal Chemistry 2018 Nov 5;159:126-142.
- Campofelice A, Lentini L, Di Leonardo A et al. "Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)" Molecular Science 2019 Jul 6;20(13).
- Tutone M, Pibiri I, Lentini L et al. "Deciphering the Nonsense Readthrough Mechanism of Action of Ataluren: An in Silico Compared Study" ACS Medicinal Chemistry Letters 2019 Feb 7;10(4):522-527
- Melfi R, Cancemi P, Chiavetta R et al. "Investigating REPAIRv2 as a Tool to Edit CFTR mRNA with Premature Stop Codons" International Journal of Molecular Sciences 2020 Jul; 21(13): 4781
- Pibiri I, Melfi R, Tutone M et al. "Targeting Nonsense: Optimization of 1,2,4-Oxadiazole TRIDs to Rescue CFTR Expression and Functionality in Cystic Fibrosis Cell Model Systems International" Journal of Molecular Sciences 2020 Sep 3;21(17):E6420
- Tutone M, Pibiri I, Perriera R et al. "Pharmacophore-Based Design of

New Chemical Scaffolds as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)" ACS Med. Chem. Lett. 2020, 11, 5, 747–753

#### Abstracts

- Lentini, Melfi R, Tutone M et al. "Identification of a new molecule with readthrough activity to rescue CFTR protein function" 5<sup>o</sup> meeting biotecnologie, ricerca di base, interdisciplinare, traslazionale in ambito biomedico, Palermo, 5-6 luglio 2018
- Pibiri, Lentini L, Tutone M et al. "Rescuing CFTR Protein Function: 1,3,4-oxadiazoles versus 1,2,4-oxadiazoles as readthrough inducing drugs" Italian-Spanish-Portuguese joint Meeting in Medicinal Chemistry MedChemSicily, Palermo 17-18 Luglio 2018
- Lentini L "Rescuing mutant CFTR in cystic fibrosis by genetic drugs" XIII Summer School on Advanced Biotechnology, Orto Botanico, Palermo, 2-5 Settembre 2018
- Lentini L, Pibiri I, Melfi R "Rescue of nonsense mutations by novel readthrough molecules in biological model systems and in cystic fibrosis cells" Convegno AGI, 7-9 Settembre 2017, Cortona
- Campofelice A, Culetta G, Tutone M et al. "Uno studio comparativo in silico sui possibili target di Ataluren e analoghi farmaci promotori di readthrough di codoni di stop prematuri" Convegno congiunto delle Sezioni di Calabria e Sicilia 2019. Palermo, 1-2 marzo 2019
- Campofelice A, Ricco Galluzzo P, Lentini L et al. "New molecules as translational readthrough promoters of nonsense mutations: rescuing the CFTR protein" XXXIX Convegno nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, Torino, 8-12 settembre 2019
- Pibiri I, Pace A, Tutone M et al. "Derivati ossadiazolici per il trattamento della fibrosi cistica: readthrough di mutazioni nonsense" Convegno congiunto delle Sezioni di Calabria e Sicilia 2019. Palermo, 1-2 marzo 2019
- Campofelice A, Ricco Galluzzo P, Lentini L et al. "New molecules as translational readthrough promoters of nonsense mutations: rescuing the CFTR protein" XXXIX Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica, CDCO, 8-12 settembre 2019, Torino
- FFC Project#6/2017 "**Pharmacophore and pharmacokinetic filtering tools guiding for the design and synthesis of novel thiazole-containing and VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors**" Enrico Millo (Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica - CEBR, Università degli Studi di Genova)

#### Publications

- Parodi A, Righetti G, Pesce E et al. "Discovery of novel VX-809 hybrid derivatives as F508del-CFTR correctors by molecular modeling, chemical synthesis and biological assays" European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 208, 15 December 2020, 112833

#### Abstracts

- Righetti G, Liessi N, Pesce E et al. "Computational approaches for the design and chemical synthesis of novel F508del correctors in the treatment of cystic fibrosis" IX Giornate Italo-Francesi di Chimica, Genova, 16-18 aprile 2018
- Righetti G, Liessi N, Pesce E et al. "Scouting the mechanism of action of VX-809 and other F508del-CFTR correctors chemo-types by computational methods" European School of Medicinal Chemistry ESMEC, July, 1-5, 2018, Urbino, Italy
- FFC Project#8/2017 "**A novel Full Thickness Cystic Fibrosis model on a microfluidic chip to study pathogenic mechanisms and evaluate therapeutic strategies**" Paolo Netti (Centro per Biomateriali avanzati per la Sanità - CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia, Napoli)

#### Publications

- Genovese M, Borrelli A, Venturini A et al. "TRPV4 and purinergic receptor signalling pathways are separately linked in airway epithelia to CFTR and TMEM16A chloride channels" Journal of Physiology 2019 Oct 17. doi: 10.1111/JP278784
- Mazio C, Scognamiglio LS, De Cegli R et al. "Intrinsic Abnormalities of Cystic Fibrosis Airway Connective Tissue Revealed by an In Vitro 3D Stromal Model" Cells 2020 Jun 1;9(6):1371.

#### Abstracts

- Mazio C, Scognamiglio LS, Casale C et al. "Development of a 3D Full thickness cystic fibrosis model on chip" 41st European Cystic Fibrosis Conference, Belgrade, Serbia, 6-9 June 2018
- Scognamiglio LS, Mazio C, Casale C et al. "Development of a 3D full thickness cystic fibrosis model on chip" ThermoSchool2018, University of Trento, 18-22 June 2018
- FFC Project#9/2017 "**RNF5 inhibitors as potential drugs for Cystic Fibrosis basic defect**" Nicoletta Pedemonte (Istituto G. Gaslini, U.O.C. Genetica Medica, Genova)

#### Abstracts

- Tomati V, Sondo E, Pesce E et al. "Novel regulators of F508del-CFTR identified by means of a functional genomics approach in human bronchial epithelial cells: possible mechanisms of action" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFCF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA

#### Publications

- Amaral DM, Hutt DM, Tomati V et al. "CFTR processing, trafficking and interactions" Journal of Cystic Fibrosis 2020 Mar;19 Suppl 1:S33-S36
- Lopes-Pacheco M, Pedemonte N, Kicic A "Editorial: emerging therapeutic approaches for cystic fibrosis" Frontiers in Pharmacology, 2019 Nov 29;10:1440
- Pesce E, Pedemonte N, Leoni A et al. "Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives on basic defects underlying cystic fibrosis" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2020 Aug 9;30(21):127473
- FFC Project#11/2017 "**Development of a peptide derived from the enzyme PI3Ky as a new and effective potentiator of the mutant F508del-CFTR**" Alessandra Ghigo (Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università degli Studi di Torino)

#### Abstracts

- Ghigo A, Murabito A, Ren K et al. "Development of a PI3Ky-derived peptide as a standalone therapy to activate F508del-CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in Cystic Fibrosis" 15th ECFS Basic Science Conference – Loutraki (Greece) – March 21-24, 2018
- Murabito A, Ren K, Pirozzi F et al. "Exploiting a PI3Ky Mimetic Peptide as a standalone drug to restore CFTR function, reduce inflammation and limit obstruction of the respiratory tract in cystic fibrosis" SIBBM 2018, Frontiers in Molecular Biology, Rome, Italy, June 20-22, 2018
- Murabito A, Ren K, Pirozzi F et al. "Exploiting a PI3Ky Mimetic Peptide as a standalone drug to restore CFTR function, reduce inflammation and limit obstruction of the respiratory tract in cystic fibrosis" 15th ECFS Basic Science Conference – Loutraki (Greece) – March 21-24, 2018
- Murabito A, Ren K, Melotti P et al. "Exploiting a PI3KI mimetic peptide as a single molecule with three independent therapeutic benefits in cystic fibrosis" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFCF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA
- Murabito A, Li M, Melotti P et al. "Exploiting a PI3Ky mimetic peptide as a CFTR modulator in cystic fibrosis" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFCF), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
- Murabito A, Sala V, Butnarusu CS et al. "Inhaled therapy with a cell-permeable PI3KG mimetic peptide to limit bronchoconstriction and lung inflammation in cystic fibrosis" North American Cystic Fibrosis Conference (NAFCF), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
- Murabito A, Sala V, Butnarusu CS et al. "Inhaled therapy with a cell-permeable PI3Kgamma mimetic peptide to limit bronchoconstriction and lung inflammation in cystic fibrosis" 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia
- FFC Project#12/2017 "**Modulation of protein kinases in the regulation of chaperone machinery leading F508del-CFTR fate**" Mauro Salvi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova)

#### Publications

- D'Amore C, Salizzato V, Borgo C et al. "A Journey through the Cytoskeleton with Protein Kinase CK2" Curr Protein Pept Sci 2019 20(6):547-562.
- D'Amore C, Borgo C, Bosello-Travain V et al. "Deciphering the role of protein kinase CK2 in the maturation/stability of F508del-CFTR" BBA - Molecular Basis of Disease 2020 Mar 1;1866(3):165611

- FFC Project#2/2018 "**Lipid-based therapeutic strategies to optimize the effectiveness of innovative drugs to rescue F508del-CFTR**" Massimo Aureli (Università di Milano, Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale)

#### Publications

- Loberto N, Mancini G, Bassi R et al. "Sphingolipids and plasma membrane hydrolases in human primary bronchial cells during differentiation and their altered patterns in cystic fibrosis" Glycoconjugate Journal, 2020 Jul 14.
- Mancini G, Loberto N, Oliosio D et al. "GM1 as Adjuvant of Innovative Therapies for Cystic Fibrosis Disease" International Journal of Molecular Sciences 2020 Jun 24;21(12):4486
- FFC Project#4/2018 "**Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems**" Paola Barraja (Università degli Studi di Palermo, Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF, Lab. Sintesi degli Eterocicli), Paolo Scudieri (Telethon Institute of Genetics and Medicine, TIGEM)

### Publications

- Carbone A, Montalbano A, Musante I et al. "Furocoumarins as multi-target agents in the treatment of cystic fibrosis" *European Journal of Medicinal Chemistry* (2019), 180, 283

### Abstracts

- Scudieri P, Musante I, Spanò V et al. "Determination of drug sensitivity of orphan CFTR mutations: no patient left behind" *North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC)*, October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
- Spanò V, Montalbano A, Musante I et al. "Discovery of new second site correctors of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)" *XXVI National Meeting in Medicinal Chemistry, Milan, Ca' Granda*, July 16-19, 2019
- FFC Project#6/2018 **"Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis"** Luca Frulloni (Università degli Studi di Verona, Dip. Medicina, Unità di Gastroenterologia)

### Publications

- Calderr S, Bergamini G, Sandri A et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functional evaluations in a G542X+/IVS8Tn: T7/9 patient with acute recurrent pancreatitis" *World Journal of Clinical Cases*, 2019 Nov 26;7(22):3757-3764
- FFC Project#2/2019 **"Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis animal models"** Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)
- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. "Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for *Pseudomonas aeruginosa*" *European Respiratory Journal*, 2019 Oct 17. pii: 1802456.
- FFC Project#10/2019 **"Rescuing defective CFTR-F508del applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays"** Marco Rusnati (Dip. Medicina Molecolare e Traslocazione Sez. di Oncologia e Immunologia, Università di Brescia)

### Abstracts

- Uggeri M, Orro A, Urbinati C et al. "Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy XXVI" *National Meeting in Medicinal Chemistry, Milan, Ca' Granda*, July 16-19, 2019
- Rusnati M, D'Ursi P, Pedemonte N et al. "Recent Strategic Advances in CFTR Drug Discovery: An Overview" *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Apr; 21(7): 2407
- FFC Project#6/2019 **"Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue"** Luis Galiotta (Istituto Telethon di Genetica e Medicina - TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

### Publications

- Scudieri P, Musante I, Venturini A et al. "Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells" *Cells* 2020 Sep 13;9(9):2090
- FFC Project#12/2019 "Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX-770" *Monica Aversa* (Università di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale)

### Abstracts

- Franchi A, Pedrazzi M, De Tullio R et al. **"Identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity by shotgun proteomic analysis"** *43rd European Cystic Fibrosis Conference*
- FFC Project#11/2019 **"Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction"** Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)

### Publications

- Salvi M "Non-Histone Protein Methylation: Molecular Mechanisms and Physiopathological Relevance" *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(7):640-641
- FFC Project#TFCF **"Task Force for Cystic Fibrosis"**, Luis Galiotta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova)

### Publications

- Sondo E. et al. "Evaluation of a systems biology approach to identify pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride chan-

nel" *Journal of Cystic Fibrosis* 2016 Jul;15(4):425-35. doi: 10.1016/j.jcf.2016.02.009.

### Abstracts

- Pedemonte N. et al. "Task force for CF: an Italian drug discovery project to identify novel correctors and potentiators of F508del- CFTR" *12th ECFS Basic Science Conference*, 25-28 Marzo 2015, Algarve, Portugal
- Pedemonte N. et al. "Task Force for CF an Italian drug discovery project to identify novel correctors and potentiators of F508del-CFTR", *29th Annual North American Cystic Fibrosis Conference*, October 8-10, 2015, Phoenix (Arizona)
- Bandiera T, Pedemonte N, Caci E. et al. "Task Force for Cystic Fibrosis: identification of novel F508del-CFTR modulators" *13th ECFS Basic Science Conference*, 30 March - 02 April 2016, Pisa, Italy
- Galiotta L. "Scoperta di nuovi farmaci: il panorama della ricerca accademica" *39th European Cystic Fibrosis Conference*, 8 - 11 June 2016 | Basel, Switzerland"
- FFC Project#TFCF 2 **"Task Force for Cystic Fibrosis 2"**, Luis Galiotta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova)

### Abstracts

- Bandiera T, Pedemonte N, Caci E et al. "Task Force for Cystic Fibrosis: identification of novel F508del-CFTR modulators" *13th Basic Science Conference*, 30 March-2 April 2016, Pisa
- FFC Project#TFCF 3 **"Task Force for Cystic Fibrosis 3"**, Luis Galiotta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova)

### Abstracts

- Bertozzi F, Bandiera T, Di Fruscia P et al "Task force for cystic fibrosis (TFCF): discovery and characterization of potent F508del-CFTR modulators" *14th ECFS Basic Science Conference*, 29 March - 1 April 2017, Albufeira, Portugal
- Bandiera T, Sorana F, Berti F et al "Discovery and characterization of potent F508DEL-CFTR correctors" *North American Cystic Fibrosis Congress (NACFC)*, November 2-4, 2017, Indianapolis
- Bandiera T, Sorana F, Berti F et al. "New correctors rescue F508del-CFTR activity at a low nanomolar concentrations" *ECFC Basic Science Conference 2018*, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Liessi N, Pesce E, Braccia C et al. "Distinctive lipid signatures of bronchial epithelial cells associated with cystic fibrosis drugs, including Trikafta" *Journal of Clinical Investigation* 2020 Aug 20; 5(16): e138722.
- Brindani N, Gianotti A, Giovani S, et al. "Identification, Structure-Activity Relationship, and Biological Characterization of 2,3,4,5-Tetrahydro-1 H-pyrido[4,3- b]indoles as a Novel Class of CFTR Potentiators" *Journal of medicinal chemistry*, 2020 Oct 8;63(19):11169-11194
- Pedemonte N, Bertozzi F, Caci E et al. "Discovery of a picomolar potency pharmacological corrector of the mutant CFTR chloride channel" *Science Advances*, 21 Feb 2020: Vol. 6, no. 8, eaay9669

## 2. GENETICS Genetica

- FFC Project#6/2011 **"CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression"** Stefano Duga (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano)

### Publications

- Costantino L. et al. "Fine characterization of the recurrent c.1584 +18672A>G deep-intronic mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene" *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May;48(5):619-25

### Abstracts

- Rusconi D. et al. "Fine characterization of the recurrent c1584 +18672A>G deep-intronic mutation in the CFTR gene" *European Human Genetics Conference 2012*
- FFC Project#7/2011 **"New strategies for clinical application of non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma"** Maurizio Ferrari (Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano), Marina Cretich (Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano)

### Abstracts

- Galbiati S. et al. "Non-invasive prenatal diagnosis of genetic diseases by advanced technologies" *3rd Congress of the European Society of Predictive Medicine (EUSPM)*, 9th- 10th March 2013, Riolo Terme (RA), Italy
- Galbiati S. et al. "Non-invasive prenatal diagnosis of genetic diseases



- by advanced technologies" *Clinical Biochemistry* (2012) doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.030
- Galbiati S. et al. "Noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis" EU-ROMEDLAB, Milano, 19-23 May 2013
  - Galbiati S. et al. "Fetal DNA in maternal plasma: a noninvasive tool for prenatal diagnosis of genetic diseases by COLD-PCR and Innovative Microarray Substrates" International Meeting on Cell-free DNA, Copenhagen, 2013, 20th- 21st
  - FFC Project# 8/2011 **"A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis"** Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona), Luigi Picci (Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Padova)
- Abstracts
- Castellani C. et al. "Carrier screening and Neonatal screening for cystic fibrosis: a complex relationship" Presentazione a European Society of Human Genetics Conference, Milan 2014
  - Castellani C. et al. Poster "Population carrier screening reduces dramatically Cf incidence: evidence from a twenty years' experience" 28th North American Cf Conference, Atlanta October 9-11 2014
  - Castellani C. et al. Poster "Population carrier screening impairs positive predictive value of CF newborn screening: evidence from a twenty years' experience" 28th North American CF Conference, Atlanta October 9-11 2014
  - FFC Project# 9/2011 **"Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening"** Paola Mosconi (Ist. Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for Medical Research and Consumer Involvement), Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona)
- Publications
- Mosconi A. et al. "Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving a Citizens' jury in decisions on screening carrier" *Health Expectations* doi:10.1111/hex.12261
  - FFC Project#6/2012 **"CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpe U1)"** Franco Pagani (ICGEB, Trieste)
- Publications
- Ubbly I, Bussani E, Colonna A et al. "TMEM16A alternative splicing coordination in breast cancer" *Molecular Cancer*, 2013; 12: 75
  - FFC Project#5/2014 **"An RNA based approach based on ExSpeU1 for correction of CFTR splicing defects: analysis of efficacy in primary bronchial cells"** Franco Pagani (Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie - ICGEB, Trieste)
- Publications
- Balestra D, Scalet D, Pagani F et al. "An Exon-Specific U1snRNA Induces a Robust Factor IX Activity in Mice Expressing Multiple Human FIX Splicing Mutants" *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2016 Oct 4;5(10):e370
  - Rogalska ME, Tajnik M, Licastro D et al. "Therapeutic activity of modified U1 core spliceosomal particles" *Nature Communications*, 2016; 7: 11168.
  - FFC Project#9/2014 **"Cystic fibrosis modifier genes related to Pseudomonas aeruginosa lung disease"** Alessandra Bragonzi (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Iraqi Fuad (Clinical Microbiology and Immunology, Tel Aviv University)
- Publications
- Lorè NI. et al. "Host genetic diversity influences the severity of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the Collaborative Cross mice" *BMC Genet.* 2015 Aug 28;16:106
- Abstracts
- Lorè NI. et al. "Host genotype influences Pseudomonas aeruginosa susceptibility in the Collaborative Cross and inbred mouse populations", 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference – Georgia, October 9-11, 2014
  - Cigana C. et al. "Pseudomonas aeruginosa adaptation as a potential risk factor to the progression of cystic fibrosis airway disease in mice and humans", 38th ECFS Conference, Brussels, Belgium, 10-13 June 2015
  - FFC Project#10/2017 **"Alternative strategies for F508del-CFTR repair: novel targets for drug discovery approach in Cystic Fibrosis"** Giorgio Cozza (Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova)
- Publications
- Purzner T, Purzner J, Buckstaff T et al "Developmental phosphoproteomics identifies the kinase CK2 as a driver of Hedgehog signaling and a therapeutic target in medulloblastoma" *Science Signaling* 2018 Sep 11;11(547).
  - Cozza G, Zonta F, Dalle Vedove A et al "Biochemical and cellular mechanism of protein kinase CK2 inhibition by deceptive curcumin" *FEBS J* 2019 Oct 29
  - FFC Project#1/2018 **"Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF"** Andrea Armirotti (Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)
- Publications
- Braccia C, Tomati V, Caci E et al. "SWATH label-free proteomics for cystic fibrosis research" *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018 Oct 19. pii: S1569-1993(18)30855-5
  - Armirotti A, Tomati V, Matthes E et al. "Bioactive Thymosin Alpha-1 Does Not Influence F508del-CFTR Maturation and Activity" *SCI REP* 2019 Jul 16;9(1):10310
  - Niessi L, Pedemonte N, Armirotti A et al. "Proteomics and Metabonomics for Cystic Fibrosis Research" *International Journal of Molecular Sciences*, 2020 Aug; 21(15): 5439
- Abstracts
- Braccia C "Proteomic profiling of mutated-CFTR expressing cells identify new pharmacological targets for cystic fibrosis" 3rd IMASS Network Congress (Parma, Italy, May 2019)
  - Braccia C, Tomati V, Caci E et al. "Proteomic profiling of F508del-CFTR expressing cells to identify new pharmacological targets for cystic fibrosis" *Proteomic Forum* 2019, XIII. Annual Congress of the European Proteomics Association: From Genes via Proteins and their Interactions to Functions March 24–28, 2019, Potsdam, Germany"
  - FFC Project#7/2018 **"Revealing the microRNAs-transcription factors network in cystic fibrosis: from microRNA therapeutics to precision medicine (CF-miRNA-THER)"** Roberto Gambari (Università degli Studi di Ferrara, Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologia, Sez. Biochimica e Biologia molecolare), Roberto Corradini (Università degli Studi di Parma, Dip. di Chimica, Scienze della Vita e Sostenibilità ambientale)
- Publications
- Finotti A, Fabbri E, Lampronti I et al. "MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in Genetic Diseases" *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2019 Jan 4.
  - Gasparello J, Manicardi A, Casnati A et al. "Efficient cell penetration and delivery of peptide nucleic acids by an argininocalix[4]arene" *SCI REP* 2019 Feb 28;9(1):3036.
  - Manicardi A, Gambari R de Cola et al. "Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine" *Methods in Mol Biol* 2018;1811:49-63.
  - Gambari R "Targeting microRNAs in Cystic Fibrosis (CF)" *International Journal of Molecular Medicine* 44: supplement, 2019, page S22
  - Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. "Peptide Nucleic Acids for MicroRNAs Targeting" *Methods in Mol Biol.* *submitted*
  - Sultan S, Fabbri E, Tamanini A et al. "A PNA-based masking strategy for CFTR upregulation by targeting miR-145-5p binding sites of CFTR mRNA" *International Journal of Molecular Medicine* 44: supplement, 2019, page S22
  - Manicardi A, Gambari R, de Cola et al. "Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine" *Methods in Mol Biol*, 2018;1811:49-63.
  - Fabbri E, Tamanini A, Jakova T et al. "Treatment of human airway epithelial Calu-3 cells with a peptide-nucleic acid (PNA) targeting the microRNA miR-101-3p is associated with increased expression of the cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator () gene" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2 October 2020, 112876
  - Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. "Peptide Nucleic Acids for MicroRNA Targeting" *Methods Mol Biol.* 2020;2105:199-215
  - Gasparello J, Lomazzi M, Papi C et al. "Efficient delivery of MicroRNA and AntimiRNA molecules using an Argininocalix[4]arene macrocycle" *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2019 Dec 6;18:748-763
  - Sultan S, Rozzi A, Gasparello J et al. "A Peptide Nucleic Acid (PNA) Masking the miR-145-5p Binding Site of the 30UTR of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) mRNA Enhances CFTR Expression in Calu-3 Cells" *Molecules* 2020 Apr 5;25(7):1677
  - FFC Project#8/2018 **"In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3Ky-mediated regulation of CFTR"** Emilio Hirsch (Università degli Studi di Torino, Dip. Biotecnologia molecolare e Scienze per la Salute, Centro di Biotecnologia Molecolare)
- Publications
- Sala V, Murabito A, Ghigo A "Inhaled Biologicals for the Treatment of Cystic Fibrosis" *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2019;13(1):19-26

### Abstracts

- Sala V, Murabito A, Butnaru CS "Drug-like properties of an inhaled peptide-based therapy for Cystic Fibrosis" ECFS Hands-On Workshop on Epithelial Systems: Physiology and Pathophysiology, Lisbon, Portugal, 22-26 July, 2019
- Ghigo A, Sala V, Murabito A et al. "A PI3K $\gamma$  mimetic peptide enhances the therapeutic effects of CFTR correctors and potentiators via coordinated activation of luminal CFTR and basolateral CA $^{2+}$ -activated K $^{+}$  channels" North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), 21-23 October 2020, virtual conference
- Murabito A, Li M, Raimondi A et al. "Characterisation of the molecular mechanisms underlying PI3K $\gamma$ -dependent stabilisation of CFTR at the plasma membrane" 43rd European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (ECFC), virtual conference
- FFC Project#10/2018 "**Dissecting the mechanism of action of the TG2 inhibitor cysteamine on Cystic Fibrosis**" Mauro Piacentini (Università Roma Tor Vergata, Dip. Biologia), Luigi Maiuri (Istituto Europeo Ricerca Fibrosi Cistica - IERFC c/o Istituto San Raffaele, Milano), Giovanni Delogu (Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Gemelli, Istituto di Microbiologia, Roma)

### Publications

- Vilella VR, Esposito S, Ferrari E et al. "Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis" *Cell Death and Disease*, 2019 Mar 15;10(4):258
- Esposito S, Vilella VR, Ferrari E et al. "Genistein antagonizes gliadin-induced CFTR malfunction in models of celiac disease" *Aging* 2019 Apr 12. doi: 10.18632/aging.101888.
- Vilella VR, Speranza E, Ferrari E et al. "Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis" *Cell Death and Disease* (2019) 10:258
- FFC Project#11/2018 "**Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays**" Marco Rusnati (Università degli Studi di Brescia, Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Sez. Oncologia e Immunologia), Paola Fossa (Università degli Studi di Genova, Dip. di Farmacia), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie biomediche, CNR, Milano)

### Publications

- D'Ursi et al. "Exploitation of a novel biosensor based on the full-length human F508del-CFTR with computational studies, biochemical and biological assays for the characterization of a new Lumacaftor/Tezacaftor analogue" *Sensor and Actuators B: Chemical*, 2019 301:127131

### Abstracts

- Khabibulina L, Fossa P "La strategia di riposizionamento di farmaci: un utile approccio per identificare nuovi composti per la terapia di fibrosi cistica" Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutica, Università degli Studi di Genova, Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche (A.A. 2018-19)
- Uggeri M, Orro A, Urbinati C et al. "Multidisciplinary approaches to rescue CFTR impairments by drug repositioning" BITS 2019, Bioinformatics Italian Society, Annual Meeting 2019, June 26-28, Palermo
- Uggeri M, Orro A, Urbinati C et al. "Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy" XXVI National Meeting in Medicinal Chemistry, XII Young Medicinal Chemists' Symposium, Milan, Ca' Grandà, July 16-19, 2019
- FFC Project#13/2018 "**Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic**" Claudio Sorio (Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina)

### Publications

- Calderer S, Bergamini G, Sandri A et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functional evaluations in a G542X $\pm$ -IVS8Tn:7/9 patient with acute recurrent pancreatitis" *World Journal of Clinical Cases*, submitted

### Abstracts

- Kleinfelder K, Bertini M, Vicentini R et al. "Preliminary Evaluation of Corrector/Potentiator of CFTR in Patients with Cystic Fibrosis (CF) Homozygous for F508del mutation by Ratiometric Sweat Secretion Optical (RSSO) Test" 16<sup>th</sup> Annual Meeting European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group, 14-16 February 2019 - Tunis, Tunisia
- Kleinfelder K, Lecca P, Bertini M et al. "Use of Optical Ratiometric Rate Sweat test for evaluating CFTR function in cystic fibrosis patients" 12<sup>th</sup> European CF Young Investigators Meeting (EYIM), Paris, 27 February - 1 March 2019
- Lecca P, Bertini M, Vicentini R et al. "Multilinear regression analysis of sweat secretion volumes in cystic fibrosis patients" 23<sup>rd</sup> IEEE FRUCT Conference, Bologna 13-16 November 2018, Italy

- Sorio C "Nuovi approcci per la caratterizzazione funzionale di mutazioni in FC" 15<sup>th</sup> Meeting Nazionale della Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica (SIFC), 3-4 May 2019 – Rimini, Italy
- Sorio C "Potentiators and Correctors Therapy in Cystic Fibrosis" XLIII Congresso Nazionale Associazione Italiana per lo Studio del Pancreas (AISP), 19-21 Settembre 2019 – Verona, Italy
- Conti J, Kleinfelder K, Lotti V et al. "Functional characterisation of c.1584+18672bpA>G/2183AA>G CFTR variant in rectal organoids" 43<sup>rd</sup> European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (ECFC), virtual conference
- Lotti V, Kleinfelder K, Farinazzo A et al. "Response to ivacaftor of the rare CFTR variants W57G and A234D in intestinal organoids and Fisher Rat Tyroid (FRT) cells" 43<sup>rd</sup> European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (ECFC), virtual conference
- Sorio C, CFF Therotyping Group, Lotti V et al. "CFTR modulator therotyping using intestinal organoids from a CF patient and Fisher Rat Tyroid (FRT) cells expressing the rare CFTR variants W57G and A234D" Basic Science ECFS Conference 2020
- Sorio C, Lotti V, Kleinfelder K et al. "Functional impact of a rare / varying clinical consequence CFTR variants W57G/A234D CFTR genotype and therotyping using rectal organoids" AMP Europe 2020 - Clinical Genomics: Beyond the Somatic Mutation

## 3. MICROBIOLOGY & INFECTION

### Microbiologia e Infezione

- FFC Project #10/2011 "**Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control *Pseudomonas aeruginosa* infection in murine models**" Alessandra Bragonzi (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, San Raffaele Scientific Institut, Milano), Daniel Obrecht (Polyphor Ltd, Switzerland)

### Publications

- Cigana C, Bernardini F, Facchini M et al. "Efficacy of the novel antibiotic POL7001 in preclinical models of *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia" *Antimicrob Agents Chemother*, 2016 Jul 22;60(8):4991-5000

### Abstracts

- Bragonzi A. et al., "Evaluation Of Efficacy of POL7001 Against *Pseudomonas aeruginosa* in Lung Infection Models" 35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference- 6-9 June 2012, Dublin

- FFC Project #11/2011 "**Design, synthesis, in vitro biological evaluation and anti-biofilm activity of new beta-lactam and linezolid-like compounds as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* infections in cystic fibrosis patients**" Clementina Elvezia Cocuzza (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università di Milano-Bicocca), Lisa Cariani (Fond. IRCCS Ca' Granda, Osp. Maggiore Policlin., Dip. Pediatria, Milano), Daria Giacomini (Dip. Chimica, Università di Bologna)

### Publications

- Cervellati R. et al. "Monocyclic  $\beta$ -lactams as antibacterial agents: facing antioxidant activity of N-methylthio-azetidionones" *Eur J Med Chem*. 2013 Feb;60:340-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.024. Epub 2012 Dec 20.
- Galletti P. et al. "Antibacterial agents and cystic fibrosis: synthesis and antimicrobial evaluation of a series of N-thiomethylazetidionones" *Chem Med Chem*. 2011 Oct 4;6(10):1919-27. doi: 10.1002/cmdc.201100282. Epub 2011 Aug 10.
- Braschi I, Blasioli S, Fellet C, Lorenzini R, Garelli M, Giacomini D. "Persistence and degradation of new beta-lactam antibiotics in the soil and water environment" *Chemosphere* 2013; 93: 152-159
- Cervellati R, Galletti P, Greco E, Cocuzza C.E. et al. "Monocyclic betalactams as antibacterial agents: facing antioxidant activity of N-methylazetidionones" *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 60: 340-349

### Abstracts

- Soldati R. et al. "Synthesis of new bioactive betalactam derivatives (from dual activity compounds to integrin inhibitors through differentiating agents)" XXV Congresso Società Chimica Italiana

- FFC Project #12/2011 "**New drugs for *Burkholderia cepacia* from Antarctic bacteria**" Renato Fani (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze); Maria Luisa Tutino (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Federico II, Napoli); Paolo Rovero (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze)

### Publications

- Romoli R. et al. "Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass

- spectrometry" *J Mass Spectrom.* 2011 Oct;46(10):1051-9.
- Papaleo MC. et al. "Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria" *Biotechnol Adv.* 2012 Jan-Feb;30(1):272-93. Epub 2011 Jun 29
  - Fondi M. et al. "Draft Genome Sequence of the Volatile Organic Compound-Producing Antarctic Bacterium *Arthrobacter* sp. Strain TB23, Able To Inhibit Cystic Fibrosis Pathogens Belonging to the *Burkholderia cepacia* Complex" *J Bacteriol.* 2012 Nov;194(22):6334-5
  - Papaleo MC. et al. "Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria" *N Biotechnol.* 2013 Sep 25;30(6):824-38
  - Romoli R. et al. "GC-MS volatilomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. TB41" *Metabonomics*, June 2013
  - Fondi M et al. "Draft genomes of three Antarctic Psychrobacter strains producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens" *Mar Genomics* 2014 Feb;13:37-8. doi: 10.1016/j.margen.2013.12.009. Epub 2014 Jan 5.
  - Presta L, Inzucchi I, Bosi E et al. "Draft Genome Sequence of *Flavobacterium* sp. Strain TAB 87, Able To Inhibit the Growth of Cystic Fibrosis Bacterial Pathogens Belonging to the *Burkholderia cepacia* Complex" *Genome Announc.* 2016, May 19;4(3)
- Abstracts**
- Papaleo MC. et al. "Volatile organic compounds (VOCs) from antarctic communities bacteria inhibiting cystic fibrosis pathogens" 12<sup>th</sup> FIVS Congress: 70, Roma 24-27 settembre, 2012
  - Papaleo MC. et al. "Bioactive volatile organic compounds (VOCs) from antarctic sponges bacteria" EMB 2012, Bologna, Italy, April 10-12, 2012
  - Lentini L., Melfi R., Pibiri I. et al. "Azione readthrough di derivati del PTC124 su sistemi modello cellulari e in cellule di epitelio bronchiale-FC IB3.1" (CFTR F508/W1282X CONVEGNO SIFC 2013, Città del Mare-Terrasini, Palermo
- FFC Project #13/2011 "**Identification and characterization of novel drugs suppressing *Pseudomonas aeruginosa* virulence in chronic infection**" Livia Leoni (Dip. Biologia, Università di Roma Tre, Lab. Microbiol. Molecolare e Biotec. Microrganismi), Francesco Imperi (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma)
- Publications**
- Venturi V. et al. "The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*" *Mol Microbiol.* 2011 Dec;82(5):1060-70
  - Stano P. et al. "Semi-synthetic minimal cells as a tool for biochemical ICT" *BioSystems, Biosystems.* 2012 Jul;109(1):24-34
  - Imperi F. et al. "Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity" *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013 Apr 8
  - Imperi F. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine" *SciBX* 6(15), April 8, 2013
  - Frangipani E. et al. "The Gac/Rsm and cyclic -di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*" *Environ Microbiol.* 2014 Mar;16(3):676-88
  - Malvezzi Campeggi F. "Latest advances in drug repurposing for Cystic Fibrosis lung infections" *Journal of Postdoctoral Research Vol 2:2*
  - Rampioni G. et al. "The art of antibacterial warfare: Deception through interference with quorum sensing-mediated communication" *Bioorg Chem.* 2014 Aug;55:60-8. doi: 10.1016/j.bioorg.2014.04.005. Epub 2014 Apr 21.
- FFC Project#14/2011 "**Development of new host-defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: in vitro and in vivo studies**" Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma), Shai Yechiel (Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Israel)
- Publications**
- Luca V. et al. "Esculentin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" *Cell Mol Life Sci.* 2013 Aug;70(15):2773-86. doi: 10.1007/s00018-013-1291-7. Epub 2013 Mar 16.
  - Tia Sergev-Zarko et al. "A comparative study on the mechanism of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides" manuscript in preparation
  - Di Grazia A. et al. "D-Amino acids incorporation in the frog skin-derived peptide esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub> is beneficial for its multiple functions" *Amino Acids.* 2015 Jul 11. [Epub ahead of print]
  - Segev-Zarko L. et al. "Mechanisms of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides" *Biochem J.* 2015 Jun 1;468(2):259-70
  - Mangoni ML. et al. "Fighting microbial infections: A lesson from amphibian skin-derived esculentin-1 peptides" *Peptides.* 2015 Sep;71:286-95
  - Casciaro B, Loffredo MR, Luca V et al. "Esculentin-1a Derived Antipseudomonal Peptides: Limited Induction of Resistance and Synergy with Aztreonam" *Prot. Pept. Lett.* 2018 Oct 31. doi: 10.2174/0929866525666181101104649
- Abstracts**
- Luca V. et al. "Antipseudomonal activity of the amphibian antimicrobial peptide Esculentin (1.21) and plausible mode of action" 2014 FIVS-XIII Congress (Pisa, 24-27 September)
- FFC Project#16/2011 "**Achromobacter xylosoxidans an emerging pathogen in Cystic Fibrosis patients: from molecular characterization to development of innovative therapeutic strategies based on the antibacterial activities of *Bdellovibrio predator* bacteria**" Serena Quattrucci (Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Policl. Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma), Maria Trancassini (Dip. Salute Pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza" Roma), Serena Schippa (Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Univ. La Sapienza, Roma), Mauro Nicoletti (Dip. Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti)
- Publications**
- Iebba V. et al. "*Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates" *Front Microbiol.* 2014 Jun 5;5:280. doi: 10.3389/fmicb.2014.00280. eCollection 2014.
- FFC Project#24/2011 "**Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against *P. aeruginosa* lung infections and pharmacokinetics studies in animals**" Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena)
- Publications**
- Falciani C. et al. "Isomerization of an Antimicrobial peptide broadens antimicrobial spectrum to Gram-Positive bacterial pathogens" *PLoS One.* 2012;7(10):e46259
- FFC Project#7/2012 "**Metalloproteases released by *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains as virulent factors in CF: clinical correlations and chemical modulators**" Gabriella Bergamini (Dip. Patologia e Diagnostica, Sez. Patologia Generale, Università di Verona), Paola Melotti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOUI Verona)
- Publications**
- Leal T, Bergamini G, Huaux F, Panin N et al "Azithromycin Attenuates *Pseudomonas*-Induced Lung Inflammation by Targeting Bacterial Proteins Secreted in the Cultured Medium" *Frontiers in Immunology*, 2016 Nov 15;7:499
- Abstracts**
- Bergamini, G., Stellari, F., Sandri A. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* metalloproteases inhibition reduces lung damage in cystic fibrosis" 30<sup>th</sup> Cystic Fibrosis North American Conference, October 27-29, 2016, Orlando (Florida)
- FFC Project#8/2012 "**Investigation of cystic fibrosis airway microbiome in patients showing a severe decline in lung function and not responding to conventional antimicrobial therapy**" Annamaria Bevivino (Unità per lo Sviluppo Sostenibile e Innovazione Sistema Agro-Industriale, ENEA, Roma), Alessio Mengoni (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze), Giovanni Taccetti (Centro FC, Ospedale "A. Meyer", Firenze), Ersilia Fiscarelli (Laboratorio Microbiologia, Ospedale "Bambin Gesù", Roma), Graziana Manno (Dip. di Scienze Pediatriche, Università di Genova)
- Publications**
- Bevivino A. et al. "The evolving polymicrobial composition in the airways of patients with cystic fibrosis: implications for disease progression and clinical management" [www.currentmedicalliterature.com](http://www.currentmedicalliterature.com) 2013 CML-Cystic fibrosis
  - Paganin P. et al. "Changes in cystic fibrosis airway microbial community associated with a severe decline in lung function" *PLoS One.* 2015 Apr 21;10(4):e0124348
  - Bacci G. et al. "Pyrosequencing Unveils Cystic Fibrosis Lung Microbiome Differences Associated with a Severe Lung Function Decline" *PLoS ONE* 2016 Jun 29;11(6):e0156807. doi: 10.1371
- Abstracts**
- Bevivino A. et al. "Investigation of cystic fibrosis airway microbiome in patients showing a severe decline in lung function and not responding to conventional antimicrobial therapy" 36<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), Lisboa, 12-15 June, 2013
  - Bevivino A. et al. "Microbiota composition in the airways of cystic fibrosis with severe decline in lung infection" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, USA



- Fiscarelli E, Paganin P, Tuccio V, Chianciani M, Taccetti G, Lucidi V, De Alessandri A, Mengoni A, Bevivino A. "Airway microbiota in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function" 24<sup>th</sup> ECCMID 10-13 May, Barcelon, Spain
- FFC Project#9/2012 **"Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*"** Eliodoro Pizzo (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Lab. Struttura e Funzione delle Proteine, Università Federico II, Napoli)
  - Publications
    - Pizzo E, Cafaro V, Di Donato A et al. "Cryptic Antimicrobial Peptides: Identification Methods and Current Knowledge of their Immunomodulatory Properties" *Current Pharmaceuticals Design* 2018;24(10):1054-1066.
- FFC Project#10/2012 **"A very promising drug against *Burkholderia cenocepacia*"** Giovanna Riccardi (Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia)
  - Publications
    - Udine C. et al. "Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems" *PLoS One*. 2013;8(1):e55112
    - Perrin E. et al. "A census of RND-superfamily proteins in the *Burkholderia* genus" *Future Microbiol.* 2013 Jul;8:923-37
- FFC Project#12/2012 **"Naturally occurring antimicrobials to counteract lung infections in cystic fibrosis patients: Cecropin A-Melittin (CA-M) hybrid peptides and polymyxins"** Alba Silipo (Dip. Scienze Chimiche, Università "Federico II", Napoli), Giovanni Di Bonaventura (Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara)
  - Publications
    - Di Lorenzo F. et al. "Persistent cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa* strain RP73 exhibits an under-acetylated LPS structure responsible of its low inflammatory activity" *Mol Immunol.* 2014 May 21. pii: S0161-5890(14)00084-4. doi: 10.1016/j.molimm.2014.04.004. [Epub ahead of print]
    - Kukavica-Ibrulj I. et al. "Assessing *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and the Host Response Using Murine Models of Acute and Chronic Lung Infection" *Methods Mol Biol.* 2014;1149:757-71. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0\_58.
    - Pompilio A, Ciavardelli D, Crocetta V et al. "*Stenotrophomonas maltophilia* virulence and specific variations in trace elements during acute lung infection: implications in cystic fibrosis" *PLoS ONE*, 2014 Feb 28;9(2):e88769
  - Abstracts
    - Vitiello G. et al. "Investigation of liposome-based membranes formed by lipopolysaccharides and their interaction with hybrid antimicrobial peptides" Poster Communication. XXIV Congresso della Società Italiana di Spettroscopia Neutronica (SISN), Milano 11-12 Settembre 2013.
    - Silipo A. "STD NMR as a tool for studying protein-ligand interactions", PhD Lecture in Gliwice, Department of Organic Chemistry, Bioorganic Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland <http://www.chemiabiorganiczna.polsl.pl/default.htm>
    - Molinaro A. "Structural Glycoscience", 4-6 Nov 2013, Grenoble, France, COST Training School nell'ambito della COST Action BM1003. <http://www.cost-bm1003.info/>
- FFC Project#13/2012 **"Role of high affinity zinc transporters in *Pseudomonas aeruginosa* ability to colonize the inflamed cystic fibrosis lung"** Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)
  - Publications
    - D'Orazio M. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* capability to colonize the CF lung may be favored by its remarkable ability to recruit zinc under conditions of limited metal availability" *Journal of Cystic Fibrosis Suppl Goteborg* 13, S3
    - D'Orazio M. et al. "The capability of *Pseudomonas aeruginosa* to recruit zinc under conditions of limited metal availability is affected by inactivation of the ZnuABC transporter" *Metallomics*. 2015 Jun;7(6):1023-35
    - Mastropasqua MC, D'Orazio M, Cerasi M et al, "Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore" *Molecular Microbiology* 2017 Nov;106(4):543-561. doi: 10.1111/mmi.13834
  - Abstracts
    - D'Orazio M. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* capability to colonize the CF lung may be favored by its remarkable ability to recruit zinc under conditions of limited metal availability" Poster presented at the ECFS 2014 Meeting, Goteborg
- FFC Project#17/2012 **"The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation"** Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara, Lab. Medicina Molecolare), Licia Totani (Dip. Farmacologia Traslazionale, Consorzio "Mario Negri" Sud, Chieti), Marco Marchisio (Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università Chieti-Pescara), Paolo Moretti (Centro FC, Teramo)
  - Publications
    - Pierdomenico AM et al. "MicroRNA-181b regulates ALX/FPR2 receptor expression" *J Biol Chem.* 2015 Feb 6;290(6):3592-600
  - Abstracts
    - Bergamini G. et al. "Azitromycin effect on lung inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* released proteases as shown by in vivo imaging in IL-8 transiently transgenized mice" 28<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Atlanta, October 9-11, 2014
- FFC Project#8/2013 **"Exploring pyrazinamide derivatives as novel *Pseudomonas aeruginosa* inhibitors: unexploited antibacterial molecules for a new antibiotics target"** Federica Briani (Dip. Bioscienze-Università degli Studi di Milano)
  - Abstracts
    - Bergamini G. et al. "Azitromycin effect on lung inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* released proteases as shown by in vivo imaging in IL-8 transiently transgenized mice" 28<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Atlanta, October 9-11, 2014
- FFC Project#10/2013 **"Anti-virulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*: identification of antibiofilm drugs and development of inhalable Niclosamide and Flucytosine formulations"** Livia Leoni (Dip. di Scienze, Università "Roma Tre"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II), Francesca Imperi (Dip. di Biologia e Biotecnologia, Università "La Sapienza", Roma), Ersilia Fiscarelli (Ospedale e Ist. di ricerca "Bambin Gesù", Lab. Microbiologico fibrosi cistica, Rome)
  - Publications
    - D'Angelo I. et al. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 30: 92-111
    - Imperi F. et al. "Antivirulence activity of azitromycin in *Pseudomonas aeruginosa*" *Frontiers in Microbiology* 2014;5: 178
    - Llamas MA. Et al. "Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress response, iron transport and pathogenicity" *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38:569-97
    - Lo Sciuto A, Martorana AM, Fernandez-Pinar R et al. "*Pseudomonas aeruginosa* LptE is crucial for LptD assembly, cell envelope integrity, antibiotic resistance and virulence" *Virulence* 2018;9(1):1718-1733
    - Imperi F, Fiscarelli EV, Visaggio D et al. "Activity and Impact on Resistance Development of Two Antivirulence Fluoropyrimidine Drugs in *Pseudomonas aeruginosa*" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019 Mar 11;9:49.
  - Abstracts
    - Costabile G. et al. "Repositioning niclosamide for anti-virulence therapy against *P. aeruginosa* lung infections: development of nanosuspensions for inhalation" 1st Italian CF Young Investigator Meeting January 16th - 17th 2015, Rome, Italy
    - Visaggio D. et al. "Exopolysaccharide-mediated aggregation promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" 1st Italian CF Young Investigator Meeting January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
    - Costabile G., d'Angelo I., Miro A. et al. "Inhalable hyaluronan/mannitol microparticles for local delivery of flucytosine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" 9th A.It.U.N. Annual Meeting From food to pharma: the polyedral nature of polymers Milan, 2015, May 25-27
    - Costabile G., d'Angelo I., Mitidieri E. et al. "Repositioning 5-flucytosine for anti-virulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable hyaluronan/ mannitol dry powders Micro and Nanotechnologies to overcome biological barriers" Thematic workshop of Controlled Release Society Italy Chapter. Naples 2015, November 12-14 th
    - Costabile I., d'Angelo I., D'Emmanuele R. et al. "Drug reposition for anti-virulence therapy of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: development of inhalable formulations" XXIII National Meeting on Medicinal Chemistry, Salerno, 2015 September 6-9
- FFC Project#11/2013 **"Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application"** Eugenio Notomista (Dip. Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)
  - Abstracts
    - D'Orazio M. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* capability to colonize the CF lung may be favored by its remarkable ability to recruit zinc under conditions of limited metal availability" Poster presented at the ECFS 2014 Meeting, Goteborg

### Publications

- d'Angelo I. et al. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014 Aug 30;75C:92-111

### Abstracts

- d'Angelo I. et al. "Nano-Embedded Microparticles for Lung Delivery of Antimicrobial Peptides against *P. Aeruginosa* Infections: Overcoming Lung Barriers" In: 2<sup>nd</sup> International Conference on Nanotechnology in Medicine, University College London, Royal Free Hospital Campus, United Kingdom 26-28 February 2014. Selected as oral presentation
- d'Angelo I. et al. "Inhale dry powders for local administration of antimicrobial peptides against *P. aeruginosa*: overcoming lung barriers" International Conference and Workshop on Biological Barriers, 16-21 February, 2014, Saarland University, Germany
- Pane K., Cafaro V., Avitabile A. et al. "Development of new carrier protein for AMPs production" 5th International Meeting on Anti-microbial Peptides, Burlington House, London. 7-8 September, 2015

- FFC Project#12/2013 "**Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials**" *Alessandro Pini* (Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena)

### Publications

- Brunetti J. et al. "A Novel Phage-Library-Selected Peptide Inhibits Human TNF- $\alpha$  Binding to Its Receptors" *Molecules* 2014; 19:7255-7268
- Falciani C. et al. "Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase" *AminoAcids* 2014; 45(5):1403-1407
- Brunetti J. et al. "In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate" *Sci Rep.* 2016 May 12;6:26077. doi: 10.1038/srep26077
- Ceccherini F. et al. "Antimicrobial activity of levofloxacin-M33 peptide conjugation or combination" *MedChemComm* 2016,7,258

### Abstracts

- Brunetti J. et al. "A novel synthetic antimicrobial peptide. A new weapon for multidrug resistant bacteria?" 14<sup>th</sup> Naples Workshop on Bioactive Peptides, June 12-14, 2014
- Roscia G. et al. "In vitro and in vivo characterization of a novel synthetic antimicrobial peptide for lung infections and sepsis" 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy

- FFC Project#10/2014 "**Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy**" Bevivino Annamaria (Technical Unit for Sustainable Development and Innovation of Agro-Industrial System, ENEA Casaccia Research Center, Lab. Microbiology, Rome), Alessio Mengoni (Dip. Biologia, Università di Firenze), Giovanni Taccetti (Dip. di pediatria, Centro FC, Ospedale "A. Meyer", Firenze), Ersilia Vita Fiscarelli (Laboratorio Microbiologia, Ospedale "Bambin Gesù", Roma), Alessandra De Alessandri (Dip. di Scienze Pediatriche, Centro FC, Università di Genova, Istituto "G. Gaslini")

### Abstracts

- Bacci G. et al. "Exploring the airway microbiome of cystic fibrosis patients: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy" 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16-17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
- Bevivino A. "Taxonomic and functional analysis of the airway samples from cystic fibrosis patients with lower and higher pulmonary function decline", 3 World Congress on Targeting Microbiota, October 21-23, 2015 Institute Pasteur, Paris
- Bacci G. et al. "Taxonomic signatures of CF airway microbiota distinguish between patients with lower and higher pulmonary function decline", 38th ECFs Conference, Brussels, Belgium, 10-13 June 2015
- Bacci G. et al. "Taxonomic and functional metagenomic analysis of sputum samples from stable CF patients with lower and higher pulmonary function decline", NACFC 2015

- FFC Project#11/2014 "**Development and preclinical testing of a novel antimicrobial peptide to treat *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infections**" Maria Luisa Mangoni (Dip. di Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma)

### Publications

- Cappiello F. et al. "Esculentin-1a-Derived Peptides Promote Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Internalized in Bronchial Cells of Cystic Fibrosis Patients and Lung Cell Migration: Biochemical Properties and a Plausible Mode of Action" *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Sep 26. pii: AAC.00904-16
- Ghosh A. et al. "NMR structure and binding of esculentin-1a (1-21)NH<sub>2</sub> and its diastereomer to lipopolysaccharide: Correlation with biological functions" *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1858(4):800-12

- Chen C, Mangoni ML, Di YP "In vivo therapeutic efficacy of frog skin-derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pulmonary infection" *Sci. Rep.* 2017 Aug 17;7(1):8548. doi: 10.1038/s41598-017-08361-8.
- Loffredo MA, Ghoshb A, Harmouchec N et al "Membrane perturbing activities and structural properties of the frog-skin derived peptide Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub> and its Diastereomer Esc(1-21)-1c: Correlation with their antipseudomonal and cytotoxic activity" *BBA – Biomembranes* 1859 (2017) 2327–2339
- Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML "A Novel In Vitro Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration" *Journal of Visualized Experiments* 2018 Mar 17;(133)

### Abstracts

- Luca V. et al. "Anti-Pseudomonal activity of the amphibian antimicrobial peptide Esculentin (1-21) and plausible mode of action", FISV 2014-XIII Congress (Pisa, 24-27 September)
- Mangoni ML et al. "Esculentin-1a(1-21) and its diastereomer: frog skin-derived peptides with anti-Pseudomonal activities" Oral Presentation at RegPep Symposium 2016, Rouen July 2016. France
- Mangoni ML, McDermott AM, Di YP "Derivatives of the frog-skin peptide esculentin-1a with promising activity against infections induced by *Pseudomonas aeruginosa*" Boulder Peptide Symposium, 25-28 September, 2017, Boulder Colorado (US)
- Mangoni ML, de la Fuente J, McDermott AM et al. "How to struggle *Pseudomonas aeruginosa*-associated infections? A lesson from the amphibian skin-derived peptide Esculentin(1-21) and its diastereomer" Cost Action CM1407, 5th MC/WG, Malta, 1-2 March, 2018
- Mangoni ML, Chen C, Cappiello F et al. "In vivo efficacy of esculentin-1a-derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia" 16th Naples Workshop on Bioactive Peptides (June 7-9)

- FFC Project#12/2014 "**Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application**" Eugenio Notomista (Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli "Federico II")

### Publications

- d'Angelo I. et al. "Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide" *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015 Aug 22;135:717-725
- Oliva R, Chino M, Pane K et al "Exploring the role of unnatural amino acids in antimicrobial peptides" *SCI REP* 2018 Jun 11;8(1):8888.
- Oliva R, Chino M, Lombardi A et al. "Similarities and differences for membranotropic action of three unnatural antimicrobial peptides" *Journal of Peptide Science* 2020 Aug;26(8):e3270

### Abstracts

- Avitabile A. e al. "The activation peptide of human pepsinogen is an antimicrobial peptide" IMAP Meeting 2015
- Pane K. et al. "Development of new carrier protein for AMPs production" IMAP Meeting 2015

- FFC Project#14/2014 "**Development of BMAP18 as a peptide drug in the lung bacterial infections: a study to improve its effectiveness in the CF pulmonary environment**" Marco Scocchi (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste)

### Publications

- Mardirossian M, Pompilio A, Degaspero M et al. "D-BMAP18 Antimicrobial Peptide Is Active In vitro, Resists to Pulmonary Proteases but Loses Its Activity in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection" *Frontiers in Chemistry* 2017 Jun 19;5:40
- Mardirossian M, Pompilio A, Crocetta V et al. "In vitro and in vivo evaluation of BMAP-derived peptides for the treatment of cystic fibrosis-related pulmonary infections" *Amino Acids*, 2016 Sep;48(9):2253-60

- FFC Project#18/2014 "**GSH inhalation therapies in CF: how useful, how safe? Set-up of a CF murine model for monitoring of inflammation in vivo and assessment of convenient alternatives**" Alessandro Corti (Dip. di Ricerca Trasazionale NTMS - Lab. Patologia Generale, Università di Pisa)

### Publications

- Corti A, Griese M, Hector A et al. "Increasing sputum levels of gamma-glutamyltransferase may identify cystic fibrosis patients who do not benefit from inhaled glutathione", *Journal of Cystic Fibrosis*, 2017, May;16(3):342-345
- Corti A, Pompella A, Bergamini G et al. "Glutathione inhalation treatments in cystic fibrosis: the interference of airway  $\gamma$ -Glutamyltransferase" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014 Jan 15;189(2):233-4

- Corti A, Belcastro E, Dominici S et al. "The dark side of gamma-glutamyltransferase (GGT): Pathogenic effects of an 'antioxidant' enzyme" *Free Radical Biology and Medicine* 2020 Sep 9;160:807-819

#### Abstracts

- Corti A. et al. "Increasing levels of sputum gamma-glutamyltransferase may be a contraindication to glutathione inhalation therapies in cystic fibrosis" 3rd Joint Meeting of Pathology and Laboratory Medicine. 4-6 October 2016 - Montesilvano (Pescara), Italy
- Corti A, Melotti P, Sorio C et al. "Effects of increasing levels of gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis airways on glutathione inhalation therapies" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 1 April 2017, Albufeira, Portugal

- FFC Project# 19/2014 **"Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent inflammatory activation exacerbates the P. aeruginosa-driven inflammatory response"** Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

#### Publications

- Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S et al. "Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications" *Antioxidant & redox signaling* 22 (12), 995-1019

- FFC Project#20/2014 **"Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease"** Eliodoro Pizzo (Lab. di Struttura e Funzione delle Proteine-SFP, Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Emilia Maria Pedone (Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, C.N.R Napoli)

#### Abstracts

- Bosso A. et al. "A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating proteins of *Phytolacca dioica* L." IMAP 2015, 5th International Meeting on Antimicrobial Peptides Burlington House, London September 7-8, 2015
- Pane K. et al. "Development of new carrier protein for AMPs production" IMAP 2015, 5th International Meeting on Antimicrobial Peptides Burlington House, London September 7-8, 2015
- Avitabile A. et al. "The activation peptide of human pepsinogen is an antimicrobial peptide" IMAP 2015, 5th International Meeting on Antimicrobial Peptides, Burlington House, London September 7-8, 2015
- Pane K. et al. "A novel carrier protein for AMPs production" 5th Antimicrobial International Meeting on Antimicrobial Peptides, Burlington House 7th-8th September 2015
- Verrillo M. et al. "Recombinant production and labelling of peptides with N-terminal cysteine residue" 15th Naples Workshop on Bioactive Peptides. June 23-25, 2016, Naples, Italy
- Bosso A. et al. "Cryptic anti-microbial peptides in human secretory proteins: the case of H11β (235-261)." 15th Naples Workshop on Bioactive Peptides. June 23-25, 2016, Naples Italy
- Pane K. et al. "Novel antimicrobial weapons hidden in human secretoma" Altant Conference May 18-20, 2016 Utrecht, Netherlands
- Verrillo MV. et al. "Efficient production and labeling of recombinant peptides endowed with a N-terminal cysteine residue" *Proteine*, March, 30 – April, 1 2016 Bologna, Italy
- Zanfardino A. et al. "Two new cryptic antimicrobial peptides identified in the human Apolipoprotein" FISV, 20-23 september 2016 Rome, Italy

- FFC Project#21/2014 **"Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis"** Antonio Recchiuti (Dip. di Scienza Clinica e Sperimentale e Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento-CeSI, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara)

#### Publications

- Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A et al. "Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection" *Mucosal Immunology* 2017 Apr 19. doi: 10.1038/mi.2017.36.

#### Abstracts

- Codagnone M. et al. "Resolvin D1 enhances resolution of inflammation caused by chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection" 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 2 April 2016, Pisa, Italy
- Recchiuti A, Isopi E, Mattosio D et al. "Harnessing resolution mediators as innovative therapeutics for cystic fibrosis" 2nd World Congress on Pharmacology & Toxicology, Roma, 16-18 agosto 2018

- FFC Project#23/2014 **"Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in cystic fibrosis"** Mario Romano (Dip. di Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. di Medicina Molecolare, Università G. D'Annunzio, Chieti-Pescara)

#### Publications

- Plebani R, Tripaldi R, Lanuti P et al. "Establishment and long-term cul-

ture of human cystic fibrosis endothelial cells" *Laboratory Investigation* 2017 Jul 31. doi: 10.1038/labinvest.2017.74

- Totani L, Plebani R, Piccoli A et al "Mechanisms of endothelial cell dysfunction in cystic fibrosis" *Biochimica et Biophysica Acta* 2017 Aug 25. pii: S0925-4439(17)30293-4

- FFC Project#24/2014 **"The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies"** Sandro Sonnino (Dip. di Biochimica Medica e Medicina Traslazionale, Università di Milano)

#### Abstracts

- Schiumarini D. et al. "Involvement of GBA2 in the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis" 29th North American Conference, Phoenix, October 8-10, 2015
- Schiumarini D. et al. "Involvement of glycosphingolipid -hydrolase in the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis" 39th ECFS Conference, Basilea, 8-11 June 2016 - Riunione dei Giovani Biochimici dell'Area Milanese, Gargnano, 2016 - 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 2 April 2016, Pisa, Italy
- Schiumarini D, Loberto N, Bassi R et al. "*Pseudomonas aeruginosa* infection induces alterations in plasma membrane lipid composition in cystic fibrosis airway cells: molecular mechanisms and therapeutic options for CF lung pathology" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 01 April 2017, Albufeira, Portugal

- FFC Project#10/2015 **"A CF, IL-8 transgenic mouse model for the in vivo, long-term monitoring of the anti-inflammatory role of metallo-protease inhibitors and antibiotics with mechanisms of action similar to that of azithromycin"** Maria M. Lleò (Dipartimento di Patologia e Diagnostica, sezione di Microbiologia - Università di Verona)

#### Publications

- Sandri A, Ortombina A, Boschi F et al "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors reduces lung inflammation in CF mice" *Virulence* 2018;9(1):1008-1018.

#### Abstracts

- Sandri A et al. "Monitoraggio in vivo dell'infiammazione polmonare in topi CFTR-/-" 39th European Cystic Fibrosis Conference, 8-11 June 2016, Basel, Switzerland
- Sandri A, Stellari F, Boschi F "Matrix metalloprotease inhibitors as anti-inflammatory therapy in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 1 April 2017, Albufeira, Portugal

- FFC Project#11/2015 **"Genetically diverse mice as innovative model for cystic fibrosis"** Nicola Ivan Lorè (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive - Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

#### Abstracts

- Lorè N, Sipione B, Mott R et al. "Host genetic traits influence the severity of respiratory infections by *Pseudomonas aeruginosa*" The 30th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27–29, 2016
- Lorè N, Sipione B, Mott R et al. "Novel disease models to capture pathological complexity of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection" 40th European Cystic Fibrosis Conference Seville, Spain, 7–10 June 2017
- Lorè I, Iraqi F, Bragonzi A "Novel genetically-diverse mouse models to unravel the complexity of the lung infections" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 01 April 2017, Albufeira, Portugal
- Sipione B, Brombin C, Mott R et al. "Tracking the complexity of the inflammatory response to *P. aeruginosa* respiratory infection" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis

- FFC Project#12/2015 **"Anti-inflammatory and anti-bacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models"** Francesca Berlutti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive - Università La Sapienza, Roma)

#### Publications

- Valenti P, Frioni A, Rossi A et al "Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" *Biochemistry and Cell Biology* 2017 Feb;95(1):41-47. doi: 10.1139/bcb-2016-0050. Epub 2016 Jul 8
- Cutone A, Lepanto MS, Rosa L et al. "Aerosolized bovine lactoferrin counteracts infections, inflammation and iron dysbalance in a cystic fibrosis mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection" *International Journal of Molecular Science* 2019, 20(9), 2128

#### Abstracts

- Gramaccioni C., Procopio A., Malucelli E. et al. "Combined use of x-ray



fluorescence microscopy, phase contrast imaging and nanotomography for high resolution quantitative Fe mapping in inflamed cells" 13th International Conference on X-Ray Microscopy, 15-19 August 2016, Oxford, United Kingdom

- FFC Project#13/2015 **"Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials"** Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze – Università degli Studi di Milano)

#### Publications

- Ferrara S, Falcone M, Macchi R et al. "The PAPI-1 pathogenicity island-encoded small RNA PesA influences *Pseudomonas aeruginosa* virulence and modulates pyocin S3 production" PLoS ONE 2017 Jun 30;12(6):e0180386

- FFC Project#14/2015 **"Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy"** Anna Maria Bevivino (Unità Tecnica per lo Sviluppo e Innovazione del Sistema Agroindustriale - ENEA Agenzia Nazionale Italiana per le Nuove Tecnologie, Energie e Sviluppo Economico Sostenibile, Laboratorio di Microbiologia, Centro Ricerche Casaccia, Roma), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università di Firenze); Giovanni Taccetti (Dip. di Pediatria, Centro fibrosi cistica, Firenze), Ersilia Vita Fiscarelli (Ospedale dei Bambini, Istituto di Ricerca Bambino Gesù, Lab. di Microbiologia per fibrosi cistica), Alessandra De Alessandri (Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Scienze Pediatriche, Pneumologia e Allergologia - Istituto G. Gaslini, Genova)

#### Publications

- Bacci G, Mengoni A, Fiscarelli E et al. "A Different Microbiome Gene Repertoire in the Airways of Cystic Fibrosis Patients with Severe Lung Disease" International Journal of Molecular Sciences 2017 Jul 29;18(8).  
- Bevivino A, Bacci G, Drevinek P et al. "Deciphering the Ecology of Cystic Fibrosis Bacterial Communities: Towards Systems-Level Integration" Trends Mol Med 2019 pii: S1471-4914(19)30185-6.

#### Abstracts

- Bacci G., Paganin P., Segata N. et al. "The distribution pattern of metabolic modules and antibiotic resistance genes reveals differences in the airway microbiome of cystic fibrosis patients" 13th ECFs Basic Science Conference, 30 March – 02 April 2016, Pisa, Italy  
- Bacci G. et al. "Studio del microbioma delle vie aeree FC in pazienti con diverso andamento polmonare" 39th European Cystic Fibrosis Conference, 8 – 11 June 2016, Basel, Switzerland  
- Bacci G, Armanini F, Taccetti G et al. "Longitudinal metagenomic analysis of the airways of patients with cystic fibrosis to uncover microbial signatures of lung disease progression" 40th European Cystic Fibrosis Conference, Seville, Spain, 7–10 June 2017  
- Bevivino A, Bacci G, Armanini F et al. "Time-resolved metagenomic identifies key features in the co-evolution of bacterial communities and cystic fibrosis" XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017  
- Bacci G, Armanini F, Taccetti G et al. "Taxonomic and functional microbial signatures of cystic fibrosis lung disease" 41st European Cystic Fibrosis Conference, Belgrade, Serbia, 6-9 June 2018

- FFC Project#16/2015 **"Development of metallo-enzyme inhibitors to overcome *P. aeruginosa* antibiotic-resistance in cystic fibrosis patients"** Sandra Gemma (Dipartimento di Biotecnologia, Chimica e Farmacia - Università di Siena), Jean-Denis Docquier (Dip. di Biotecnologia Medica - Università di Siena)

#### Publications

- Brindisi M. et al. "Targeting clinically-relevant metallo-β-lactamases: from high-throughput docking to broad-spectrum inhibitors", Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry DOI: 10.3109/14756366.2016.1172575

- FFC Project#17/2015 **"Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients"** Daniela Erica Ghisotti (Dipartimento di Bioscienze - Università degli Studi di Milano)

#### Abstracts

- Ghisotti D., Forti F., Briani F. "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients" Phage Therapy World Congress 2016, Parigi, 2-3 giugno 2016

- FFC Project#19/2015 **"Inhalable formulations of new molecules effective against *Burkholderia cenocepacia*: from in vitro to in vivo applications"** Giovanna Riccardi (Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallan-

zani, Pavia), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia - Università degli Studi Federico II, Napoli)

#### Publications

- Scoffone VC. et al. "Discovery of new diketopiperazines inhibiting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing in vitro and in vivo" Sci Rep. 2016 Sep 1;6:32487. doi: 10.1038/srep32487  
- Israyilova A, Buroni S, Forneris F et al. "Biochemical Characterization of Glutamate Racemase-A New Candidate Drug Target against *Burkholderia cenocepacia* Infections" PLoS ONE 2016 Nov 29;11(11):e0167350. doi: 10.1371/  
- Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G et al. "*Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches" Frontiers in Microbiology 2017 Aug 22;8:1592. doi: 10.3389/fmicb.2017.01592. eCollection 2017  
- Pellosi Silva D, d'Angelo I, Maiolino S et al. "In vitro/in vivo investigation on the potential of Pluronic® mixed micelles for pulmonary drug delivery" European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics 2018 Jun 8. pii: S0939-6411(17)30904-9  
- Hogan AM, Scoffone VC, Makarov V et al. "Competitive Fitness of Essential Gene Knockdowns Reveals a Broad-Spectrum Antibacterial Inhibitor of the Cell Division Protein FtsZ." Antimicrob Agents Chemother, 2018 Nov 26;62(12).  
- Costabile G, Provenzano R, Azzalin A et al. "PEGylated mucus-penetrating nanocrystals for lung delivery of a new FtsZ inhibitor against *Burkholderia cenocepacia* infection" Nanomedicine 2020 Jan;23:102113

#### Abstracts

- Buroni S, Gislason A, Scoffone VC. et al. "A new promising bactericidal compound against *Burkholderia cenocepacia*" XX International *Burkholderia cepacia* Working Group, Columbus USA, 27-30 Aprile 2016  
- Buroni S., Brackman G., Scoffone VC. et al. "New antivirulence compounds affecting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing in vitro and in vivo" XX International *Burkholderia cepacia* Working Group, Columbus USA, 27-30 Aprile 2016  
- Scoffone VC, Gislason AS, Hogan AM et al. "Fighting burkholderia cenocepacia through a new promising bactericidal molecule" 7th FEMS Microbiology Congress 2017, 9-13 July, 2017, Valencia  
- Scoffone VC, Fumagalli M, Spiga L et al. "Molecular investigations on the quorum sensing synthase Cepl of *Burkholderia cenocepacia*" XXXII SIMGBM Congress, September 17-20, 2017, Palermo

- FFC Project#21/2015 **"Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection"** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia - Università di Roma Tre, Roma)

#### Publications

- Hijazi S, Visca P, Frangipani E "Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes" Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017 Jan 26;7:12. doi: 10.3389/fcimb.2017.00012  
- Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A et al. "The ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*" J Bacteriol 2017 Aug 28  
- Porcaro F, Bonchi C, Ugolini A et al. "Understanding the biomimetic properties of gallium in *Pseudomonas aeruginosa*: an XAS and XPS study" Dalton Trans 2017 May 30;46(21):7082-7091  
- Costabile G, d'Angelo I, d'Emmanuele R et al. "Development of inhalable hyaluronan/mannitol composite dry powders for flucytosine repositioning in local therapy of lung infections" J Control Release, 2016 Sep 28;238:80-91

- FFC Project#14/2016 **"Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials"** Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

#### Publications

- Falcone M, Ferrara S, Rossi E et al. "The Small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Biofilm Development and Motility through Post-transcriptional Modulation of AmrZ" Frontiers in Microbiology 2018 Feb 15;9:238  
- Carloni S, Macchi R, Sattin S et al. "The small RNA Real: a novel regulatory element embedded in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing networks" Environmental Microbiology 2017 Oct;19(10):4220-4237  
- Ferrara S, Rossi A, Ranucci S et al. "The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Airway Infections" mSphere, September/October 2020 Volume 5 Issue 5 e00909-20

- FFC Project#15/2016 **"Cystic fibrosis modifier genes related to**

***Pseudomonas aeruginosa* lung disease** Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Lorè NI, Cigana C, Sipione B et al. "The impact of host genetic background in the *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections" Mammalian Genome 2018 Jun 12.
- Bragonzi A, Horati H, Kerrigan L et al. "Inflammation and host-pathogen interaction: cause and consequence in cystic fibrosis lung disease" Journal of Cystic Fibrosis, 2018 Mar;17(2S):S40-S45.

#### Abstracts

- Lorè NI, Sipione B, Mott R et al. "Host genetic traits influence the severity of respiratory infections by *Pseudomonas aeruginosa*" 30<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference – Orlando, October 27-29, 2016
- Lorè NI, Sipione B, Mott R et al. "Novel disease models to capture pathological complexity of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection" ECFS 2017 - The 40th European Cystic Fibrosis Conference– Siviglia, June 18-21, 2017
- Lorè NI, Iraqi F, Bragonzi A "Novel genetically-diverse mouse models to unravel the complexity of the lung infections" 2017 ECFS Basic Science Conference – Albufeira 29-1 April, 2017
- Lore NI, Sipione B, Mott R et al. "Novel disease models to capture pathological complexity of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection" CFF Research Conference – Stevenson, June 18-21, 2017
- Lorè NI, Sipione B, He G et al. "Novel genetically-diverse mouse models to unravel genetic modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis

- FFC Project#16/2016 "**Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients**" Daniela Erica Ghisotti (Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano)

#### Publications

- Forti F, Roach DR, Cafora M et al. "Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models" Antimicrob Agents Chemother 2018 Mar 19. pii: AAC.02573-17

#### Abstracts

- Cafora M, Forti F, Roach D et al. "Phage Therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in Cystic Fibrosis patients" Convegno SIMGBM, 17-20 Settembre 2017, Palermo

- FFC Project#17/2016 "**Development of inhalable particles for optimal delivery of a potent antimicrobial molecule in *Pseudomonas aeruginosa* infected lungs**" Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologia Medica, Università di Siena)

#### Publications

- Puglia M, Landi C, Gagliardi A et al. "The proteome speciation of an immortalized cystic fibrosis cell line: New perspectives on the pathophysiology of the disease" Journal of Proteomics 2018 Jan 6;170:28-42
- Brunetti J, Roscia G, Lampronti I et al. "Immunomodulatory and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo of novel antimicrobial candidate" Journal of Biological Chemistry, 2016 Dec 2;291(49):25742-25748
- Quercini L, Brunetti J, Riolo G et al. "An Antimicrobial Molecule Mitigates Signs of Sepsis in Vivo and Eradicates Infections From Lung Tissue" FASEB Journal 2020 Jan;34(1):192-207.

- FFC Project#4/2017 "**Phenotyping new genetically-diverse mouse models mirroring the complexity of the Cystic Fibrosis pathology**" Nicola Ivan Lorè (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Ospedale San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Lorè NI, Sipione B, He G et al. "Collaborative cross mice yield modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection in human lung disease" Genome Research, submitted

#### Abstracts

- Sipione B, De Fino I, Viviani F et al. "New-genetically diverse mice to mirror complexity of cystic fibrosis respiratory infections" 12th European CF Young Investigator Meeting, Paris (France), 21-23 February, 2018
- Sipione B, Lorè NI, Rossi G et al. "F508DEL-CFTR in genetically diverse collaborative cross mice yield cystic fibrosis phenotypes" North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), 21-23 October 2020, virtual conference

- FFC Project#13/2017 "**Induction of viable but non-culturable forms, possibly responsible for treatment failure, in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Role of antibiotics and antibiotic concentrations**" Francesca Biavasco (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche)

#### Publications

- Mangiaterra G, Amiri M, Di Cesare A et al. "Detection of viable but non-culturable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis by qPCR: a validation study" BMC Infection Disease, 2018 Dec 27;18(1):701. doi: 10.1186/s12879-018-3612-9
- Mangiaterra G, Cedraro N, Citterio B et al. "Tobramycin induces the Viable But Non-Culturable state in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm" Journal of Cystic Fibrosis, submitted
- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiasica S et al. "Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in an In Vitro Biofilm Model" Antibiotics, 2020 Jul 10;9(7):399

#### Abstracts

- Mangiaterra G, Cedraro N, Citterio B et al. "Induction of Viable but non-culturable *P. aeruginosa* in *in vitro* Biofilms. Role of sub-inhibitory antibiotic concentrations" Biofilm 8, Aarhus University, Aarhus C, Denmark, 27-29 May 2018
- Mangiaterra G, Cedraro N, Laudadio E et al. "Anti-persistence activity of the natural alkaloid berberine against *Pseudomonas aeruginosa*" Meeting of the Italian Society of Chemistry-Marche region section, September 2019
- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiasica S et al. "Induction of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin in *in vitro* biofilms" 33rd Meeting of the Italian Society of General Microbiology and Microbial Biotechnology (SIMGBM), June 2019
- Mangiaterra M, Manso E, Cirilli N et al. "Effectiveness of qPCR for reliable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis lung infection diagnosis" International Congress of Microbiology and Infectious Disease (ICMID), Rome, November 2019, *Invited speaker*

- FFC Project#14/2017 "**Preclinical study of a host-directed therapy based on Metformin and bioactive liposomes for the control of multidrug resistant *P. aeruginosa* infection**" Maurizio Fraziano (Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata)

#### Publications

- Nisini R, Poerio N, Mariotti S et al. "The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases" Frontiers in Immunology 2018 Feb 5;9:155
- Poerio N, De Santis F, Rossi A et al. "Liposomes loaded with phosphatidylinositol 5- phosphate improve the antimicrobial response to *P. aeruginosa* in impaired macrophages from Cystic Fibrosis patients and limit airway inflammatory response" Frontiers in Immunology, 2020; 11: 532225

- FFC Project#15/2017 "**Frog skin-derived peptides for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection and bronchial epithelial repair: advanced in vitro and in vivo characterization and development of polymeric nanoparticles for lung delivery**" Maria Luisa Mangoni (Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università La Sapienza)

#### Publications

- Casciaro B, d'Angelo I, Zhang X et al. "Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: *in Vitro* and *in Vivo* Studies" Biomacromolecules, 2019 Apr 23. doi: 10.1021/acs.biomac.8b01829.
- Casciaro B, Cappiello F, Loffredo MR et al. "The Potential of Frog Skin Peptides for Anti-Infective Therapies: the Case of Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub>" Curr Med Chem 2019, Jul 21. doi: 10.2174/0929867326666190722095408
- Casciaro B, Lin Q, Afonin S et al. "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and expression of virulence genes by selective epimerization in the peptide Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub>" FEBS J 2019 Oct;286(19):3874-3891
- Cappiello F, Ranieri D, Carnicelli V et al. "Bronchial epithelium repair by Esculentin-1a-derived antimicrobial peptides: involvement of metalloprotease-9 and interleukin-8, and evaluation of peptides' immunogenicity" SCI REP 2019 Dec 12;9(1):18988
- Casciaro B, Cappiello F, Verrusio W et al. "Antimicrobial Peptides and their Multiple Effects at Sub-Inhibitory Concentrations" Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1264-1273.
- Casciaro B, Ghirga F, Quaglio D et al. "Inorganic Gold and Polymeric Poly(Lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Novel Strategies to Ameliorate the Biological Properties of Antimicrobial Peptides" Curr Protein Pept Sci 2020;21(4):429-438

#### Abstracts

- Cappiello F, Carnicelli V, Angioi A et al. "Esc(1-21) and its diastereomer: antipseudomonal frog-skin derived peptides with multiple immunomodulatory properties" 16th Naples Workshop on Bioactive Peptides (June 7-9)

- Cappiello F, Carnicelli V, Angioi M et al. "The frog skin-derived peptides Esc(1-21) and its diastereomer: are they promoters of airway epithelium repair?" (Poster) XV FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita) Congress, Sapienza University of Rome, Italy, September 18-21, 2018
- Cappiello F, Carnicelli V, Angioi M et al. "Esc(1-21) and its diastereomer: antipseudomonal frog-skin derived peptides with multiple immunomodulatory properties" 16th Naples Workshop on Bioactive Peptides, June 7-9, 2018 Naples
- Mangoni ML "How to control *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia? A lesson from derivatives of the amphibian skin peptide esculentin-1a" XV FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita) Congress, Sapienza University of Rome, Italy, September 18-21, 2018
- Mangoni ML, Cappiello F, Casciano B et al. "How to control *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia and keratitis? A lesson from the amphibian skin-derived peptide Esculentin(1-21) and its diastereomer" 35th European Peptide Symposium, 26-31 August 2018, Dublin City University, Ireland
- Cappiello F, Casciaro B, Loffredo MR et al. "Improvement of antimicrobial and immunomodulatory properties by two L-to D-amino acid substitutions in the frog-skin peptide Esc(1-21)" COST Action CM1407 Meeting dedicated to Early Career Investigators, Brussels, Belgium, 18-19 February, 2019
- Casciaro B, Loffredo MR, Lin Q et al. "Esculentin 1-1a derivatives as new antipseudomonal agents: limited induction of resistance and inhibition of biofilm formation" 9th International Meeting on Antimicrobial Peptides, Utrecht University, The Netherlands, August 28-30, 2019
- Loffredo MR, Casciaro B, Dutta D et al. "Encapsulation of esculentin-1a derived peptides into PLGA nanoparticles and their immobilization to contact lens for treatment and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections" 9th International Meeting on Antimicrobial Peptides, Utrecht University, The Netherlands, August 28-30, 2019
- Casciaro B, Loffredo MR, Mangoni ML "Anti-pseudomonas esculentin-1a derivatives versus conventional antibiotics: limited induction of resistance and inhibition of biofilm formation" 13th Cystic Fibrosis European Young Investigators' meeting (EYIM), February 27-28, March 1, Institut Pasteur, Paris
- Mangoni ML, d'Angelo I, Ungaro F et al "Esculentin-1a derived peptides: Potential new drugs to target *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection?" COST Action CM1407 Final Meeting, December 13-14, 2018, Tenerife, Canary Island, Spain
- FFC Project#16/2017 **"Pre-clinical effectiveness of three human cryptic antibiofilm peptides (GVF27, HVA36 and IMY47): efficacy against lung pathogens and studies in animals"** Eliodoro Pizzo (Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II)
  - Publications
  - Pane K, Cafaro V, Avitabile A et al. "Identification of novel cryptic multifunctional antimicrobial peptides from the human stomach enabled by a computational-experimental platform" ACS Synthetic Biology 2018 Sep 21;7(9):2105-2115
  - Bosso A, Di Maro A, Cafaro V et al. "Enzymes as a Reservoir of Host Defence Peptides" Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1310-1323
  - Gaglione R, Pizzo E, Notomista E et al. "Host Defence Cryptides from Human Apolipoproteins: Applications in Medicinal Chemistry" Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1324-1337
  - Zanfardino A, Bosso A, Gallo G et al. "Human apolipoprotein E as a reservoir of cryptic bioactive peptides: The case of ApoE 133-167" Journal of Peptide Science 2018 Jul;24(7):e3095
- FFC Project#17/2017 **"Identification of new efflux pumps inhibitors able to contrast nontuberculous mycobacterial infections in cystic fibrosis patients"** Stefano Sabatini (Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia)
  - Publications
  - Felicetti T, Machado D, Cannalire R et al. "Modifications on C6 and C7 positions of 3-phenylquinolone efflux pump inhibitors led to potent and safe anti-mycobacterial treatment adjuvants." ACS Infectious Diseases 2019 Mar 25. doi: 10.1021/acscinfed.9b00041
  - Abstracts
  - Cannalire R, Felicetti T, Nizi MG et al. "Design, synthesis, and biological evaluation of functionized 3-phenylquinolones to block efflux machinery in non-tuberculous mycobacteria" Italian-Spanish-Portuguese Joint Meeting in Medicinal Chemistry, MedChemSicily2018, Palermo, July 17-20, 2018
  - Felicetti T, Cannalire R, Machado D et al. "New potent and safer functionized 3-phenylquinolones as efflux inhibitors of the *Mycobacterium avium*" Italian-Spanish-Portuguese Joint Meeting in Medicinal Chemistry, MedChemSicily2018, Palermo, July 17-20, 2018
  - Felicetti T, Machado D, Cannalire R et al. "C-6/C-7 functionalization of the 3-phenylquinolone scaffold to obtain potent nontuberculous efflux inhibitors" Merck & Elsevier Young Chemists Symposium, Rimini (Italy), November 19-21, 2018
  - FFC Project#18/2017 **"Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection"** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre)
    - Publications
    - Hijazi S, Visaggio D, Pirollo M et al "Antimicrobial activity of Gallium compounds on ESKAPE pathogens" Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018 Sep 10;8:316
    - Abstracts
    - Hijazi S, Frangipani E, Visaggio D et al. "Hijacking bacterial iron metabolism using the transition metal gallium" XIV Congress of the Italian Federation of Life Sciences (FISV) - Sapienza, Rome, Italy September, 2018
    - Hijazi S, Pirollo M, Visaggio D et al. "A comparative study on the antimicrobial activity of gallium compounds against ESKAPE pathogens" 32th SIMGBM Congress, Microbiology 2017, Palermo (Italy), September 17-20, 2017
    - Pirollo M, Visaggio D, Frangipani E et al. "Bioluminescence-based biosensor for the detection of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin" (Poster) XIV Congress of the Italian Federation of Life Sciences (FISV) - Sapienza, Rome, Italy September, 2018
    - Pirollo M, Visaggio D, Frangipani E et al. "Bioluminescence-based biosensor for the detection of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin" Cortona Procarioni 2018. Cortona (Italy), May 2018
    - FFC Project#19/2017 **"A longitudinal metagenomic analysis to uncover microbial signatures of CF lung disease: unravelling host-microbial community interactions in humans and animal models"** Annamaria Bevivino (ENEA, Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Lab. Sostenibilità, Qualità e Sicurezza delle Produzioni Agroalimentari, Centro Ricerche Casaccia, Roma)
      - Publications
      - Bacci G, Taccetti G, Dolce D et al. "Untargeted Metagenomic Investigation of the Airway Microbiome of Cystic Fibrosis Patients with Moderate-Severe Lung Disease" Microorganism 2020 Jul 4;8(7):1003.
      - Abstracts
      - Bacci G, Taccetti G, Dolce D et al. "Environmental microbial signatures revealed by metagenomic analysis of the airways of cystic fibrosis patients" XV FISV Congress, Sapienza University Rome, 18-21 September 2018
      - Bevivino A "The airway microbiome in cystic fibrosis: where are we now?" MicrobiotaMI, Milan, 5-7 November 2018
      - Bevivino A, Bacci G, Taccetti G et al. "The personalised temporal dynamics of microbiome in the airways of cystic fibrosis patients" 42nd European Cystic Fibrosis Conference, 5-8 June 2019, Liverpool, UK
      - FFC Project#20/2017 **"Establishment of animal model to investigate pathogenesis of infection by *Mycobacterium abscessus* complex members in cystic fibrosis patients"** Enrico Tortoli (Unità Batteri Patogeni Emergenti, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele, Milano)
        - Publications
        - Riva C, Tortoli E, Cugnata F et al. "A New Model of Chronic *Mycobacterium abscessus* Lung Infection in Immunocompetent Mice" International Journal of Molecular Sciences 2020 Sep; 21(18): 6590
        - Abstracts
        - Riva C, Gona F, Cigana C et al. "Murine model of chronic *M. abscessus* respiratory infection" North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), November 2-4, 2017, Indianapolis, IN, USA
        - Riva C, Gona F, Cigana C et al. "Characterization of murine model of chronic *M. abscessus* respiratory infection" ERS International Congress, September 16-18, Paris, France
        - FFC Project#22/2017 **"In vivo validation of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections using the new Zebrafish (*Danio rerio*) animal model"** Anna Silvia Pistocchi (Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)
          - Publications
          - Cafora M, Deflorian G, Forti F et al. "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model" SCI REP, 2019 Feb 6;9(1):1527
          - Brix A, Cafora M, Aureli M et al. "Animal Models to Translate Phage Ther-



apy to Human Medicine" International Journal of Molecular Sciences 2020 May 25;21(10):3715

- Cafora M, Foti F, Briani F et al. "Phage Therapy Application to Counteract *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Zebrafish Embryos" Journal of Visualized Experiments 2020 May 12;(159)

#### Abstracts

- Cafora M, Forti F, Deflorian G "In vivo validation of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections using zebrafish as a new model for cystic fibrosis" European Human Genetics Conference, Milan, June 16–19, 2018
- Cafora M, Forti F, Deflorian G et al. "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model" 2nd Italian Zebrafish Meeting, Pisa, Italy, 30 January - 1 February, 2019
- Cafora M, Forti F, Deflorian G et al. "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model" III Workshop Biometra, Milano, 24 settembre 2018
- Cafora M, Forti F, Deflorian G et al. "In vivo validation of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections using zebrafish as a new model for cystic fibrosis" ZDM11, Leiden, The Netherlands, July 10-13, 2018

- FFC Project#14/2018 "**Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus–bacteria interactions in cystic fibrosis patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy**" Guido Antonelli (Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, La Sapienza Roma; Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I)

#### Publications

- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. "Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients Affected by Cystic Fibrosis" Viruses, 2019 Jun 21;11(6). Pii: E571. doi: 10.3390/v11060571
- Antonelli G "No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy" JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS 2020 Sep; 19(5): 837–838
- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. "Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients affected by Cystic Fibrosis" Viruses 2019 Jun 21;11(6):571
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. "Differential toll like receptor expression in cystic fibrosis patients' airways during rhinovirus infection Journal of Infection" 2020 Nov;81(5):726-735
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. "No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy" JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS 2020 Sep;19(5):837-838

#### Abstracts

- Bitossi C, Viscido A, Nonne C et al. "Age and genotype related Rhinovirus infection rate in Cystic Fibrosis patients attending a Regional Reference Center" SIM 2019 (Rome September 2019)
  - Bitossi C, Scordio M, Viscido A et al. "Differential respiratory tract expression of SARS CoV 2 ACE 2 receptor and of serine proteases and relationship with IFN response in cystic fibrosis patients" 47° Congresso nazionale SIM, 19-21 settembre 2019, Roma
  - Bitossi C, Viscido A, Bibbolino G et al. "Aspergillus spp. isolation from patients attending the Regional Reference Center for Cystic Fibrosis University Hospital "Policlinico Umberto I", Rome" XLIX CONGRESSO NAZIONALE AMCLI – Rimini, 7-10 novembre 2020
  - Bitossi C, Viscido A, Nonne C et al. "Age- and genotype-related Rhinovirus infection rate in Cystic Fibrosis patients attending a Regional Reference Center" 47° Congresso Nazionale SIM, 18-21 settembre 2019, Roma
- FFC Project#15/2018 "**Off-target effects of CFTR-modulators in pre-clinical infection models**" Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano)

#### Abstracts

- Mancini G, Caslini C, Alcalà-Franco B et al. "Impact of CFTR modulators on susceptibility to antibiotics and CFTR expression during *Pseudomonas aeruginosa* infection" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)

- FFC Project#17/2018 "**Drug repurposing for antivirulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa***" Livia Leoni (Università Roma Tre, Dip. Scienze, Lab. Microbiologia dei microrganismi)

#### Publications

- D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N et al. "Identification of FDA-Approved Drugs as Antivirulence Agents Targeting the pqs Quorum-Sensing System of *Pseudomonas aeruginosa*" Antimicrob Agents Chemother 2019 Oct 24;62(11).
- Mellini M, Di Muzio E, D'Angelo F et al. "In silico Selection and Experi-

mental Validation of FDA-Approved Drugs as Anti-quorum Sensing Agents" Frontiers in Microbiology 2019 Oct 10;10:2355

- Baldelli V, D'Angelo F, Pavoncello V et al. "Identification of FDA-approved antivirulence drugs targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing effector protein PqsE" Virulence 2020 Dec;11(1):652-668

- FFC Project#18/2018 "**In vitro and in vivo efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens**" Eugenio Notomista (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia)

#### Publications

- Siepi M, Donadio G, Dardano P et al. "Denatured lysozyme-coated carbon nanotubes: a versatile biohybrid material" SCI REP 2019 Nov 12;9(1):16643

#### Abstracts

- Bosso A, Gaglione R, Ambrosio R et al. GVF27 and IMY47: two novel human peptides with marked anti-biofilm and immune-modulatory propensities 9th International Meeting on Antimicrobial Peptides (IMAP 2019), Utrecht University, The Netherlands, August 28 - 30, 2019
- Masino A, Cafaro V, Siepi M et al. "Luciferin and aminoluciferin as environment sensitive fluorescent labels for recombinant and synthetic peptides" 9th International Meeting on Antimicrobial Peptides (IMAP 2019), Utrecht University, The Netherlands, August 28 - 30, 2019

- FFC Project#19/2018 "**New weapons against Mycobacterium abscessus and other nontuberculous mycobacteria**" Maria Rosalia Pasca (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia Lazzaro Spallanzani, Lab. Microbiologia molecolare)

#### Publications

- Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR et al. "Mycobacterium abscessus, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients" International Journal of Molecular Sciences, submitted

#### Abstracts

- Sammartino JC, Degiacomi G, Chiarelli LR et al. "Fighting Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis patients" Microbiology 2019, XXXIII SIMGBM Congress, University of Florence, June 19-22, 2019
- Degiacomi G, Sammartino JC, Urbani A et al. "New weapons are necessary to fight Mycobacterium abscessus" ECFS Digital 2020 Conference, 24-25 September 2020
- Sammartino JC, Degiacomi G, Urbani A et al. "Fighting Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis patients" BIFI 2020, 3-5 February, 2020, Zaragoza, Spain
- Veschetti L, Sandri A, Passarelli Mantovani R et al. "Hypermutation as an evolutionary mechanism for *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis lung infection" 43rd European Cystic Fibrosis Conference – 2020

- FFC Project#20/2018 "**Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections**" Maurizio Sanguinetti (Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma)

#### Publications

- Velino C, Carella F, Adamiano A et al. "Nanomedicine Approaches for the Pulmonary Treatment of Cystic Fibrosis" Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 2019 Dec 17;7:406

#### Abstracts

- Carella F, Velino C, Degli Esposti L et al. "Antimicrobial-loaded calcium phosphate nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for cystic fibrosis related infections" World Biomaterials Congress WBC 2020 Virtual, 11-15 december 2020

- FFC Project#15/2019 "**Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens**" Fiorentina Ascenzi (Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma)

#### Publications

- Ghirga F, Stefanelli R, Cavinato L et al. "A novel colistin adjuvant identified by virtual screening for ArnT inhibitors" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2020 Sep 1;75(9):2564-2572
- Quaglio D, Mangoni ML, Stefanelli R et al. "ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors" Journal of Organical Chemistry 2020 Aug 21;85(16):10891-10901

- FFC Project#18/2019 "**Investigating *Achromobacter xylosoxidans* pathogenicity and clinical role in CF lung infection**" Maria M, Lleò (Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona)

#### Abstracts

- Veschetti L, Sandri A, Passarelli Mantovani R et al. "Hypermutation as an evolutionary mechanism for *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis lung infection" 43rd European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (ECFC), virtual conference
- FFC Project#21/2019 "**Preclinical study of a combined host- and pathogen directed approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against *Mycobacterium abscessus* infection**" Maurizio Fraziano (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)

#### Publications

- Nisini R, Oggioni MR, Rossolini GM "Exploiting Novel Combined Host- and Pathogen- Directed Therapies for Combating Bacterial Multidrug Resistance" *Frontiers in Immunology*, In Press

## 4. INFLAMMATION Infiammazione

FFC Project#18/2011 "**Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  mediated inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*: a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients**" Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma), Antonio Molinaro (Dip. Chimica organica e biochimica, Università di Napoli), Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano), Abdelmounaaim Allaoui (Lab. Batteriologia Molecolare - Facoltà di Medicina - Libera Università di Bruxelles)

#### Publications

- Garlanda C. et al. "Decoys and Regulatory "Receptors" of the IL-1/Toll-Like Receptor Superfamily" *Front Immunol.* 2013 Jul 9;4:180. doi: 10.3389/fimmu.2013.00180. eCollection 2013.
- Riva F. et al. "TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity" *Front Immunol.* 2012 Oct 29;3:322. doi: 10.3389/fimmu.2012.00322. eCollection 2012.
- FFC Project#19/2011 "**Phospholipase C beta (PLCB) as candidate therapeutic target in CF lung proinflammatory signaling**" Giulio Cabrini (Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi di Ferrara)

#### Abstracts

- Cabrini C. et al. "P. aeruginosa and modulation of IL-8 gene expression in bronchial epithelial cells" *New frontiers in basic science of cystic fibrosis*, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014
- FFC Project#20/2011 "**Host Response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during airway chronic infection**" Cristina Cigana (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Lorè N. I. et al. "Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts" *PLoS One.* 2012;7(4):e35648. Epub 2012 Apr 25
- Lorè N. I. et al. "The IL-17A/IL-17RA axis in pulmonary defence and immunopathology" *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Aug;30:19-27

#### Abstracts

- Cigana C. et al. "Adaptation of *P. aeruginosa* in cystic fibrosis airways affects the host immune-response" *NACFC*, 2011, Anaheim, California, USA
- Cigana C. et al. "Cystic fibrosis adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immune system and tissue damage control" *Cytokines* 2012, 10<sup>th</sup> Joint Annual Meeting, 11-14 September 2012, Geneva, Switzerland
- Cigana C. et al. "Host response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during chronic infection" 35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 6-9 June 2012, Dublin, Ireland
- Lorè N.I. et al. "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways affects the host immune-response" VI European CF Young investigator meeting, Paris, France, 2012
- Cigana C. et al. "Cystic fibrosis-adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immune system detection and tissue damage control" *NACFC* 2012, Orlando, Florida, USA
- Cigana C. et al. "Defining critical players in inflammation and tissue damage during infection with *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in mice" *NACFC* 2013, Salt Lake City, Utah, USA
- Riva C, C. Cigana, NI. Lorè, I. De Fino, L. Spagnuolo, A. Bragonzi "Inflammatory response and tissue damage induced by chronic lung

- infection with *Pseudomonas aeruginosa* patho-adaptive variants" 8<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting Paris, France, 19-21 February 2014, 3<sup>rd</sup> Phd Workshop, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy, 26-27 June 2014, Milan meets Immunology Meeting, Milan, Italy, 16 April 2014
- Cigana C, Lorè NI, Riva C, De Fino I, Spagnuolo L, Mondino A, Cariani L, Colombo C, Sipione B, Bragonzi A. "Pseudomonas aeruginosa adaptation is associated to sustained lymphocytosis and tissue damage during chronic infection in murine models and humans" 28<sup>th</sup> Annual North-American Conference, Atlanta, GA (USA), 9-11 October 2014
- Funicello F, Soldati R, Galletti P, Giacomini D. "Monocyclic beta-lactams and cystic fibrosis : facing antioxidant and antimicrobial activity of N-thiomethyl-azetidinones" 13a giornata scientifica borsisti CINMPIS, presentazione orale, Perugia 18.12.2013

- FFC Project#21/2011 "**Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis**" Virgilio Evangelista (Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti), Mario Romano (Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Università Chieti-Pescara)

#### Abstracts

- Totani L. et al. "Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to control neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis" *New frontiers in basic science of cystic fibrosis*, Malta, ECFS Conference, 26-29 March 2014
- FFC Project#22/2011 "**Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis**" Riccardo Ghidoni (Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Osp. S. Paolo, Università di Milano)

#### Publications

- Caretti A. et al. "Anti-inflammatory action of lipid nanocarrier-delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis" *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct 18. pii: S0304-4165(13)00458-3. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.018. [Epub ahead of print]
- Caretti A, Bragonzi A, Facchini M et al. "Antiinflammatory action of lipid nanocarrier -delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis" *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1840:586-594
- FFC Project#23/2011 "**Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF- $\kappa$ B: a novel combination therapy for cystic fibrosis?**" Fabiana Quaglia (Dip. Chimica Farmacologica e Tossicologica, Università "Federico II", Napoli), Rosa Carnuccio (Dip. Farmacologia Sperimentale, Università "Federico II", Napoli)

#### Publications

- Ungaro F. et al. "PEI-Engineered Respirable Particles Delivering a Decoy Oligonucleotide to NF- $\kappa$ B: Inhibiting MUC2 Expression in LPS-Stimulated Airway Epithelial Cells" *PLoS One.* 2012;7(10):e46457
- Ungaro F. et al. "Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises" *J Pharm Pharmacol.* 2012 Sep;64(9):1217-35
- De Stefano D. et al. "A decoy oligonucleotide to NF- $\kappa$ B delivered through inhalable particles prevents LPS-induced rat airway inflammation" *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49(2013):288-95.
- d'Angelo I, Perfetto B, Costabile G et al. "Large Porous Particles for Sustained Release of a Decoy Oligonucleotide and Poly(ethyleneimine): Potential for Combined Therapy of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections" *Biomacromolecules* 2016 May 9;17(5):1561-71. doi: 10.1021/acs.biomac.5b01646

#### Abstracts

- De Stefano D. et al. "NF- $\kappa$ B decoy ODN release from respirable and biodegradable PEI/PLGA particles inhibits MUC2 expression in LPS-stimulated human lung cells" 35<sup>th</sup> Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Bologna, 2011
- Ungaro F. et al. "Engineering inhalable particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to nuclear factor- $\kappa$ B" 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, 2012, Istanbul, Turkey.
- Ungaro F. et al. "Engineered respirable carriers for the sustained delivery of drugs to the lungs" XXII Simposio ADRITELF "1972-2012: 40 anni di Tecnologia Farmaceutica", September 13-16, 2012, Firenze, Italy
- Ungaro F. et al. "Improving therapy of lung inflammation by inhalable powders for prolonged release of a decoy oligonucleotide against NF- $\kappa$ B" 3<sup>rd</sup> Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local drug Delivery, September 22-25, 2013, Pisa, Italy. Selected as oral presentation.
- De Stefano D. et al. "A decoy oligonucleotide to NF- $\kappa$ B delivered through inhalable particles inhibits the lung inflammation induced by

LPS in rat" 36mo Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, October 23-26, 2013, Torino, Italy.

- FFC Project#10/2012 **"A very promising drug against *Burkholderia cenocepacia*"** Giovanna Riccardi (Dip. di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia)

#### Publications

- Scoffone VC. et al. "Mechanism of resistance to an antitubercular 2-thiopyridine derivative that is also active against *Burkholderia cenocepacia*" *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2415-7
- Scoffone VC. et al. "Efflux-mediated resistance to a benzothiadiazol derivative effective against *Burkholderia cenocepacia*" *Front Microbiol.* 2015 Aug 5;6:815.

- FFC Project#14/2012 **"Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxyojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulating the metabolism of sphingolipids"** Maria Cristina Dechecchi (Lab. Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi AOUI, Verona), Frédéric Becq (Inst. Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France)

#### Publications

- Lampronti I. et al. "Modulation of the expression of the proinflammatory IL-8 gene in Cystic Fibrosis by extracts deriving from olive mill waste water" *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:960603. doi: 10.1155/2013/960603. Epub 2013 Jul 7
- Bezzerri V, Avitabile C, Dechecchi MC, Lampronti I, Borgatti M, Montagner G, Cabrini G, Gambari R, Romanelli A. "Antibacterial and anti-inflammatory activity of a temporin B peptide analogue on an in vitro model of cystic fibrosis." *Journal of Peptide Science* 2014 Oct;20(10):822-30.
- Loberto N. et al. "GBA2-Encoded b-Glucosidase Activity Is Involved in the Inflammatory Response to *Pseudomonas aeruginosa*" *PLoS One* 2014 Aug 20;9(8):e104763. doi: 10.1371/journal.pone.0104763. eCollection 2014.
- Montagner G, Bezzerri V, Cabrini G et al. "An antisense peptide nucleic acid against *Pseudomonas aeruginosa* inhibiting bacterial-induced inflammatory responses in the cystic fibrosis IB3-1 cellular model system" *International Journal of Biological Macromolecules* 2017 Jun;99:492-498.
- Milani R, Marcellini A, Montagner G et al. "Phloridzin derivatives inhibiting pro-inflammatory cytokine expression in human cystic fibrosis IB3-1 cells" *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2015 Oct 12;78:225-33

#### Abstracts

- Tebon M. et al. "Non-lisosomial beta-glucosidase 2 (GBA2) as a target of the anti-inflammatory effect of miglustat" *ECFS Basic Science Conference*, 20-24 March 2013, Malaga, Spain
- Tebon M. et al. "Non-Lysosomal Beta-Glucosidase 2 (Gba2) as a target of the Anti-Inflammatory Effect of Miglustat." *10th ECFS Basic Science Conference*
- Munari S. et al. "Structure-activity-relationships (sar) of neoglycoconjugates derived from Deoxyojirimycin as possible anti-inflammatory agents for CF lung disease" *11th ECFS Basic Science Conference*, 26-29 March, Malta
- Loberto N. et al. "Involvement of the non-lysosomal  $\beta$ -glucosylceramidase gba2 in the inflammatory response to *pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis" *2nd International Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids*. 12-17 ottobre 2014. Kloster Banz. Germania. Oral Presentation

- FFC Project#15/2012 **"The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of Cystic Fibrosis lung disease"** Valeria Raia (Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Napoli), Emanuela Bruscia (Dep. Pediatrics, Respiratory Medicine, Yale University School of Medicine), Luigi Maiuri (IERFC, San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Zhang PX. et al. "Reduced caveolin-1 promotes hyperinflammation due to abnormal heme oxygenase-1 localization in lipopolysaccharide-challenged macrophages with dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" *J Immunol.* 2013 May 15;190(10):5196-206. doi: 10.4049/jimmunol.1201607. Epub 2013 Apr 19.

#### Abstracts

- Villela V. et al. "The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of cystic fibrosis lung disease" *7th European CF Young investigators meeting*, February 27-March 1, 2013

- FFC Project#16/2012 **"Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: a drug discovery approach"** Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia)

#### Publications

- Iannitti RG, Casagrande A, De Luca A et al. "Hypoxia promotes danger-mediated inflammation via receptor for advanced glycation end products in cystic fibrosis" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013; 188:1338-1350
- Bedke T, Iannitti RG, De Luca A et al. "Distinct and complementary roles for *Aspergillus fumigatus*-specific Tr1 and Foxp3(+) regulatory T cells in humans and mice" *Immunol Cell Biol* 2014;92:659-70

#### Abstracts

- Iannitti RG. et al. "Cystic fibrosis Th17/Treg imbalance to *Aspergillus fumigatus*: insights for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening" *North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) Orlando (Florida, USA), 11-13 October, 2012. Gordon Research Conference "Immunology of Fungal Infections". Galveston (TX, USA), 13-18 January, 2013.*
- Galosi C. et al. "Genetic variants in IDO1 are associated with increased susceptibility to *A.fumigatus* colonization in patients with cystic fibrosis" *The 15th International Congress of Immunology. SM5. Fungi in the setting of inflammation, allergy and autoimmune diseases: Translating basic science into clinical practices.* Perugia (Italy), August 29-30, 2013
- Borghi M. et al. "Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory responses in Cystic Fibrosis" *Meeting "Fungi in the setting of inflammation, allergy and autoimmune diseases: Translating basic science into clinical practices". Borgo Riccio Torchiara (SA, Italy), April 13-16, 2014*
- Romani L. "IDO/Kynurenine: A novel anti-inflammatory Th17 counteracting pathway in CF" *37th European Cystic Fibrosis Conference. Gothenburg (Sweden), June 11-14, 2014*
- De Luca A. et al. "IL-1 blockade as a potential therapeutic target in *Aspergillus*" *6th Advances Against *Aspergillus* meeting. Madrid (Spain), February 27 - 1 March, 2014*
- Iannitti RG. et al. "Hypoxia promotes danger-mediated inflammation via RAGE in Cystic Fibrosis" *6th Advances Against *Aspergillus* meeting. Madrid (Spain), February 27 - 1 March, 2014*

- FFC Project#18/2012 **"Cystic Fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity"** Mario Strazzabosco (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Milano)

#### Publications

- Fouassier L. et al. "Ezrin finds its groove in cholangiocytes" *Hepatology.* 2015 May;61(5):1467-70
- Scirpo R. et al. "Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  limits NF- $\kappa$ B dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium" *Hepatology.* 2015 Nov; 62(5):1551-62
- Fiorotto R. et al. "CFTR controls biliary epithelial inflammation and permeability by regulating Src tyrosine kinase activity" *Hepatology* 2016 Sep 15. doi: 10.1002/hep.28817

#### Abstracts

- Fiorotto R. et al. "Src tyrosine kinase mediates the increased TLR4-dependent stimulation of innate immune responses to endotoxins in Cfr-defective cholangiocyte" *AASLD Liver Meeting 2013, Washington, USA Hepatology* 58: 151A
- Fiorotto R. et al. "Src tyrosine kinase mediates the increased TLR4-dependent stimulation of innate immune responses to endotoxins in Cfr-defective cholangiocytes" *ICI satellite meeting, SM7, "Endotoxin, TLR4 signaling, and beyond". Cinisello Balsamo (MI), Italy, 21st August 2013*
- Scirpo R. et al. "Stimulation of PPAR- $\gamma$  Nuclear Receptor Limits NF $\kappa$ B-dependent Inflammation in Cystic Fibrosis Biliary Epithelium" *ECLCB-6 2014, Castelfranco Veneto, Italy*
- Fiorotto R. et al. "CFTR controls TLR4 responses of the biliary epithelium by regulating C-SRC tyrosine kinase activation" *28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Atlanta, October 9-11, 2014*
- Scirpo R. et al. "Stimulation of PPAR- $\gamma$  reduces NF $\kappa$ B-dependent inflammation in cystic fibrosis biliary epithelium" *28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Atlanta, October 9-11, 2014*
- Scirpo R. et al. "Stimulation of PPAR- $\gamma$  reduces NF $\kappa$ B-dependent inflammation in cystic fibrosis biliary epithelium" *AASLD Liver Meeting 2014, Boston, USA*
- Fiorotto R. et al. "The Cystic Fibrosis Conductance Regular (CFTR) controls c-Src tyrosine kinase signaling and regulates innate immunity and epithelial polarity in cholangiocytes" *AASLD Liver Meeting 2014, Boston, USA*
- Scirpo R. et al. "Activation of PPAR-g signaling as a novel target to limit NF- $\kappa$ B- dependent inflammation in Cystic Fibrosis biliary epithelium" *EASL International Liver Congress™ 2014, London, UK*
- Fiorotto R. et al. "CFTR controls a membrane multi-protein complex that regulates cholangiocyte c-src tyrosine kinase activity and tlr4



- signaling: implications for cystic fibrosis liver disease (CFLD)" EASL International Liver Congress™ 2014, London, UK
- Fiorotto R. et al. "CFTR controls TLR4 responses of the biliary epithelium by regulating c-Src tyrosine kinase activation" ECLC6-2014, Castelfranco Veneto, Italy
  - Scirpo R, Fiorotto R, Villani A, Fabris L, Strazzabosco M. "Stimulation of PPAR-γ reduces NFκB-dependent inflammation in cystic fibrosis biliary epithelium" The 28th North American Cystic Fibrosis Conference 2014, Atlanta, USA
  - Fiorotto R, Villani A, Scirpo R, et al. "Src tyrosine kinase mediates the increased TLR4-dependent stimulation of innate immune responses to endotoxins in Cfr-defective cholangiocytes" AASLD Liver Meeting 2013, Washington, USA Hepatology 58: 151A.
- FFC Project#13/2013 "**Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airway epithelium**" *Francesca Berlutti* (Dip. Salute Pubblica e Malattie infettive, Università "La Sapienza", Roma)
- Publications
- Frioni A. et al. "Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases" *Biometals* 2014 Oct;27(5):843-56
  - Valenti P. et al. "Lactoferrin and cystic fibrosis airway infection. In "Diet and Exercise in Cystic Fibrosis" (Ronald Ross Watson) Academic Press, Waltham" Book: WATSON-9780128000519 Chapter: 09
- Abstracts
- Berlutti F. et al. "Lactoferrin modulates inflammatory and iron network in different epithelial cell models mimicking human infection and inflammatory diseases" XI International Conference on Lactoferrin, 6-10 October 2013, Rome, Italy
- FFC Project#14/2013 "**Pathophysiological relevance of glycosaminoglycans in Pseudomonas aeruginosa chronic lung infections and validation of new therapeutic approaches to modulate inflammation and tissue remodeling**" *Cristina Cigana* (Infections and Cystic Fibrosis Unit, HSR, Milano), *Annamaria Naggi* (Ist. Ricerche Chimiche e Biochimiche G. Ronzoni), *Carla Colombo* (Fondazione IRC-SS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)
- Publications
- Yonker LM. et al. "Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis" *J Cyst Fibros.* 2015 Jul;14(4):431-9
  - Cigana C. et al. "Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections" *Sci Rep.* 2016 Feb 17;6:21465. doi: 10.1038/srep21465
  - Lorè IN. et al. "IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*" *Sci Rep.* 2016 May 18;6:25937
- Abstracts
- Riva C. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* adaptation to cystic fibrosis airways shapes the host response in mice during the progression of airway disease" 12th ECFS Basic Science Conference (25-28 March 2015, Albufeira Portugal) - 4rd Phd Workshop Università degli Studi di Milano 18-19.06.2015
  - Cigana C. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* adaptation as a potential risk factor to the progression of cystic fibrosis airway disease in mice and humans", 38th ECFS Conference, Brussels, Belgium, 10-13 June 2015
  - Lorè N.I. et al. "The double-edge sword activity of IL-17 during *Pseudomonas aeruginosa* chronic airway infection: implications for host resistance and tolerance 29th Annual North-American Conference, Phoenix, AZ (USA), 8-10 October 2015
  - Riva C. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* adaptation to cystic fibrosis airways shapes the host response in mice during the progression of airway disease"
  - Colombo C., Mosconi P., Glasziou P. "How to provide evidence-based information and translate Cochrane reviews to lay people in a deliberative setting: the Italian and the Australian citizen juries experience on population screening" 23rd Cochrane Colloquium Vienna, 3-7 October 2015.
  - Lorè N.I., Cigana C., Sipione B. et al. "IL-17 relevance during *P. aeruginosa* airway chronic infection" 10th European CF Young Investigator Meeting Paris, France February 10th to 12th 2016"
  - Riva C., Lorè N.I., Sipione B. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* chronic infection induced inflammation and tissue damage in the lung: the role of glycosaminoglycans" 10th European CF Young Investigator Meeting Paris, France February 10th to 12th 2016
  - Lorè NI, Cigana C, Riva C et al. "IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- FFC Project#17/2013 "**Preclinical study of a novel aerosol immunotherapeutic approach based on Janus-faced liposomes to enhance innate antimicrobial immunity**" *Maurizio Fraziano* (Dip. di Biologia, Università Tor Vergata, Roma), *Roberto Nisini* (Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, ISS, Roma), *Maurizio Sanguinetti* (Ist. Microbiologia, Università Cattolica, Roma)
- Publications
- Poerio N, Bugli F, Taus F et al "Liposomes loaded with bioactive lipids enhance antibacterial innate immunity irrespective of drug resistance" *SCI REP* 2017 Mar 27;7:45120
- FFC Project#18/2013 "**Development of a CF, IL-8/NF-KB transgenic mouse model for the in vivo long-term monitoring of the inflammatory response induced by bacteria treated or not with azithromycin**" *Maria M. Lleò* (Dip. di Patologia e Diagnostica, Sez. Microbiologia, Università di Verona)
- Publications
- Stellari F. et al. "In vivo imaging of the lung inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* and its modulation by azithromycin" *J Transl Med.* 2015 Aug 4;13:251
  - Stellari F, Bergamini G, Ruscitti F et al "In vivo monitoring of lung inflammation in CFTR-deficient mice" *J Transl Med* 2016, Jul 18; 14(1): 226
- Abstracts
- Bergamini C. et al. "Development of a CF, IL-8 transgenic mouse model for the *in vivo* long term monitoring of lung inflammation" 1st Italian CF Young Investigator Meeting January 16<sup>th</sup> - 17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
  - Bergamini G. et al. "Development of a CF, IL-8 transgenic mouse model for the *in vivo* long-term monitoring of lung inflammation", NACFC 2015
- FFC Project#19/2013 "**The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation**" *Mario Romano* (Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara), *Licia Totani* (Dip. di Farmacologia Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud), *Marco Marchisio* (Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara)
- Publications
- Romano M. et al. "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation" *Eur J Pharmacol.* 2015 Aug 5;760:49-63
- Abstracts
- Totani L. et al. "The involvement of vascular endothelium in cystic fibrosis lung inflammation", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta, ECFS Conference, 26-29 March 2014
- FFC Project#20/2013 "**Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection**" *Paola Signorelli* (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), *Elisa Borghi* (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), *Silvano Sozzani* (Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia)
- Publications
- Perdoni F. et al. "Antifungal activity of Myriocin on clinically relevant *Aspergillus fumigatus* strains producing biofilm" *BMC Microbiol.* 2015 Oct 30; 15:248
  - Ghidoni R. et al. "Role of Sphingolipids in the Pathobiology of Lung Inflammation" *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:487508. doi: 10.1155/2015/487508. Epub 2015 Dec 3. Review.
  - Caretti A. et al. "Inhibition of ceramide de novo synthesis by myriocin produces the double effect of reducing pathological inflammation and exerting antifungal activity against *A. fumigatus* airways infection", *Biochim Biophys Acta* 2016 Jun;1860(6):1089-97
- Abstracts
- Perdoni F. et al. "Antifungal activity of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor, on pathogenic fungi" Third Meeting of the ECMM/ISH-AM Working Group on Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis, Angers- France, 5-6 June 2014 (oral communication)
  - Perdoni F, Riva A, Signorelli P et al. "Nanocarrierdelivery of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor with antifungal activity, into fungal biofilms" 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Barcelona, Spain, 10 – 13 May 2014 (poster)
  - Perdoni F, Biggiogera M, Cirasola D. et al. "Antifungal activity of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor, on fungal biofilms: a preliminary study." ESCMID Study Group for Biofilm (ESGB) Meeting "Biofilm-based Healthcare-associated Infections: from Microbiology to Clinics", Rome 9-10 October 2014
- FFC Project#13/2014 "**Targeting extracellular Protein Disulphide Isomerase to control Burkholderia cenocepacia lung infections**" *Francesca Pacello* (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")
- Publications
- Pacello F. et al. "An ERp57-mediated disulphide exchange promotes the interaction between *Burkholderia cenocepacia* and epithelial res-

piratory cells" Sci Rep. 2016 Feb 16;6:21140. doi: 10.1038/srep21140

- FFC Project#17/2014 **"TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung"** Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Romina Nassini (Dip. di Scienze Sanitarie, Unità di Farmacologia Clinica e Oncologica, Università di Firenze)

#### Publications

- Prandini P. et al. "TRPA1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Cystic Fibrosis Patients" Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Jun 9
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" Mucosal Immunology, 2020 Aug 4;11:1438

- FFC Project#16/2014 **"Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airways"** Francesca Berlutti (Dip. Sanità Pubblica e Malattie infettive, Università "La Sapienza", Roma)

#### Abstracts

- Valenti P. et al. "Aerosolized lactoferrin reduces inflammation and infection in a mouse model of cystic fibrosis lung infection" XIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications 2-6 Novembre 2015, Nagoya Japan

- FFC Project#17/2014 **"TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung"** Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

#### Publications

- Cabrini G "Innovative therapies for cystic fibrosis: the road from treatment to cure" Molecular Diagnosis & Therapy, 2018 Nov 26
- Rimessi A, Bezzerri V, Salvatori F et al. "PLCB3 Loss of Function Reduces Pseudomonas aeruginosa-Dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2018 Oct;59(4):428-436.

#### Abstracts

- Cabrini G. et al. "Intracellular calcium mobilization as amplifier of the inflammatory response in CF bronchial epithelial cells" 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 02 April 2016, Pisa, Italy
- Cabrini G. et al. "Intracellular calcium mobilization and the inflammatory response in CF bronchial epithelial cells" The 30th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27–29, 2016

- FFC Project#19/2014 **"Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent inflammasome activation exacerbates the P. aeruginosa-driven inflammatory response"** Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

#### Publications

- Rimessi A. et al. "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent NLRP3 activation exacerbates the Pseudomonas aeruginosa-driven inflammatory response in cystic fibrosis" Nat Commun. 2015 Feb 4;6:6201

- FFC Project#20/2014 **"Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease"** Eliodoro Pizzo (Lab. di Struttura e Funzione delle Proteine-SFP, Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Emilia Maria Pedone (Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, C.N.R. Napoli)

#### Publications

- Pizzo E. et al. "A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating protein of *Phytolacca dioica* L: A new function of RIPs for plant defence" FEBS Lett. 2015 Sep 14;589(19 Pt B):2812-8
- Notomista E. et al. "The identification of a novel *Sulfolobus islandicus* CAMP-like peptide points to archaeal microorganisms as cell factories for the production of antimicrobial molecules" Microb Cell Fact. 2015 Sep 4;14:126
- Pane K. et al. "Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in *Escherichia coli*" PLoS ONE 2016 Jan 25;11(1):e0146552
- Pane K. et al. "A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells" FEBS J 2016 Jun;283(11):2115-31
- Gaglione R, Pane K, Dell'Omo E et al. "Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*" New Biotechnology 2019 Jul 25;51:39-48

#### Abstracts

- Bosso A. et al. "A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating proteins of *Phytolacca dioica* L." IMAP 2015 5th

International Meeting on Antimicrobial Peptides, Burlington House, London September 7-8, 2015

- FFC Project#21/2014 **"Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis"** Antonio Recchiuti (Dip. di Scienza Clinica e Sperimentale-CeSI, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara)

#### Abstracts

- Recchiuti A. et al. "Resolvin D1 Reduces Lung Chronic Inflammation and Infection Induced by *Pseudomonas aeruginosa*" 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16th - 17th 2015, Rome, Italy

- FFC Project#22/2014 **"Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: from drug discovery to preclinical validation"** Luigina Romani (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Perugia)

#### Publications

- Zelante T. et al. "Tryptophan Feeding of the IDO1-AhR Axis in Host-Microbial Symbiosis" Front Immunol. 2014 Dec 15;5:640
- Borghi M. et al. "Antifungal Th Immunity: Growing up in Family" Front Immunol. 2014 Oct 15;5:506
- Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V et al. "IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis" Nature Communications, 2016 Mar 14;7:10791
- De Luca A, Pariano M, Cellini B et al. "The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes Respiratory Allergy in the Proximal Airways" Cell Reports 2017 Aug 15;20(7):1667-1680
- Piliiponsky AM, Romani L "The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity" Immunological Reviews 2018 Mar;282(1):188-197. doi: 10.1111/immr.12623
- Costantini C, Renga G, Oikonomou V et al. "The Mast Cell-Aryl Hydrocarbon Receptor Interplay at the Host-Microbe Interface" Mediators of Inflammation, 2018 Oct 28;2018:7396136
- Puccetti M, Paolicelli G, Oikonomou V et al. "Towards Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor in Cystic Fibrosis" Mediators of Inflammation, 2018 Feb 18;2018:1601486

- FFC Project#24/2014 **"The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies"** Sandro Sonnino (Dip. di Biochimica Medica e Medicina Traslazionale, Università di Milano)

#### Publications

- Aureli M. et al. "Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease" Chem Phys Lipids 2016 Aug 31;200:94-103. doi: 10.1016

#### Abstracts

- Aureli M. et al. "Development of new inhibitors of the non-lysosomal  $\beta$ -glucosylceramidase GBA2 as possible anti-inflammatory agents for CF lung disease" 12th ECFS Basic Science Conference – 25-28 Marzo 2015, Algarve, Portugal
- Schiumarini D. et al. "Involvement of glycosphingolipid-hydrolases in the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis" ECFC, 2016
- Schiumarini D, Loberto N, Bassi R et al "Pseudomonas aeruginosa infection induces alterations in plasma membrane lipid composition in cystic fibrosis airway cells: molecular mechanisms and therapeutic options for CF lung pathology" 14th ECFS Basic Science Conference, 29 March – 1 April 2017, Albufeira, Portugal

- FFC Project#25/2014 **"Targeting PI3K $\gamma$  scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis"** Emilio Hirsch (Dip. di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università di Torino, Centro di Biotecnologia Molecolare), Laudanna Carlo (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Lab. di Traffico Cellulare e Trasduzione del segnale)

#### Abstracts

- Richter W. et al. "Disruption of a PI3K $\gamma$ /PKA/PDE signaling complex augments cAMP/PKA signaling and CFTR activity in non-CF and  $\Delta$ F508-CF airway epithelial cells" 12th ECFS Basic Science Conference – 25-28 Marzo 2015, Algarve, Portugal

- FFC Project#12/2015 **"Anti-inflammatory and antibacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models"** Francesca Berlutti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive - Università La Sapienza, Roma)

#### Publications

- Valenti P, Frioni A, Rossi A "Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" Biochemistry and Cell Biology 2017 Feb;95(1):41-47. doi: 10.1139/bcb-2016-0050. Epub 2016 Jul 8

- FFC Project#20/2015 **“Mitochondrial quality control machinery a role in the *P. aeruginosa*-triggered inflammatory response in Cystic Fibrosis”** Alessandro Rimessi (Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Laboratorio Trasduzione Segnali - Università di Ferrara)
- FFC Project#23/2015 **“Targeting PI3Ky scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis”** Emilio Hirsch (Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze Sanitarie, Centro di Biotecnologie Molecolari - Università di Torino), Carlo Laudanna (Dip. di Patologia e Diagnostica, Divisione di Patologia Generale, Lab. di Traffico Cellulare e di Trasduzione Cellulare - Università di Verona)

#### Publications

- Rimessi A. et al. “Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies” *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Jun 29
- Yoboue ED, Rimessi A, Anelli T et al. “Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane” *Antioxidant & redox signalling* 2017 Sep 20;27(9):583-595. doi: 10.1089/ars.2016.6866

- FFC Project#22/2015 **“A systematic investigation of miglustat-derivative iminosugar clusters as possible anti-inflammatory agents for Cystic Fibrosis lung disease”** Maria Cristina Dehecchi (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dipartimento di Patologia e Diagnostica - Università di Verona), Massimo Aureli (Dip. di Biotecnologia Medica e Medicina Traslazionale - Università di Milano)

#### Publications

- Munari S. et al. “Neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulation of the sphingolipid metabolism” *JSM Genetics & Genomics*, 3 September 2016
- Lampronti I, Dehecchi MC, Rimessi A et al. “β-Sitosterol Reduces the Expression of Chemotactic Cytokine Genes in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells” *Frontiers in Pharmacology* 2017 May 12;8:236. doi: 10.3389/fphar.2017.00236
- Chiricozzi E, Loberto N, Schiumarini D et al. “Sphingolipids role in the regulation of inflammatory response: from leukocyte biology to bacterial infection” *J Leukoc Biol*, 10.1002/JLB.3MR0717-269R
- Dehecchi MC, Tamanini A, Cabrini G. “Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside” *Annals of Translational Medicine* 2018 Sep;6(17):334
- De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A et al. “Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of N-alkyl-deoxyiminosugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections for application in CF lung disease” *Eur J Med Chem* 2019 Aug 1;175:63-71.

#### Abstracts

- Dehecchi M.C., Munari S., Loberto N. et al. “Miglustat-derivative iminosugars as possible anti-inflammatory agents for cystic fibrosis lung disease” 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 02 April 2016, Pisa, Italy
- Aureli M., Schiumarini D., Loberto N. et al. “Unravelling the link between plasma membrane sphingolipid composition and aberrant inflammatory response in cystic fibrosis” The 30th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27–29, 2016
- Aureli M, Loberto N, Bassi R et al. “Plasma membrane response to *P. aeruginosa* in CF lung inflammation: from molecular mechanisms to therapeutic strategies” 11 European CF Young Investigator Meeting, Paris (France) February 15-17, 2017
- Loberto N, Brocca P, Schiumarini D et al. “Development of nanoparticles for silencing the beta-glucocerebrosidase GBA2 as a promising tool to reduce cystic fibrosis lung inflammation” ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- D'Alonzo D, Guaragna A, Munari S et al. “L iminosugars: new anti-inflammatory drugs for CF lung disease?” ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- D'Alonzo D, De Fenza M, Esposito A et al. “Synthesis of N-Alkylated L-Iminosugars and their therapeutic application in cystic fibrosis lung disease” 12th Spanish-Italian Symposium on Organic Chemistry, Ferrara (Italy), July 2-4, 2018
- D'Alonzo D, De Fenza M, Esposito A et al. “Synthesis on N-Alkylated L-Iminosugar and their therapeutic application in cystic fibrosis lung disease” XXXVIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Organica della Società Chimica Italiana, Milano, 9-13 settembre, 2018

- FFC Project#24/2015 **“CFTR-defective biliary cells from human induced pluripotent-stem cells (iPSC) as a model to study the role of innate immunity in cystic fibrosis liver disease”** Mario Strazzabosco (Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Laboratorio di Epatologia - Università degli Studi Milano-Bicocca)

#### Publications

- Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V et al. “Src kinase inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in ΔF508 human cholangiocytes and improves CFTR correctors efficacy” *Hepatology* 2017 Jul 24. doi: 10.1002/hep.29400

#### Abstracts

- Ghigo A., Richter W., Murabito A. et al. “Peptide-based disruption of a PI3Ky/PKA/PDE signaling complex augments cAMP/PKA-signaling and CFTR activity in non-CF and F508del-CF airway epithelial cells” 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 02 April 2016, Pisa, Italy
- Ghigo A, Murabito A, Ren K et al. “Development of a PI3Ky-derived peptide as standalone therapy to activate F508del-CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in Cystic Fibrosis” ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Murabito A, Ren K, Pirozzi F et al. “Exploiting a PI3Ky mimetic peptide as standalone drug to restore CFTR function, reduce inflammation and limit obstruction of the respiratory tract in cystic fibrosis” ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece
- Murabito A, Ren K, Pirozzi F et al. “Exploiting a PI3Ky mimetic peptide as a CFTR modulator in cystic fibrosis” 2019 ECFS Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. 27-30 March 2019, Dubrovnik, Croatia

- FFC Project#18/2016 **“Interfering with glycosaminoglycans during *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection: pre-clinical exploitation of a novel therapeutic strategy for cystic fibrosis”** Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, Divisione Immunologia, Trapianto e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

#### Publications

- Lorè NI, Veraldi N, Riva C et al. “Synthesized Heparan Sulfate Competitors Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection” *International Journal of Molecular Science* 2018 Jan 9;19(1)

- FFC Project#19/2016 **“Resolvin D1 for targeting chronic lung inflammation, infection, and damage in cystic fibrosis”** Antonio Recchiuti (Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologie - Centro di Eccellenza delle Scienze dell'Invecchiamento, Università G. D'Annunzio, Chieti-Pescara)

#### Publications

- Pierdomenico AM, Patruno S, Codagnone M et al. microRNA-181b is increased in cystic fibrosis cells and impairs lipoxin A4 receptor-dependent mechanisms of inflammation resolution and antimicrobial defense” *SCI REP* 2017 Oct 18;7(1):13519 11-mag-18
- Isopi E, Mattoscio D, Codagnone M et al. “Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection” *Mucosal Immunol*, 2018 Jan;11(1):35-49
- Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E “Roles, action, and therapeutic potential of specialized pro-resolving lipid mediators for the treatment of inflammation in cystic fibrosis” *Frontiers in Pharmacology* 2019 Apr 2;10:252.

#### Abstracts

- Isopi E, Mattoscio D, Mari VC et al. “Harnessing resolution mediators as novel therapeutic for cystic fibrosis” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA (Thematic poster view)
- Mattoscio D, Isopi E, Mari VC et al. “Resolvin D1 for targeting lung inflammation, infection, and damage in CF” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA (Workshop presentation)
- Recchiuti A “Resolvins, lipoxins, and maresins in resolution of inflammation in cystic fibrosis” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA (Invited Symposium lecture)
- Recchiuti A, Isopi E, Mattoscio D et al. “Harnessing resolution mediators as innovative therapeutics for cystic fibrosis” 2nd International Conference on Pharmacology, August 16-18, Rome, Italy
- Isopi E, Mattoscio D, Romano M et al. “Protective role of RVD1 and its receptor in cystic fibrosis” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
- Mattoscio D, Isopi E, Lamolinara A et al. “Resolvin D1 promotes resolution of inflammation, infection, and damage in CF” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)
- Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E et al. “Actions of Resolvin D1 and D2 in cystic fibrosis MRSA lung infection and inflammation” North American



Cystic Fibrosis Conference (NACFC), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)

- FFC Project#21/2017 **“Testing the anti-inflammatory effects of matrix metalloprotease inhibitors in *P. aeruginosa*-infected CFTR-knockout mice by in vivo imaging techniques”** Federico Boschi (Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona)

#### Publications

- Sandri A, Lleo MM, Signoretto C et al. “Protease inhibitors elicit anti-inflammatory effects in CF mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *The Journal of Translational Immunology*, 18 September 2020
- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. “Longitudinal monitoring of sinonasal and oral bacterial reservoirs to prevent chronic lung infection in people with cystic fibrosis” *European Respiratory Journal* 2020 Jul; 6(3): 00115-2020

#### Abstracts

- Sandri A, Lleo MM, Boschi F “Protease inhibitors elicit anti-inflammatory effects in mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” 42nd European Cystic Fibrosis Conference, 5-8 June 2019, Liverpool, UK

- FFC Project#23/2017 **“Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation: therapeutic potential of hybrid lipid/polymer nanoparticles”** Francesca Ungaro (Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II)

#### Abstracts

- Costabile G, Baldassi D, d'Angelo I et al. “In vitro evaluation of siRNA loaded hNPs for the treatment of cystic fibrosis” NIM Conference “The Future of Nanoscience”, Tutzing, Germany, September 4-6, 2018
- d'Angelo I, Costabile G, Durantie E et al. “Inhalable hybrid lipid/polymer nanoparticles for pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis” 11th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada, Spain, March 19-22, 2018

- FFC Project#24/2018 **“Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis”** Luigina Romani (Università degli Studi di Perugia, Dip. Medicina Sperimentale)

#### Publications

- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. “Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans” *Frontiers in Immunology*, 2019 May 7;10:890
- van de Veerdonk F, Servillo G, De Luca A et al. “Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy” *Science*, submitted
- Costantini C, Puccetti M, Pariano M et al. “Selectively targeting key inflammatory pathways in cystic fibrosis” *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020 Aug 9;206:112717
- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. “Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans” *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 890

- FFC Project#25/2018 **“Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation: therapeutic potential of hybrid lipid/polymer nanoparticles”** Francesca Ungaro (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Farmacia), Olivia Monica Merkel (Dept. Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München)

#### Abstracts

- Baldassi D, Costabile G, Conte G et al. “In vitro evaluation of siRNA loaded hNPs for the treatment of cystic fibrosis” *International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology 2019 (ICONAN 2019)*, October 16th – 18th, 2019, Munich, Germany
- d'Angelo I, Conte G, Costabile G et al. “Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation through hybrid lipid/polymer nanoparticles” *International Society for Aerosol in Medicine e.V.*, 22nd ISAM Congress, Montreaux, Switzerland, May 25-29, 2019
- d'Angelo I, Conte G, Costabile G et al. “Tailored hybrid lipid/polymer nanoparticles for pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis” *IV International Caparica Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications 2020 (ISN2A2020)*, January 20th-23rd, 2020, Caparica, Portugal
- Ungaro F “Overcoming lung barriers to siRNA delivery in cystic fibrosis through tailored lipid/polymer hybrid nanoparticles” *11th Annual RNA Therapeutics Conference Focus Day – Oligonucleotide Delivery Systems*, 18th February 2020, London, UK
- Costabile G, Buroni S, Provenzano R et al. “Elongated mucus-penetrating nanocrystals for lung delivery of a new anti-*Burkholderia* agent in cystic fibrosis” *International Society for Aerosol in Medicine e.V.*, 22nd

ISAM Congress, Montreaux, Switzerland, May 25-29, 2019

- Costabile G, Provenzano R, Mitidieri E et al. “Repurposing Gallium for local treatment of *P. aeruginosa* lung infections through sustained-release dry powders for inhalation” *International Society for Aerosol in Medicine e.V.*, 22nd ISAM Congress, Montreaux, Switzerland, May 25-29, 2019
- d'Angelo I, Casciaro B, Zhang X et al. “Biodegradable nanoparticles for prolonged therapeutic efficacy of antimicrobial peptides against *Pseudomonas aeruginosa* lung infections” *International Society for Aerosol in Medicine e.V.*, 22nd ISAM Congress, Montreaux, Switzerland, May 25-29, 2019

- FFC Project#20/2019 **“Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of  $\beta$ -sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-miglustat”** Maria Cristina Dechecchi (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Laboratorio di Patologia Molecolare-Laboratorio Analisi)

#### Publications

- De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A et al. “Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of N-alkyl-deoxyiminosugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections for application in CF lung disease” *Eur J Med Chem*, 2019 Aug 1;175:63-71
- De Gregorio E, Esposito A, Vollario A et al. “N-Nonyloxypropyl-L-Deoxyjirimycin Inhibits Growth, Biofilm Formation and Virulence Factors Expression of *Staphylococcus aureus*” *Antibiotics* 2020 Jun 26;9(6):362
- Esposito A, D'Alonzo D, De Fenza M et al. “Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis” *International Journal of Molecular Sciences* 2020 May; 21(9): 3353

#### Abstracts

- Esposito A, De Fenza M, D'Alonzo M et al. “N-Alkylated L-iminosugars as novel anti-inflammatory and anti-biofilm tools for cystic fibrosis lung infections” *7th EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry*, Athene, Greece, 1-5 Settembre 2019
- Esposito A, De Fenza M, D'Alonzo D et al. “N-Alkylated L-iminosugars as novel anti-inflammatory and anti-biofilm tools for Cystic Fibrosis Lung Infections” *6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium*, Athene, Grecia, 5-6 Settembre 2019

- FFC Project#22/2019 **“Multi-task evaluation of TMA analogues as anti-inflammatory treatments for CF lung disease”** Ilaria Lampronti (Dip. Scienze della vita e biotecnologie, Sez. biochimica e biologia molecolare, Università di Ferrara)

#### Publications

- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti E et al. “Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis” *Frontiers in Immunology*, 2020 Aug 4;11:1438
- Rimessi A, Pozzato C, Carparelli L et al. “Pharmacological modulation of mitochondrial calcium uniporter controls lung inflammation in cystic fibrosis” *Science Advances* 2020 May; 6(19): eaax9093

- FFC Project#23/2019 **“Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis”** Anna Silvia Pistocchi (Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)

#### Abstracts

- Cafora M, Forti F, Brix A et al. “Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis” *43rd European Cystic Fibrosis Conference – 2020 (ECFC)*, virtual conference

## 5. CLINICAL RESEARCH

### Ricerca clinica

- FFC Project#25/2011 **“DWI (Diffusion weighted Imaging) a new tool to assess inflammation in CF population with pulmonary exacerbation”** Giovanni Morana (Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso)

#### Publications

- Ciet P, Bertolo S, Ros M et al. “Detection and monitoring of lung inflammation in cystic fibrosis during respiratory tract exacerbation using diffusion-weighted magnetic resonance imaging” *European Respiratory Journal*, 2017 Jul 20;50(1)

#### Abstracts

- De Leo F. et al. “Functional MR to monitoring cystic fibrosis (CF) lung disease” *Chicago RNSA (25-30 novembre 2012)*
- De Leo F. et al. “Functional MR to monitoring cystic fibrosis (CF) lung disease” *Congresso ESMRMB, 4-6 ottobre 2012, Lisbona*
- De Leo F. et al. “Ruolo del Diffusion Weighted Imaging (DWI) nel fol-

low-up di pazienti affetti da fibrosi cistica (FC), 3 Congresso annuale dell'Italian Chapter dell'ISMRM, Napoli, 19 aprile 2012

- De Leo F. et al. "Lung-MRI to monitoring cystic fibrosis (CF) patients with pulmonary exacerbation" 36<sup>th</sup> ECFS Conference, 12-15 June, 2013 Lisbon, Portugal

- FFC Project#26/2011 "**Testing human monocytes as a new tool for clinical and preclinical research in CF**" Claudio Sorio (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Mario Rosario Buffelli (Dip. Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università di Verona)

#### Publications

- Bellisola et al. "The identification of cystic fibrosis (CF) cells and their pharmacological correction by mid-infrared microspectroscopy and unsupervised data analysis methods" *ScienceJet* 2014;3:51
- Calderer S. et al. "Challenging the diagnosis of Cystic Fibrosis in a patient carrying the 186-8T/C allelic variant in the CF Transmembrane Conductance Regulator gene" *BMC Pulm Med.* 2014 Mar 13;14:44. doi: 10.1186/1471-2466-14-44

#### Abstracts

- Vercellone S, Averna M, Pedrazzi M et al. "Measure of CFTR expression and function in peripheral blood leukocytes" 1<sup>th</sup> Italian CF Young Investigators Meeting, January 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Rome

- FFC Project#20/2012 "**Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentre study**" Giovanni Taccetti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOU "A. Meyer", Firenze), Diana Costantini (Centro FC, Lab. Patologia Clinica, Fondazione IRCSS Ca' Granda, Milano), Mirella Collura (Centro FC, Ospedale "G. Di Cristina", Palermo), Giuseppe Magazzù (Centro FC, Messina), Valeria Raia (Centro FC, Napoli)

#### Publications

- Dolce D, Neri S, Grisotto L et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* eradication in cystic fibrosis patients: A randomized multicenter study" *PLoS ONE*, 2019 Mar 22;14(3):e0213497

#### Abstracts

- Cocchi P. et al. "Comparative in vitro activity of temocillin against *Burkholderia cepacia* complex" *Ped Pulmonol* 2012 Suppl.
- Cocchi P. et al. "Genetic background of MRSA collected from cystic fibrosis patients versus MRSA collected from Intensive Care Unit (ICU) patients: does any difference exist?" *Ped Pulmonol* 2012 Suppl.
- Galici V. et al. "Clinical impact of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* infection in cystic fibrosis patients: a longitudinal multicenter italian study" *Ped Pulmonol* 2013 Suppl.
- Galici V. et al. "Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomized multicenter study" 28<sup>th</sup> North American Conference, 2014, Atlanta, USA, *Ped Pulmonol* 2014 Suppl.
- Cocchi P. et al. "Emergence of a Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive MRSA strain in cystic fibrosis patients" *J Cyst Fibros* 2014; 13:S61
- Neri S, Campana S, Dolce D et al. "Early antibiotic treatment for mrsa eradication in cystic fibrosis patients: a multicenter RCT" The 30<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 27-29, 2016
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. "Longitudinal study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genetic background isolated from cystic fibrosis patients" 40<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Seville, Spain, 7-10 June 2017

- FFC Project#21/2013 "**Clinical implications of the natural history of insulin secretory and sensitivity defects in cystic fibrosis**" Alberto Battezzati (International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) - DeFENS Università di Milano), Carla Colombo (Dip. Scienze Materno Infantili, Università di Milano, Centro regionale FC), Andrea Mari (Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova)

#### Publications

- Battezzati A. et al. "Age- and Sex-Dependent Distribution of OGTT-Related Variables in a Population of Cystic Fibrosis Patients" *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;100(8):2963-71
- Alicandro G, Battezzati A, Bianchi ML et al. "Estimating body composition from skinfold thicknesses and bioelectrical impedance analysis in cystic fibrosis patients" *Journal of Cystic Fibrosis*, 2015 Nov;14(6):784-91

#### Abstracts

- Battezzati A, Bedogni G, Zazzeron L et al. "Defective beta cell function measured during OGTT is a long term diabetes predictor in cystic fibrosis" *Pediatric Pulmonology*, Volume 49, Issue S38, Article first published online: 4 SEP 2014

- FFC Project#22/2013 "**Citizens' jury and decision making on cyst-**

**ic fibrosis carrier screening: to screen or not to screen?"** Paola Mosconi (Ist. di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" Laboratory for medical research and consumer involvement), Carlo Castellani (Centro fibrosi cistica, AOUI Verona)

#### Publications

- Colombo C. et al. "Alla scoperta del portatore sano della fibrosi cistica" *Ric&Pra* 2015;31(2):82-85
- Mosconi P. et al. "Giurie dei cittadini: coinvolgere e deliberare nell'interesse pubblico. Anche l'Italia è un paese di Giurie di cittadini" *Ric&Pra* 2015;31(4):149-158
- Mosconi P, Colombo C, Roberto A et al. "Deciding on cystic fibrosis carrier screening: three citizens' juries and an online survey" *Eur J Public Health.* 2018 Mar 19

#### Abstracts

- Colombo C. et al. "How to provide evidence-based information and translate Cochrane reviews to lay people in a deliberative setting: the Italian and the Australian citizen juries experience on population screening" 23<sup>rd</sup> Cochrane Colloquium Vienna, 3-7 October 2015
- Castellani C. et al. "Citizens' jury on cystic fibrosis carrier screening: yes or no?" 28<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 9-11 October 2014 Atlanta, USA.

- FFC Project#23/2013 "**The impact of chest computed tomography on clinical management of CF lung disease**" Harm Tiddens (Erasmus Medical Centre, Sophia Children's hospital, Department of Paediatric Pulmonology and Department of Radiology, Rotterdam), Baroukh Maurice Assael (Centro fibrosi cistica, AOUI Verona)

#### Publications

- Bortoluzzi CF, Pontello E, Pintani E et al. "The impact of chest computed tomography and chest radiography on clinical management of cystic fibrosis lung disease" *Journal of Cystic Fibrosis*, 2019 Sep 4. pii: S1569-1993(19)30837-9.

#### Abstracts

- Bortoluzzi C.F. et al. "TAC e RX torace possono influenzare il trattamento clinico dei bambini con FC?" 39<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 8 - 11 June 2016, Basel, Switzerland

- FFC#27/2014 "**Transmissibility and clinical significance of *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis**" Tortoli Enrico (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Div. di Immunologia, trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Lisa Cariani (Fondazione IRCSS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Clelia Di Serio (CUSSB-Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano), Stefan Niemann (Molecular Mycobacteriology, Research Center Borstel)

#### Publications

- Tortoli E, Kohl TA, Brow-Elliott BA et al. "Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov." *Int. J Systematic and Evolut. Microbiology* 2016 Nov;66(11):4471-4479.
- Tortoli E, Kohl TA, Trovato A et al "Mycobacterium abscessus in patients with cystic fibrosis: low impact of inter-human transmission in Italy" *European Respiratory Journal* 2017 Jul 13;50(1). pii: 1602525.
- Trovato A, Baldan R, Costa D et al. "Molecular typing of *Mycobacterium Abscessus* isolated from cystic fibrosis patients" *International Journal of Mycobacteriology* 2017 Apr-Jun;6(2):138-141.

#### Abstracts

- Trovato A. et al. "Analysis of *Mycobacterium abscessus* genetic variability provided by 14-locus variable-number tandem-repeat in patients with cystic fibrosis" 36<sup>th</sup> Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 28<sup>th</sup> June - 1<sup>st</sup> July 2015, Riga, Latvia

- FFC Project#28/2014 "**In vitro study of potential pro-fibrotic effect of Everolimus in different human airway cell lines. Searching for new biomarkers to optimize MTOR-inhibitor immunosuppressive treatment of cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation**" Gianluigi Zaza (Unità di Nefrologia, Dip. di Medicina, Azienda Universitaria Ospedaliera, Verona), Marco Chilosi (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

#### Publications

- Tomei P. et al. "Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation" *J Nephrol.* 2016 Dec;29(6):881-891
- Granata S, Santoro G, Masola V et al. "In Vitro Identification of New Transcriptomic and miRNomic Profiles Associated with Pulmonary Fibrosis Induced by High Doses Everolimus: Looking for New Pathogenetic Markers and Therapeutic Targets" *Int. J. Mol. Sci.* 2018 Apr 20;19(4).

- FFC Project#29/2014 **“Properties of airway mucus in cystic brosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate”** Olga Luisa A. Zegarra (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “Giannina Gaslini”, Genova)

#### Publications

- Stigliani M. et al. “Rheological properties of Cystic Fibrosis bronchial secretion and in vitro drug permeation study: the effect of sodium bicarbonate” *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2016 Aug;29(4):337-45
- Gianotti A. et al. “Pharmacological rescue of mutant CFTR protein improves the viscoelastic properties of CF mucus” *J Cyst Fibros.* 2016 May;15(3):295-301

#### Abstracts

- Stigliani M. et al. “Rheological properties of cystic fibrosis sputum and in vitro drug permeation study” 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16th - 17th 2015, Rome, Italy
- Gianotti A. et al. “Properties of airway mucus in cystic fibrosis: effect of bicarbonate”, 1st Italian CF Young Investigator Meeting, January 16<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Rome, Italy
- Gianotti A. et al. “Different pharmacological treatments are able to rescue the viscoelastic properties of CF mucus” 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 02 April 2016, Pisa, Italy
- Zegarra-Moran O. et al. “Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate” 13th Convention of Investigators in cystic fibrosis. *Journal of Postdoctoral Research, FFC Proceedings* 2015
- Gianotti A. et al. “Pharmacological rescue of mutant CFTR improves the viscoelastic properties of CF mucus” *Cystic Fibrosis Research News* (lay abstract associated to the *Journal of Cystic Fibrosis*) p295-301. Published online: December 8, 2015

- FFC Project#25/2015 **“Are CF guidelines credible? Evaluating methodological issues”** Cesare Braggion (Dipartimento di Medicina Pediatrica, Centro Regionale Fibrosi Cistica - Ospedale dei Bambini A. Meyer, Firenze)

#### Abstracts

- Terlizzi V, Cirilli N, Galici V et al. “Are cystic fibrosis guidelines credible? Evaluating methodological issues” 40th European Cystic Fibrosis Conference, Seville, Spain, 7–10 June 2017

- FFC Project#27/2015 **“Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations”** Natalia Cirilli (Centro di Riferimento per fibrosi cistica, Ospedale dei Bambini G. Salesi, Dipartimento Materno Infantile degli Ospedali Riuniti, Ancona)

#### Publications

- Cirilli N, Raia V, Rocco I et al. “Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations in CF, CFTR dysfunction, and healthy pediatric subjects” *Pediatr Pulmonol* 2018 Jun;53(6):728-734

#### Abstracts

- Cirilli N, Raia V, De Gregorio F et al. “Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations” 40th European Cystic Fibrosis Conference, Seville, Spain, 7–10 June 2017

- FFC Project#28/2015 **“Cystic fibrosis and meconium ileus: a multicentric study on risk factors for adverse outcome in infancy”** Rita Padoan (Centro di Supporto per fibrosi cistica - Università di Brescia, Ospedale dei Bambini, Azienda Ospedaliera Spedali Civili, Brescia)

#### Abstracts

- Padoan R, Cesana BM, Falchetti D et al. “Cystic Fibrosis and meconium ileus: a multicentric study on risk factors for adverse outcome in infancy” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017

- FFC Project#29/2015 **“Testing CFTR repair in cystic fibrosis patients carrying nonsense and channel gating mutations”** Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia e Diagnostica - Università di Verona), Monica Averna (Dip. di Medicina Sperimentale, sez. di Biochimica - Università di Genova)

#### Publications

- Sorio C. et al. “Mutations of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Cause a Monocyte-Selective Adhesion Deficiency” *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 May 15;193(10):1123-33
- Averna M. et al. “Abnormal activation of calpain and protein kinase Ca promotes a constitutive release of matrix metalloproteinase 9 in peripheral blood mononuclear cells from cystic fibrosis patients” *Arch Biochem Biophys.* 2016 Aug 15;604:103-12
- Bergamini G, Stellari F, Sandri A et al. “An IL-8 Transiently Transgenised Mouse Model for the In Vivo Long-term Monitoring of Inflammatory Responses” *J Vis Exp.* 2017 Jul 7;(125). doi: 10.3791/55499

#### Abstracts

- Vercellone S., Caldre S., Johansson J. et al. “Testing flow cytometry to detect CFTR expression recovery after drug treatment in epithelial cell lines” 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 2 April 2016, Pisa, Italy
- Sorio C. “The host’s and pathogen’s sides in cystic fibrosis: some views in an open field” 13th ECFS Basic Science Conference, 30 March – 2 April 2016, Pisa, Italy
- Vercellone S., Caldre S., Johansson J.E. et al. “Flow cytometric detection of cfr expression recovery after drug treatment in epithelial cell lines and leukocytes” 30th Cystic Fibrosis North American Conference, October 27-29, 2016, Orlando (Florida)
- Averna M, Vercellone S, Pedrazzi M et al “Setup of a simplified method to measure CFTR-dependent iodine transport: HS-YFP assay” 17th Scientific Meeting “Organoids as models for disease and treatment in CF” September 21st + 22nd 2017 Schloss Waldhausen/Mainz
- Averna M, Vercellone S, Pedrazzi M et al “A simple method to measure CFTR-dependent iodine transport peripheral blood mononuclear cells: HS-YFP assay” North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis
- Averna M, Vercellone S, Pedrazzi M et al. “A simple method to measure CFTR-dependent iodine transport peripheral blood mononuclear cells: HS-YFP assay” North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis

- FFC Project#30/2015 **“Pseudomonas aeruginosa eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing classic treatment protocols with classic treatment together with antibiotic treatment of upper airways”** Giovanni Taccetti (Dipartimento di Medicina Pediatrica, Centro fibrosi cistica - Università di Firenze, Ospedale dei Bambini A. Meyer, Firenze)

#### Abstracts

- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al “Importance of upper airways in early P. Aeruginosa infection in CF” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al “Role of paranasal sinuses in early P. aeruginosa infection in CF” North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al “Importance of upper airways in early P. aeruginosa infection in CF” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. “Importance of upper airways in early P. aeruginosa infection in CF” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. “Role of paranasal sinuses in early P. aeruginosa infection in CF” North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), November 2-4, 2017, Indianapolis
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. “Importance of upper airways in early P. Aeruginosa infection in CF” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. “Molecular monitoring of P. aeruginosa early eradication treatment” North American Cystic Fibrosis Conference (NACF), October 18-20, 2018, Denver, CO, USA
- Dolce D, Ravenni N, Campana S et al. “Phenotyping and molecular monitoring of P. aeruginosa during early eradication treatment” North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), October 31 - November 2, 2019 Nashville, TN (USA)

- FFC Project#20/2016 **“Italian multicenter study of glucose tolerance defects in cystic fibrosis”** Alberto Battezzati (Centro Internazionale per Inquadramento dello Stato Nutrizionale-ICANS, DeFENS, Università degli Studi di Milano)

#### Publications

- Colombo C, Alicandro G, Gambazza S et al. “Ventilation inhomogeneity is associated with OGTT-derived insulin secretory defects in cystic fibrosis” *Pediatr Pulmonol* 2018 Dec 21. doi: 10.1002/ppul.24212.

#### Abstracts

- Nazzari E, Guarise R, Mileto P et al. “Relationship between glucose and insulin response during an oral glucose tolerance test (OGTT) and lung clearance index in cystic fibrosis patients” XIII Congresso Nazionale SIFC, Napoli, 22-25 Novembre 2017

- FFC Project#22/2016 **“Environmental and human reservoirs of Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species colonizing the lower airways of cystic fibrosis patients”** Caterina Signoretti (Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia, Università di Verona)

#### Publications

- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. “Toothbrushes may



convey bacteria to the cystic fibrosis lower airways" *Journal of Oral Microbiology*, 2019 Aug 7;11(1):1647036. doi: 10.1080/20002297

#### Abstracts

- Sandri A, Cazzarolli C, Burlacchini G et al. "Human reservoirs of pathogens colonising the airways of cystic fibrosis patients" 41st European Cystic Fibrosis Conference, Belgrade, Serbia, 6-9 June 2018
- Passarelli Mantovani R, Burlacchini G, Sandri A et al. "Human and environmental reservoirs of bacterial species colonising the lower airways of cystic fibrosis patients" 42nd European Cystic Fibrosis Conference, 5-8 June 2019, Liverpool, UK
- Passarelli Mantovani R, Signorello C, Sandri A et al. "Investigação do papel dos reservatórios bacterianos para infecção pulmonar crônica em paciente com fibrose cística" *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, VII Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 1-4 de maio de 2019, Expo D. Pedro, Campinas, SP
- FFC Project#30/2018 "**Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome**" Vito Terlizzi (Centro FC, AOU Meyer, Firenze), Rita Padoan (Centro supporto FC, Spedali Civili, Brescia); Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

#### Publications

- Terlizzi V, Mergni G, Buzzetti R et al. Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): experience in Tuscany, Italy, *Journal of Cystic Fibrosis*, 2019 Jul;18(4):484-490
- Taccetti G, Botti M, Terlizzi V et al. "Clinical and Genotypical Features of False-Negative Patients in 26 Years of Cystic Fibrosis Neonatal Screening in Tuscany, Italy" *Diagnostics (Basel)* 2020 Jul 1;10(7):446
- Terlizzi V, Mergni G, Centrone C et al. "Trend of sweat chloride values in a cohort of patients carrying CFTR mutations of varying clinical consequence: Is there a risk of increasing sweat chloride over time?" *Pediatr Pulmonol* 2020 May;55(5):1089-1093
- Castaldo A, Cimbalo C, Castaldo RJ et al. "Cystic Fibrosis-Screening Positive Inconclusive Diagnosis: Newborn Screening and Long-Term Follow-Up Permits to Early Identify Patients with CFTR-Related Disorders" *Diagnostics (Basel)* 2020 Aug 8;10(8):E570

#### Abstracts

- Terlizzi V, Mergni G, Buzzetti R et al. "Cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis: six years of experience in an Italian cystic fibrosis center" 32th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) 2018

## FFC Facilities

- **Cystic Fibrosis animal Core facility 1 (CFaCore 1)** Alessandra Bragonzi (Fondazione Centro San Raffaele)

#### Publications

- Bragonzi A. et al. "Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens" *Int J Med Microbiol*. 2010 Dec;300(8):584-93. Epub 2010 Oct 14. Review
- Facchini M. et al. "Long-term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice" *J Vis Exp*. 2014 Mar 17;(85)
- Kukavica-Ibrulj I FM et al. "Assessing *Pseudomonas aeruginosa* virulence and the host response using murine models of acute and chronic lung infection" *Methods Mol Biol*. 1149:757-71
- Facchini M, De Fino I, Riva C, Bragonzi A "Long term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice" *J Vis Exp* 2014 Mar 17;(85). doi: 10.3791/51019

- **Cystic Fibrosis animal Core facility 2 (CFaCore 2)** Alessandra Bragonzi (Fondazione Centro San Raffaele)

#### Abstracts

- Facchini M, De Fino I, Riva C et al. "Long Term Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Airway Infection in Mice" <https://www.jove.com/video/51019>

- **Cystic Fibrosis animal Core facility 4 (CFaCore 4)** Alessandra Bragonzi (Fondazione Centro San Raffaele)

#### Abstracts

- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. "Treating acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection: what can we learn from mouse models?" ECFC Basic Science Conference 2018, 21 -24 March 2018, Loutraki Korinthias, Greece

- **Cystic Fibrosis Database (CFDB)**

#### Publications

- Buzzetti R et al. "CFDB (cystic fibrosis database): a new web-based tool for cystic fibrosis specialists". *Pediatr Pulmonol*. 2014 Sep;49(9):938-40

- **Servizio Culture Primarie** Luis Galiotta (Laboratorio Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova)

#### Publications

- Prandini P, De Logu F, Fusi C, Provezza L et al. "Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Patients with Cystic Fibrosis" *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2016 Nov;55(5):645-656.
- Gianotti A, Capurro V, Del Piano L et al. "Small Molecule Anion Carriers Correct Abnormal Airway Surface Liquid Properties in Cystic Fibrosis Airway Epithelia" *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Feb 21;21(4). pii: E1488.
- Gianotti A, Delpiano L, Caci E "In vitro Methods for the Development and Analysis of Human Primary Airway Epithelia" *Frontiers in Pharmacology* 2018 Oct 26;9:1176

## Appendix 2

# *Institutes and Laboratories involved in the 419 projects funded by Italian CF Research Foundation 2002-2020*

## Istituti e Laboratori attivi nei 419 progetti finanziati da FFC dal 2002 al 2020

### ITALY

#### ABRUZZO

- Dip. Scienze Biomediche , Lab Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti
- Dip. Medicina Sperimentale, Università dell'Aquila, L'Aquila
- Dip. Biologia Cellulare ed Oncologia, Consorzio Mario Negri Sud, S. Maria Imbaro (Chieti)
- Dip. Farmacologia Translazionale, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Università Chieti-Pescara Centro FC, Teramo
- Lab. Citomorfologia, Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università Chieti-Pescara

#### CALABRIA

- Lab. Clinico Patologico -Ospedale di Soverato, Soverato (CZ)

#### CAMPANIA

- Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l., Università Federico II, Napoli
- Dip. Pediatria, Università Federico II, Napoli - Lab. Microbiologia Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica, Università Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Università Federico II, Napoli
- Dip. Farmacia, Università di Salerno
- Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli
- Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli
- Istituto di Chimica Molecolare, CNR, Napoli
- Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Centro FC, Napoli
- Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, Napoli
- Dip. di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II, Centro Regionale Fibrosi Cistica
- Dip. di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Di.S.T.A.Bi.F. Seconda Università di Napoli
- Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli, Napoli
- The Center for Advanced Biomaterials for Healthcare, CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia, Napoli
- Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università Federico II, Napoli
- Dip. di Biologia, Università Federico II, Napoli
- Dip. Scienze Chimiche, Università Federico II, Napoli
- Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

#### EMILIA ROMAGNA

- Plesso Biotecnologico Integrato, Università di Parma, Parma
- Dip. Pediatria, Università di Parma, Parma
- Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara
- Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara
- Dip. Biochimica, Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie Analitiche Avanzate, Piacenza - Dip. Scienze cliniche, Università degli Studi di Parma
- Dip. Oncologia, Ematologia e Malattie respiratorie, Università degli Studi di Modena

- Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna
- Dip. Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Università di Ferrara, Signal Transduction Lab
- Dip. di Chimica, Scienze della Vita e Sostenibilità ambientale, Università degli Studi di Parma
- Istituto di Scienza e Tecnologia dei materiali ceramici ISTEC, CNR, Faenza

#### FRIULI VENEZIA GIULIA

- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)-Trieste
- Dip. di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo - Università di Trieste - I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, Trieste
- Dip. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare, Università di Trieste
- Dip. Scienze Biomediche, Università di Trieste
- Dip. Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste

#### LAZIO

- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo -Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini -Università Tor Vergata, Roma
- Dip. di Biologia -Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia -Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC -Università Roma 1 "La Sapienza", Roma
- Dip. di Fisiopatologia Medica -Università La Sapienza, Roma
- Technical Unit for Sustainable Development and Innovation of Agro-Industrial System, ENEA Casaccia Research Center, Lab. Microbiology, Rome
- Lab. di Microbiologia-Ospedale Bambino Gesù-Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia, Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e biologia cellulare, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentali, Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Sanità Pubblica, Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Medicina interna e vascolare, Università La Sapienza, Roma
- Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma
- Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microorganismi, Dip. Biologia, Università Roma Tre
- Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Roma;
- Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma
- Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Università La Sapienza, Roma
- Centro fibrosi cistica, Policlinico Umberto I
- Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Università La Sapienza, Roma, Roma
- Dip. Biologia e Biotecnologie, Università La Sapienza, Roma, Roma
- IRBM Science Park, Roma
- Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto superiore di sanità, Roma
- Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma
- Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Gemelli, Roma

- Istituto Italiano Pasteur - Cenci Bolognetti Foundation, Roma
- Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, Università La Sapienza, Roma
- Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I
- Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università La Sapienza, Roma

## LIGURIA

- Istituto di Biofisica -CNR, Genova
- Università di Genova, Genova- Lab. di Fisiopatologia dell'Uremia -Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Genetica umana E.O. Ospedali Galliera, Genova
- Lab. Genetica Molecolare -Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Medicina Molecolare -Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Centrale Analisi -Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione Microbiologia -DISCAT, Genova
- ARPAL (Agenzia Reg. Protezione Ambiente Ligure), Genova
- Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria-Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria - Lab. Microbiologia - Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale - Università degli Studi di Genova
- Lab. Fisiopatologia molecolare dei canali ionici - Centro Biotecnologie Avanzate, Ist. Gaslini, Genova
- Dip. Farmacia (DIFAR), Università di Genova
- Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova
- Div. Malattie Infettive, Università di Genova, Ospedale San Martino, Genova

## LOMBARDIA

- Istituto Statistica e Biometria-Università di Milano, Milano
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti-Ospedali Riuniti, Bergamo
- Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti - Ospedali Riuniti, Bergamo
- Lab. Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. Bioscienze - Università degli Studi di Milano, Milano
- Dip. Genetica e Microbiologia -Università di Pavia, Pavia
- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica -Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane-Fondazione Centro San Raffaele, Milano
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI)
- Lab. Ricerca Clinica -Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Università di Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Università di Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca, Milano
- Dipartimento di chirurgia e medicina interdisciplinare - Università Bicocca, Milano
- Div. Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto "San Raffaele", Milano
- Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche, Istituto "G. Ronzoni", Milano
- Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano
- Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano
- Unità Patogeni Batterici Emergenti, Div. di Immunologia, trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano
- Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano
- Istituto Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for medical research and consumer involvement
- Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Bicocca, Milano
- Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Ospedale S. Paolo, Università degli Studi di Milano
- Dip. Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

- Dip. Ingegneria Strutturale, Politecnico di Milano
- Centro FC, Lab. Patologia Clinica, Fondazione IRCCS, Ca' Granda, Milano
- Istituto europeo per la ricerca sulla fibrosi cistica (I.E.R.F.C.) Fondazione ONLUS c/o HSR, Milano
- Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia
- Dip. Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano
- International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) - DeFENS Università di Milano
- Humanitas University, Rozzano, Milano
- Computational Sciences, Chemical Core Technologies Department, Nerviano Medical Sciences Srl, Nerviano, (MI)
- Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università di Milano, Segrate (MI)
- Dip. Biochimica Medica e Medicina Traslazionale, Università di Milano
- Università di Brescia, Ospedale dei Bambini, AO Spedali Civili, Brescia
- Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Università di Milano
- U.O. di Chirurgia Toracica e Trapianto di Polmone, Università degli Studi di Milano, IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore di Milano
- Dip. di Biologia e Biotecnologia "Lazzaro Spallanzani", Lab. Microbiologia molecolare, Università degli Studi di Pavia
- Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano
- Istituto di Genetica e Ricerca biomedica, IRGB - CNR, Milano
- Divisione Genetica e Biologia Cellulare, Unità dinamica della cromatina, Ospedale San Raffaele, Milano
- Politecnico di Milano, Dip. Elettronica, Informazione e Bioingegneria
- Dip. Psicologia, Università Cattolica, Milano

## MARCHE

- Centro Fibrosi Cistica-Ospedale dei Bambini - Centro FC, Ancona
- Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche
- Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino
- Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università di Urbino
- Centro di Epidemiologia, Biostatistica e Informatica Medica, Università Politecnica delle Marche

## PIEMONTE

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche-Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica - Università di Torino, Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline medico chirurgiche, Sez. Anestesia e rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino
- Dip. di Scienze cliniche e biologiche, Università di Torino
- Centro di biotecnologia molecolare, Università di Torino
- Dip. di Biotecnologia Molecolare e Scienze della Salute, Università di Torino
- Dip. Scienze e Innovazione Tecnologica, Università Piemonte Orientale

## PUGLIA

- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale - Università di Bari, Bari
- Servizio Fibrosi Cistica - Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Biomediche - Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria - Policlinico - Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari

## SARDEGNA

- Dip. di Scienze biomediche e biotecnologie, Lab. Genetica Molecolare - Ospedale Reg. Microcitemie, Università di Cagliari



- Dip. Tossicologia - Sez. Patologia e Oncologia Molecolare, Università di Cagliari

#### SICILIA

- Istituto di Biofisica - CNR, Palermo
- Centro Fibrosi Cistica - Policlinico, Messina,
- Centro Regionale FC - Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo
- Dipartimento Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università degli Studi di Palermo
- Dipartimento di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie -STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università degli Studi di Palermo
- Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica, AOU Messina

#### TOSCANA

- Dip. Biologia Animale e Genetica-Università di Firenze, Firenze
- Lab. Proteomica Funzionale, Dip. Biologia Molecolare -Università di Pisa, Pisa
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio Fibrosi Cistica - Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia -Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Chiron, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Università di Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica- Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze
- Dip. Biologia Molecolare, Sez. Chimica Biologica - Università di Siena
- Dip. Biotecnologia, Chimica e Farmacia, Università di Siena
- Dip. Biotecnologie Mediche, Università di Siena
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze
- Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università degli Studi di Firenze
- Dip. Scienze Sanitarie, Unità di Farmacologia Clinica e Oncologica, Università di Firenze
- Dip. Ricerca Trasazionale NTMS - Lab. Patologia Generale, Università di Pisa
- Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze
- Unità Infezione e Malattie Tropicali, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

#### TRENTINO-ALTO ADIGE

- CIBIO – Centre for Integrative Biology, Università di Trento
- CIBIO – Centre for Integrative Biology, Università di Trento, Computational Metagenomics Lab
- Istituto di Biofisica, CNR, Trento

#### UMBRIA

- Dipart. Medicina Interna - Sez. Biochimica Applicata e Scienze Nutrizionali - Università degli Studi di Perugia
- Dipart. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche - Università degli Studi di Perugia
- Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università degli Studi di Perugia
- Dip. Biotecnologie, Università degli Studi di Siena
- Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia

#### VENETO

- Dip. Medicina Interna, Università degli Studi di Verona, Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico di Genetica e Screening neonatale, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. di Patologia, Sezione immunologia, Università degli Studi di Verona
- Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Sezione di Anatomia ed Istologia, Università degli Studi di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia

- e Genetica, Università degli Studi di Verona
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia - Università degli Studi di Verona
- Dip. di Patologia e Diagnostica - Patologia Generale - Università degli Studi di Verona
- Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Lab. di Traffico Cellulare e Trasduzione del segnale
- Lab. di Microbiologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università degli Studi di Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Verona
- Dip. Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova
- Dip. Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova
- Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento, Università degli Studi di Verona
- Servizio fibrosi cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso
- Ist. di Clinica Pediatrica, AO e Università degli studi Padova
- Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova
- Dip. di Diagnosi e Salute Pubblica, Sezione di Microbiologia, Università di Verona
- Dip. di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova
- Dip. di Informatica, Università degli Studi di Verona
- Dip. Medicina, Unità di Gastroenterologia, Università degli Studi di Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università degli Studi di Padova
- Dip. Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Div. Chirurgia toracica, AOU Padova

#### EUROPE

##### BELGIUM

- Dept. of Clinical Chemistry, Catholic University of Louvain - St. Luc University Hospital, Louvain
- Louvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology (LTAP), Université Catholique de Louvain, Brussels
- Lab. of Molecular Bacteriology ULB, Faculty of Medicine, Bruxelles
- Lab. for Molecular Virology & Gene Therapy, Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, KU Leuven

##### FRANCE

- Institute of Cell Physiology and Biology, University of Poitiers
- Pediatric Cystic Fibrosis Center of Trousseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris
- Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, INSERM U1138
- Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP Laboratory of General Biochemistry, Paris
- Hôpital Cochin, Paris
- St-Antoine Research Center, Inserm, Paris

##### GERMANY

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen
- Institute für Medizinische Mikrobiologie, Universitäts Klinikum, Munster
- Molecular Mycobacteriology, Research Center Borstel
- Institute of Physiology I, Life & Brain Center, University of Bonn
- Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München

##### IRELAND

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, Belfast

##### SWITZERLAND

- Dept. of Pediatrics, University Hospital and Faculty of Medicine, Geneva
- Polyphor Ltd, Switzerland, Geneva

##### SPAIN

- Dep. Microbiology, University of Zaragoza

**THE NETHERLANDS**

- Dept. Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam

**UNITED KINGDOM**

- Dept. of Respiratory Medicine, Freeman Hospital, The Medical School University of Newcastle
- School of Biological Science, University of Liverpool
- Division of Pharmacology, Pharmacy and Biomedical Science, University of Portsmouth
- Epithelial Research Group, Institute for Cell and Molecular Biosciences, University Medical School, Newcastle University, Newcastle upon Tyne
- Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester

**OUTSIDE EUROPE****CANADA**

- Dept. of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

**ISRAEL**

- Schulich Faculty of Chemistry Technion - Israel Institute of Technology, Haifa
- Dept. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Haifa
- Clinical Microbiology and Immunology, Tel Aviv University
- Dept. of Clinical Microbiology and Immunology, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University,

**UNITED STATES**

- Dept. Pediatrics, Respiratory Medicine, Yale University School of Medicine, USA
- Department of Environmental and Occupational Health, University of Pittsburgh, USA
- University of South Alabama College of Medicine, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Mobile
- Marsico Lung Institute/Cystic Fibrosis Research Center, University of North Carolina at Chapel Hill

**RUSSIAN FEDERATION**

- Laboratory for Biomedical Chemistry, Federal Research Center, Moscow

## Appendix 3

# *International Reviewers of FFC Projects (2002-2020)*

### **ASIA**

#### **Hong Kong**

Dennis Lo Yuk Ming

#### **India**

Vikas Gautam

Amit Misra

#### **Israel**

Batsheva Kerem

Orit Reish

Hanoch Senderowitz

#### **Turchia**

Duygu Gözen

#### **Japan**

Hiroshi Kubo

### **AUSTRALIA**

Scott Bell

Margaret Cooley

Martin Delatycki

Manohar Garg

Allan Glanville

Phil Hansbro

Tim Kidd

John Massie

John Mattick

(Keith) Chee Ooi

Sarath Ranganathan

David Reid

Louis Rendina

Tony Velkov

Cynthia Withchurch

### **EUROPE**

#### **Austria**

Thomas Eiwegger

Peter Jacksch

Robert Knobler

#### **Belgium**

Karim Amighi

Gilles Brackman

Jean Jacques Cassiman

Tom Coenye

Pierre Cornelis

Aurélie Crabbé

Harry Cuppens

Christiane De Boeck

Ingeborg Liebaers

Savvas Savvides

Peter Vandamme

#### **Czech Republic**

Jan Krejsek

#### **Denmark**

Thomas Bjarnsholt

Oana Ciofu

Niels Højby

Christian Koch

Marie Johannesson

Jette Elisabeth Kristiansen

Søren Molin

Peter E. Nielsen

#### **France**

Emmanuel Andres

Frederic Becq

Frank Brouillard

Mireille Claustres

Christelle Coraux

Laurent Debarbieux

Laurence Delhaes

Isabelle Durieu

Alexander Edelman

Brigitte Fauroux

Claude Ferec

Chantal Gauthier

Emanuelle Girodon

Vincent Goffin

Aurélie Goyenville

Genevieve Hery Arnaud

Jacky Jaquot

Eric Kipnis

Laurent Kremer

Jean Paul Latgé

Frederic Laurent

Fabien Lecaille

Patricia Lemarchand

Christine Linard

Olivier Mignen

Anne Munck

Patrizia Paterlini-Brèchot

Jean-Marc Rolain

Marie Catherine Romey

Juliet Royet

Magali Taulan-Cadars

Isabelle Sermet

Virginie Scotet

Olivier Tabary

Lhousseine Touqui

Pascal Trouvè

Clarisse Vandebrouck

Guillaume Van Niel

#### **Germany**

Robert Bals

Wolfgang H. Binder

Michael De Vrese

Jahn Dieter

Gerd Döring

Stephan Fischer

Christoph Freiberg

Matthias Griese

Erick Gulbins

Dominik Hartl

Andreas Hector

Jürgen Heesemann

Barbara Kahl

Winfried Kern

Wolfgang Kuebler

Karl Kunzelmann

Jochen G. Mainz

Frank-Michael Müller

Markus Pietsch

Hermann Schillers

Ursula Seidler

Stefan Stamm

Gratiana Steinkamp

Burkhard Tuemmler

Martin Ulrich

Christiane Wolz

#### **Greece**

George Makrydimas

#### **Ireland**

Colum Dunne

Elena Fernandez Fernandez

Catherine Greene

Brian Harvey

Siobhán McClean

Irene Oglesby

Cian O'Leary

Emer Reeves

#### **Italy**

Guido Antonelli

Tiziano Bandiera

Giovanna Batoni

Flavia Bazzoni

Alessandra Bragonzi

Carlo Castellani

Paola Catastini

Antonio De Flora

Fabrizio De Ponti

Luis Juan Vicente Galietta

Silvio Garattini

Marco Lucarelli

Giuseppe Magazzù

Oscar Moran

Nicoletta Pedemonte

Marco Trabucchi

#### **Portugal**

Margarida Amaral

Jorge Leitão

Raquel Sabino

#### **Spain**

Guillermo Mtz. de Tejada de

Garaizábal

Raquel Barrio

Jaume Bertranpetit

Ana Bustamante-Aragones

Rafael Cantón

Xavier Estivill

Gertrudis Horna

#### **Sweden**

Gunnar C. Hansson

Ute Romling

Birgitta Strandvik

Craig Wheelock

Peter Zygmunt

#### **Switzerland**

Leo Eberl

Lukas Ebner

Dieter Haas

Hans Peter Fisher

Adin Ross-Gillespie

Bernard Rossier

Peter Sander

#### **The Netherlands**

Jeffrey Beekman

Touw Daan

Hugo De Jonge

Peter Klijn

Lidewij Henneman

Erik Hulzebos

Peter JFM Merkus

Charlotte Robbroeks

Harm Tiddens

Bernt Van Der Blink

Kors van der Ent

#### **U.K. - Northern Ireland**

U.K. – Northern Ireland

Matthew Avison

Maria G. Belvisi

Charlotte Billington

James Birchall

Marina Botto

Malcolm Brodlie

Alan Brown

Alan R. Cowley

Andrew Bush

Philip Calder

Steven Conway

Jane Davies

Louise Donnelly

Robert Dormer

Alistair Duff

Stuart Elborn

Madeleine Ennis

Glenda Esmond

Thomas Evans

Alain Filloux

Andres Floto

Paul Foster

Jo Fothergill

Peter Gahan

Erol Gaillard

Claire Glasscoe

John Govan

Michael Gray

Robert Gray

Andrew Greening

Uta Griesenbach

Katjia Hill

Alexander Horsley

Eshwar Mahenthiralingam

Anil Mehta

Maurice Hallett

Andrew Jones

Julian Parkhill

Mauro Perretti

Tyrone Pitt

Daniela Riccardi

Geraint Rogers

Martin Savage

David Sheppard

David Smith

Liz Sockett

Kevin Southern

Maurice Super

Hui-leng Tan

Tunney Michael

Sabeel Valappil

Ludovic Vallier

Paola Vergani

John Widdicombe

Craig Winstanley

#### **Ungary**

Mónika Homa

### **SOUTH AMERICA**

#### **Brazil**

Margaret Cristina da Silva

Boguszewski

Veralice Meireles Sales

de Bruin

Mauro M. Teixeira

#### **Costa Rica**

Arturo Solis

#### **Venezuela**

Juan Bautista De Sanctis

### **NORTH AMERICA**

#### **Canada**

Christine Bear

André Cantin

Tom Clandinin

Elizabeth Cowley

Lori Burrows

Peter Durie

Tanja Gonska

Hartmut Grasmann

Bob Hancock



Yeger Herman  
Susan Koval  
Sheila Innis  
Roger Levesque  
Paul Linsdell  
Gergerly Lukacs  
Tong-jun Lin  
George A Mackie  
François Malouin  
Liu Mingyao  
Robert Newton  
Michael Parkins  
Grace Parraga  
Paul Pencharz  
Martin Post  
Danuta Radzioch  
Felix Ratjen  
Andrew Sandford  
Molly Schmid  
Aaron Shawn  
Christopher Sibley  
Pamela Sokol  
David Speert  
Michael G Surette  
Miguel Valvano  
Valerie Waters  
Michael Wheeler  
Herman Yeger  
Julian Zielensky

#### **U.S.A.**

##### **Alabama**

Bakhrom K. Berdiev  
David Bedwell  
John Paul Clancy  
Kim Keeling  
Lisa Schwiebert  
Robert Wang

##### **California**

Myriam Amsallem  
William Balch  
Annelise Barron  
Carroll Cross  
Beate Illek  
Ryan Hunter  
Ronald Kopito  
Klaus Ley  
Terry Machen  
Richard Moss  
Malla M. Reddy  
Evan Powers  
Paul Quinton  
Minnie Sarwal  
David A. Stevens  
Charles M. Strom  
Alan Verkman  
Jeffrey Wine

##### **Colorado**

Frank Accurso  
Charles L. Daley  
Brian Day  
Brian Doctor  
Jonathan Harris  
Jerry A. Nick

Scott Sagel  
Herbert Schweizer  
Jeff Wagener  
Marty Zamora

##### **Connecticut**

Nadia Ameen  
Peter Glazer  
Diane Krause  
Joseph L. Kuti  
Curt Scharfe  
Li Tianbo

##### **Florida**

Alexander Cole  
Alexandra Quittner

##### **Georgia**

Scott Grosse  
Rabindra M. Tirouvanziam

##### **Illinois**

John Christman  
Ann Harris  
Anver Kuliev  
Le Shen  
Lee Shulman  
Jerrold Turner

##### **Indiana**

Crislyn D'Souza-Schorey  
Roman Dziarski  
Won Kyoo Cho  
Irina Petrache

##### **Iowa**

Xiaopeng Li  
Dwight C. Look  
Jonathan Paul M Mochel  
Patrick Sinn  
Ziyang Yan  
Joseph Zabner

##### **Kansas**

John Gatti

##### **Kentucky**

Stefan Stamm  
Jay Zwischenberger  
Joseph Zwischenberger

##### **Louisiana**

Jay K. Kolls  
Guoshun Wang

##### **Maine**

Robert Owens

##### **Maryland**

Biswas Roopa  
Gary Cutting  
Robert K. Ernst  
William Guggino  
Andy Kilianski  
Samuel Lai  
Gary Mansfield  
Christian Merlo  
Peter Mogayzel  
Amanda Oglesby-Sherrouse  
Kenneth N. Olivier  
Jonathan Orens  
Harvey Pollard  
Keith J. Slifer  
Neeraj Vij  
Jerry Wright

Pamela Zeitlin  
**Massachusetts**  
Martin Joyce-Brady  
Terence Flotte  
Steven Freedman  
Bryan Hurley  
Allan Jacobson  
Robert Kolter  
John Ladias  
Bruce Levy  
Stephen Lory  
Hongmei Mou  
Gerald Pier  
Stefan Ryter  
Gregory Sawiki  
Charles Serhan  
Susan Slaughaupt

##### **Michigan**

Daniel Klionsky  
John Li Puma  
Mary O'Riodan  
Kathleen Stringer

##### **Minnesota**

Robert C. Huebert  
Mark Kurth  
Antoinette Moran

##### **Missouri**

Carolyn Cannon  
Thalachallour Mohanakumar  
Stuart Sweet

##### **Nebraska**

Bradley Britigan  
Channabasavaiah  
Gurumurthy

##### **New Hampshire**

Dean Madden  
George A. O'Toole

##### **New York**

Isabel Aznarez  
Nazzareno Ballatori  
Ville Friman  
David Goldfarb  
Cole Haynes  
Alice Prince  
Lisa Saiman  
Patricia Sime  
Stefan Worgall  
Tilla S. Worgall

##### **North Carolina**

Adler Kenneth B.  
Robert Aris  
Michael Boyle  
Douglas Cyr  
Charles Esther  
Martina Gentsch  
Andrew Ghio  
Mehmet Kesimer  
Michael Knowles  
Marianne Muhlebach  
John Riordan  
Gabriel Sherif  
Robert Tarran

##### **Ohio**

Amal Amer

Melvin Berger  
Maria Britto  
James Chmiel  
Mitchell Drumm  
Dana S. Hardin  
Ann Harris  
Daniel Hassett  
Scott Herness  
Craig Hodges  
Lloyd Horrocks  
Valerie Hudson  
Christopher Karp  
Thomas J. Kelley  
Michael Konstan  
Benjamin Kopp  
Sanjay Rajagopalan  
Adriano Tonelli  
Daniel Woziak

##### **Oregon**

David C. Dawson  
Bruce L. Geller  
Xuehong Liu

##### **Pennsylvania**

Jennifer Bomberger  
Robert Bucki  
Raymond Frizzell  
David Orenstein  
Keven Mara Robinson  
Ronald Rubenstein  
Douglas Wilson

##### **South Carolina**

Patrick Flume

##### **Tennessee**

John Christman  
Michael Laposata  
Vasiliy V. Polosukhin

##### **Texas**

Carolyn Cannon  
Brian R Davis  
Tawanda Gumbo  
Philip Thomas

##### **Utah**

Valerie Hudson  
Guy Zimmerman

##### **Vermont**

Daniel J. Weiss

##### **Virginia**

Joanna Goldberg  
Dennis E. Ohman  
Bruce Rubin

##### **Washington**

Moira Aitken  
Jane Burns  
Chris Goss  
E. Peter Greenberg  
Lucas Hoffmann  
Samuel I. Miller  
Matt Parsek  
Margaret Rosenfeld  
Sina Tavakoli

##### **Wisconsin**

Philip Farrel  
Krishanu Saha  
Don Sanders

## **Aknowledgment**

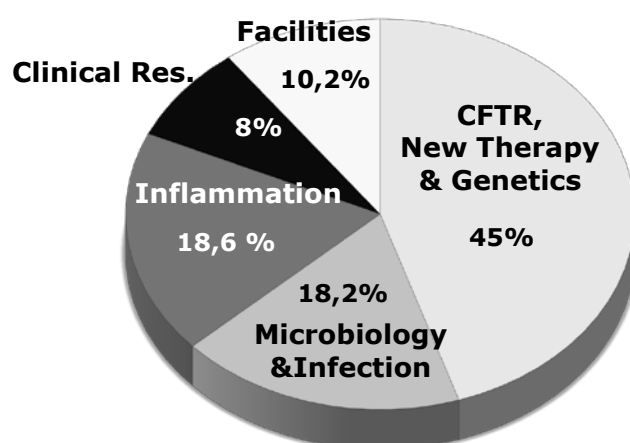
*The Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (FFC) wishes to thank all the reviewers who have so far contributed to evaluate research proposals submitted annually to the Foundation. Their strong commitment to critical analysis and targeted suggestions have helped to optimally qualify the activities of the FFC research network.*

## 2002-2020 FFC Projects: funding and publications

Progetti FFC 2002-2019: finanziamento e pubblicazioni

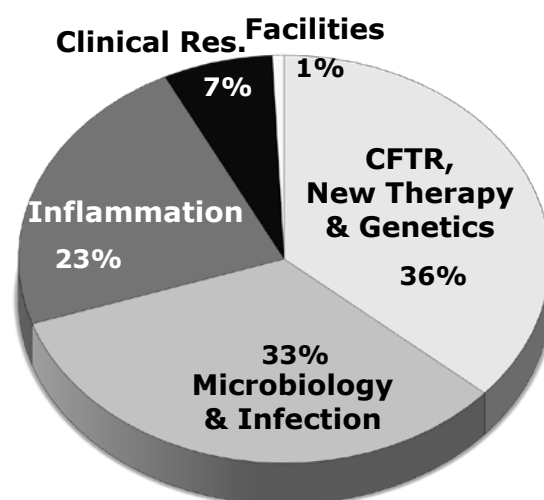
### FFC Funding by Research Areas and Facilities (2002-2020)

Total Funding: € 31.272.069



### FFC Publications by Research Areas (2002-2020)

Total number of Publications: 703



### FFC projects (2018-2020) adopted by FFC Supporters

#### Progetti FFC (2018-2020) adottati da Sostenitori FFC

Progetto strategico **FFC/TFCF - Task Force for Cystic Fibrosis**  
Responsabile: **Luis Juan Vicente Galiotta** (Lab. Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova)

Costo complessivo: € 1.250.000

Fase 1: € 200.000. Adottato parzialmente da: **Energy T.I. Group S.p.A. Milano** (€ 100.000), **LIFC Associazione Siciliana Onlus in ricordo di Davide Radicello** (€ 20.000), **Danone SpA** (€ 50.000).

Fase 2: € 370.000. Adottato parzialmente da: **Amici per la Ricerca Loifur srl** (€ 35.000), **Famiglia per la Ricerca FC** (€ 40.000), **Fondazione Corrado e Bruno Maria Zaini** (€ 35.000).

Fase 3: € 680.000. Adottato parzialmente da: **Dekra SpA** (€ 25.000), **Fondazione Corrado e Bruno Maria Zaini** (€ 35.000), **Brandart** (€ 10.000), **Rortos srl** (€ 10.000), **Piazzalunga srl** (€ 10.000), evento **“Uno swing per la ricerca”** promosso dalla **Delegazione FFC di Villa d’Almè** (€ 24.600), **quota parziale Cinque per mille 2014** (€ 130.000), **Bike Tour 2016** (€ 55.000), eventi **“La notte dei sapori 2”** e **“FFC Golf Cup 2016”** (€ 20.000), **Gruppo Aziende Nordest**, **Delegazioni FFC di Vicenza e di Verona Val d’Alpone** (€ 15.000), **Numero Solidale Natale 2016** (€ 17.151), **Campagna di Natale FFC 2016** (€ 50.000), **Saint Gobain** (€ 8.000), **SLF Abrasivi srl** (€ 10.000), **Famiglia per la ricerca** (€ 30.000), **“Amici per la ricerca” Bassano del Grappa** (€ 27.000), **Loifur** (€ 10.000), **Mevis spa** (€ 10.000), **Amici della ricerca di Milano** (€ 12.000), **Evento “Dai respiro alla Ricerca”**, **Delegazione FFC di Palermo** (€ 20.000), **Fondazione Mediolanum** (€ 40.900), **Evento “Guardare lontano”**, **Delegazione FFC di Milano** (€ 15.000), **Project Hope Rosa Pastena** (€ 21.000), **Lega Italiana Fibrosi Cistica di Messina - Dinner Claudio Miceli** (€ 23.000), **#CorrerePerUnRespiro** (€ 15.000), **Imprese straordinarie - Milano per la Ricerca** (€ 17.000), **Trofeo Neurone** (€ 16.500)

#### Extension e fase preclinica

Responsabile: **Tiziano Bandiera** (Dip.to Drug Discovery, Istituto Italiano Tecnologia, IIT, Genova)

Partner: **Nicoletta Pedemonte** (Lab. Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova); Principale consulente esterno: **Luis Juan Vicente Galiotta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Napoli)

Costo: € 2.000.000. Adottato parzialmente da: **Evento “Marafibrositona 2017”** promosso dalla **Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 56.000), **Il cuore degli amici di Bergamo** (€ 40.000), **Piazzalunga srl** (€ 10.000), **Quota parziale Cinque per mille redditi 2016** (€ 146.400), **Dondup** (€ 10.000), **Fondazione Bruno Maria Zaini** (€ 35.000), **Marcella e Lorenzo Turazza** (€ 22.000), **Donazioni Campagna di Pasqua 2017 finalizzate Task Force** (€ 50.000), **“Dai energia alla ricerca”** (€ 100.000), **Lascito Famiglia Scarpa** (€ 20.000), **Evento “Insieme per donarti un respiro” 4ª ed.**, **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa** (€ 10.000), **Evento “Artisti per un respiro” 4ª ed.**, **Delegazione FFC di Catania Mascalucia** (€ 10.000), **“Alla ricerca di un sorriso 6”** promosso da **Gruppo di Sostegno FFC di Seregno** (€ 25.000), **SEI Toscana** (€ 12.000), **Saint Gobain** (€ 10.000), **Amici per la Ricerca di Bassano** (€ 31.500), **Loifur** (€ 20.000), **Latteria Montello** (€ 15.000), **Ma.Gia srl** (€ 10.000), **Progetto “Tredici/43”**, **Delegazione FFC di Vicenza** (€ 50.000), **Proventi libro “Smeraldi a colazione” – 2017** (€ 20.000), **#CorrerePerUnRespiro 2018** (€ 20.000), **Metropole** (€ 21.000), **Famiglia Calabrese De Feo** (€ 20.000), **Bike Tour FFC 2017** (€ 47.000), **Sforgia Torino srl** (€ 20.000), **Evento “Verdi legge Verdi”**, **omaggio a Marta Marzotto** (€ 11.000), **Amici della ricerca di Milano** (€

20.000), **“In ricordo di Dani Copes”**, **Associazione Trentina Fibrosi Cistica – Onlus** (€ 10.000), **Quota parziale Campagna Nazionale FFC 2017** (€ 50.000), **Numero Solidale 2017** (€ 17.471), **Quota parziale Campagna di Natale FFC 2017** (€ 100.000), **“La Camminata del Respiro”** e altri eventi promossi dalla **Delegazione Sondrio Valchiavenna** (€ 30.000), **Quota parziale Campagna di Pasqua FFC 2018** (€ 25.000); **“Project Hope - Rosa Pastena”** (€ 35.000), **Wind Tre in ricordo di Francesca Cascone** (€ 10.000), **Quota parziale “Marafibrositona 2018”**, **Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 63.200), **Quota parziale Campagna Nazionale FFC 2018** (€ 50.000), **Bike Tour FFC 2018** (€ 50.000), **Numero Solidale 2018** (€ 12.370), **“Together for life”** (€ 91.000), **Asta UK-Italy Business Boost 2018** (€ 31.300), **Castelli 24 H Feltre 2018** (€ 8.250), **“Un calcio ai 60”** (€ 11.300), **Amici della ricerca Bassano 2018** (€ 24.000), **Brandart** (€ 10.000), **Bricoman** (€ 15.000), **Quota parziale Campagna di Pasqua FFC 2019** (€ 25.000), **Quota parziale “Marafibrositona 2019”**, **Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 100.000), **“Aziende per Task Force”**, **raccolta promossa da Delegazione FFC di Verona Val d’Alpone** (€ 20.000), **Lega Italiana Fibrosi Cistica di Messina - Fund Raising Dinner Claudio Miceli** (€ 15.000), **Fibrosirun 2019** (€ 21.000). **Guadagnin Srl** (€ 10.000), **Evento “Un respiro sotto le stelle”**, **Gruppo di sostegno FFC di Crevalcore Bologna** (€ 12.000).

*Il residuo non adottato di € 291.209 è stato coperto con fondi patrimoniali di FFC*

#### **FFC#1/2018**

**Nuovi bersagli per il trattamento della FC dall’analisi approfondita del proteoma F508del-CFTR**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)

Costo: € 44.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Genova e Gruppo di Sostegno FFC di Savona Spotorno**

#### **FFC#2/2018**

**Stabilizzazione della F508del-CFTR sulla membrana mediante ganglioside GM1**

Responsabile: **Massimo Aureli** (Dip. Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale, Università di Milano)

Costo: € 78.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Cuneo Alba**

#### **FFC#3/2018**

**Analisi del meccanismo d’azione dei correttori della proteina CFTR**

Responsabile: **Debora Baroni** (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

Costo: € 50.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Valle Scrivia Alessandria** (€ 8.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Genova “Mamme per la Ricerca”** (€ 42.000)

#### **FFC#4/2018**

**Verso l’identificazione di nuovi correttori basati su sistemi eterociclici azotati**

Responsabile: **Paola Barraja** (Università degli Studi di Palermo, Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF, Lab. Sintesi degli Eterocicli)

Costo: € 82.000.

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica in ricordo di Fabiola Menguzzo** (€ 20.000), **Delegazione FFC**



**di Vercelli** (€ 30.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Acqui Terme** (€ 16.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Nichelino** (€ 16.000).

#### **FFC#5/2018**

##### **Correzione di mutazioni stop del gene CFTR mediante modifica (editing) dell'RNA messaggero**

Responsabile: **Aldo Di Leonardo** (Università degli Studi di Palermo, Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF)

Costo: € 21.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Palermo**

#### **FFC#6/2018**

##### **Organoidi intestinali per la valutazione e la correzione farmacologica di anomalie nel trasporto di fluidi e correnti anioniche in pazienti affetti da pancreatite**

Responsabile: **Luca Frulloni** (Università degli Studi di Verona, Dip. Medicina, Unità di Gastroenterologia)

Costo: € 81.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Taranto Massafra** (€ 15.000), **Delegazione FFC Cosenza Sud** (€ 8.000), **Guadagnin SRL** (€ 8.000), **Delegazione FFC della Valpolicella** (€ 50.000)

#### **FFC#7/2018**

##### **Caratterizzazione della rete dei fattori di trascrizione microRNA in fibrosi cistica: dalla "terapia microRNA" alla medicina di precisione (CF-miRNA-THER)**

Responsabile: **Roberto Gambari** (Università degli Studi di Ferrara, Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologia, Sez. Biochimica e Biologia molecolare)

Costo: € 76.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vigevano** (€ 39.000), **Delegazione FFC di Verbania** e V.C.O. (€ 20.000), **Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 17.000)

#### **FFC#8/2018**

##### **Caratterizzazione dettagliata dei meccanismi molecolari di regolazione del CFTR da parte di PI3Ky**

Responsabile: **Emilio Hirsch** (Università degli Studi di Torino, Dip. Biotecnologia molecolare e Scienze per la Salute, Centro di Biotecnologia Molecolare)

Costo: € 98.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Verona** (€ 30.000), **Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Lecco Valsassina** (€ 48.000)

#### **FFC#9/2018**

##### **Studio del potenziale terapeutico di una DNasi polmonare ad azione prolungata per il trattamento della fibrosi cistica**

Responsabile: **Gianfranco Pasut** (Università degli Studi di Padova, Dip. Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche)

Costo: € 40.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Imola e Romagna**

#### **FFC#10/2018**

##### **Capire il meccanismo d'azione dell'inibitore della TG2, cisteamina, sulla fibrosi cistica**

Responsabile: **Mauro Piacentini** (Università Roma Tor Vergata, Dip. Biologia)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Napoli San Giuseppe Vesuviano** (€ 20.000), **Associazione "Gli amici della Ritty" Casnigo** (€ 20.000)

#### **FFC#11/2018**

##### **Riposizionamento del farmaco, studi computazionali, risonanza plasmonica di superficie e saggi biologici con culture cellulari: un approccio multidisciplinare per l'identificazione di nuovi farmaci ad azione correttiva su CFTR**

Responsabile: **Marco Rusnati** (Università degli Studi di Brescia, Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Sez. Oncologia e Immunologia)

Costo: € 39.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino**

#### **FFC#12/2018**

##### **Generazione di colture di cellule staminali delle vie aeree condizionalmente riprogrammate dall'epitelio nasale di pazienti con fibrosi cistica: valutazione della risposta a farmaci modulatori del CFTR e correlazione con il profilo genetico (theratyping) e ripristino della funzione del CFTR mediante approcci di modificazione genica**

Responsabile: **Adriana Eramo** (Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità)

Costo: € 71.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Cecina e Rosignano** (€ 40.000), **Delegazione FFC di Alberobello** (€ 31.000)

#### **FFC#13/2018**

##### **Analisi di organoidi intestinali per la predizione della risposta a potenziatori e correttori di CFTR utilizzati in clinica**

Responsabile: **Claudio Sorio** (Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina)

Costo: € 36.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Tradate Gallarate**

#### **FFC#14/2018**

##### **Studio ex vivo della risposta mediata dagli interferoni tipo I e III ed interazioni virus-batteri nei pazienti con fibrosi cistica: un nuovo approccio per lo sviluppo di strategie terapeutiche alternative**

Responsabile: **Guido Antonelli** (Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, La Sapienza Roma; Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I)

Costo: € 70.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda**

#### **FFC#15/2018**

##### **Effetti non CFTR-dipendenti dei modulatori di CFTR in modelli preclinici di infezione polmonare**

Responsabile: **Cristina Cigana** (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano)

Costo: € 98.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Morbegno** (€ 35.000), **Delegazione FFC di Milano** (€ 63.000)

#### **FFC#16/2018**

##### **Studio preclinico in vivo di un approccio immunoterapico basato su liposomi bioattivi per il controllo dell'infezione causata da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Daniela Maria Cirillo** (Unità patogeni batterici emergenti, Div. di immunologia, trapianti e malattie infettive, Istituto San Raffaele Milano)

Costo: € 80.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa e Siracusa** (€ 40.000), **Delegazione FFC di Catania Mascalucia** (€ 40.000)

#### **FFC#17/2018**

##### **Vecchi farmaci con una nuova attività antivirulenza contro *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Livia Leoni** (Università Roma Tre, Dip. Scienze, Lab. Microbiologie dei microrganismi)

Costo: € 31.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Sassari** con Gruppo di Sostegno FFC di Siniscola Nuoro

**FFC#18/2018**

**Efficacia in vitro e in vivo di un peptidomimetico antimicrobico e antibiofilm contro patogeni polmonari rilevanti nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Eugenio Notomista** (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia)

Costo: € 70.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Imola e Romagna**

**FFC#19/2018**

**Nuove armi contro *Mycobacterium abscessus* e altri micobatteri non tubercolari**

Responsabile: **Maria Rosalia Pasca** (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e biotecnologia Lazzaro Spallanzani, Lab. Microbiologia molecolare)

Costo: € 58.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Ascoli Piceno** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Novara** (€ 12.000), **Delegazione FFC di Brindisi Torre** (€ 26.000).

**FFC#20/2018**

**Nanoparticelle biocompatibili ed inalabili funzionalizzate con peptidi antimicrobici per contrastare la formazione di biofilm e l'antibiotico resistenza: verso una nuova potenziale terapia per le infezioni correlate alla FC**

Responsabile: **Maurizio Sanguinetti** (Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma)

Costo: € 50.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Sassari Castelsardo** e **Gruppo di Sostegno FFC di Siniscola**

**FFC#21/2018**

**Studio su Timosina alfa 1 nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Marina Maria Bellet** (Università degli Studi di Perugia, Dip. Medicina Sperimentale)

Costo: € 40.000.

Adottato totalmente da: **Latteria Montello** (€ 15.000), **Delegazione FFC di San Giuseppe Vesuviano** (€ 13.000), **Con Cecilia amici della ricerca** (€ 12.000).

**FFC#22/2018**

**Efficacia in modelli preclinici di fibrosi cistica di una molecola già nota e riscoperta come inibitore di HMGB1**

Responsabile: **Marco Emilio Bianchi** (Div. Genetica e Biologia Cellulare, Unità dinamica della cromatina, Ospedale San Raffaele, Milano)

Costo: € 65.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Pesaro**

**FFC#23/2018**

**Studio di trattamenti antinfiammatori per la patologia polmonare della fibrosi cistica, in modelli murini di infezione delle vie aeree**

Responsabile: **Maria Cristina Dehecchi** (Dip. Patologia e Diagnostica, Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona)

Costo: € 50.000.

Adottato totalmente da: **Emanuela Cricri e amici della ricerca** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Villa d'Almè - Bergamo** (€ 15.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Magenta** (€ 10.000), **Donazione privata** (€ 15.000)

**FFC#24/2018**

**Uso e sviluppo di derivati indolici, quali attivatori del recettore AhR, per via inalatoria nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Luigina Romani** (Università degli Studi di Perugia, Dip. Medicina Sperimentale)

Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Saviano** (€ 40.000), **Gruppo di sostegno di Martinsicuro - Teramo** (€ 12.000), **Iacomini Anna** (€ 8.000).

**FFC#25/2018**

**Veicolazione polmonare di siRNA nel trattamento dell'infiammazione polmonare in fibrosi cistica: potenziale terapeutico di nanoparticelle ibride a base di lipidi e polimeri**

Responsabile: **Francesca Ungaro** (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Farmacia)

Costo: € 35.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Montebelluna**

**FFC#26/2018**

**Malattia polmonare da Aspergillus nei pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico osservazionale prospettico basato sull'utilizzo di nuovi test diagnostici per valutare il ruolo prognostico sulla malattia polmonare dei pazienti con FC**

Responsabile: **Alessandro Bartoloni** (Unità Infezione e Malattie Tropicali, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze)

Costo: € 75.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Valle Scrivia Alessandria** (€ 8.000), **Delegazione FFC Como Dongo** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Fermo** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Catania Paternò** (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Casarile Milano** (€ 24.000)

**FFC#27/2018**

**La risonanza magnetica multivolume come tecnica di imaging non ionizzante nella sorveglianza dei pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmone**

Responsabile: **Alessandro Palleschi** (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

Costo: € 40.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Como Dongo**

**FFC#28/2018**

**Identificazione di biomarcatori molecolari precoci del rigetto acuto e cronico nei pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto polmonare mediante l'uso delle tecnologie omiche**

Responsabile: **Federico Rea** (Dip. Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Div. Chirurgia toracica, AOU Padova)

Costo: € 35.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Boschi Sant'Anna Minerbe**

**FFC#29/2018**

**Identificazione e validazione dell'analisi di microvescicole circolanti come un nuovo metodo ex vivo per monitorare la fibrosi cistica**

Responsabile: **Mario Romano** (Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Lab. Medicina Molecolare, CeSIMeT Università Chieti-Pescara)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Franciacorta**

**FFC#30/2018**

**Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): studio osservazionale multicentrico per valutare prevalenza, dati clinici, gestione ed outcomes in 6 centri italiani di riferimento regionale**

Responsabile: **Vito Terlizzi** (Centro FC, AOUI Meyer, Firenze)

Costo: € 42.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Siena** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Monterotondo Roma** (€ 9.000), **Delegazione FFC di Olbia** (€ 8.000)

**FFC#1/2019**

**Scoprire nuovi bersagli intracellulari per il trattamento farmacologico di CFTR-F508del**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Istituto Italiano di Tecnologia, Chimica Analitica e Farmacologia in vivo - Genova)

Costo: € 55.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Nichelino** (€ 20.000), **Delegazione di Prato** (€ 8.000), **Delegazione di Rovigo** (€ 19.000), **Amici della Ritty** (€ 8.000)

#### FFC#2/2019

##### **Correlare muco-microbiota-genotipo per definire nuovi modelli animali di fibrosi cistica**

Responsabile: **Alessandra Bragonzi** (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Pavia** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Bergamo Villa D'Almè** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Bovolone** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Brindisi Torre** (€ 20.000), **Gruppo di sostegno FFC di Altamura Bari** (€ 8.000), **"Un fiore per Valeria" Assemini - Cagliari** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Morbegno** (€ 34.000)

#### FFC#3/2019

##### **Sfruttare la tecnologia CRISPR/Cas9 per neutralizzare il difetto CFTR-F508del**

Responsabile: **Anna Cereseto** (Università di Trento, CIBIO-Laboratorio di Virologia Molecolare)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vercelli** (€ 30.000), **Delegazione FFC di Verona Val d'Alpone** (€ 60.000), **Associazione Trentina Fibrosi Cistica in ricordo di Marco Menegus** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Olbia** (€ 10.000).

#### FFC#4/2019

##### **Ripristino della proteostasi difettiva in fibrosi cistica: nuove strategie per il recupero di CFTR-F508del**

Responsabile: **Giorgio Cozza** (Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. Chimica Biologica)

Costo: € 95.000.

Adottato totalmente da: **Lega Italiana Fibrosi Cistica Onlus** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Lucca** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Manciano Grosseto** (€ 12.000), **Delegazione di Cecina** (€ 35.000), **Delegazione di Taranto Massafra** (€ 18.000)

#### FFC#5/2019

##### **Utilizzo di piccole molecole che modulano lo splicing di CFTR come nuovi farmaci amplificatori**

Responsabile: **Stefano Duga** (Università Humanitas, Genetica Medica e Biologia dell'RNA, Rozzano, Milano)

Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Acqui Terme in memoria di Maurizio Zunino ed Emilia Mela** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Boschi Sant'Anna Minerbe** (€ 35.000)

#### FFC#6/2019

##### **Identificazione di deubiquitinasi e ubiquitina-ligasi che influenzano la correzione della proteina CFTR mutata**

Responsabile: **Luis Juan Vicente Galletta** (Istituto Telethon di Genetica e Medicina - TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Alba Cuneo**

#### FFC#7/2019

##### **Il segnale transmembrana di regolazione della proteostasi e della infiammazione come bersaglio farmacologico per la correzione della proteina CFTR difettosa nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Alberto Luini** (Istituto di Biochimica delle Proteine, Dip. Scienze Biomediche CNR, Napoli) Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Palermo**

#### FFC#8/2019

##### **Peptidi antimicrobici da pelle di anfibio per il trattamento della patologia polmonare nella fibrosi cistica: caratterizzazione funzionale *in vitro* e *in vivo***

Responsabile: **Maria Luisa Mangoni** (Università La Sapienza Roma, Dip. di Scienze Biochimiche, Lab. di Peptidi Bioattivi)

Costo: € 105.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Imola e Romagna con Gruppo di sostegno FFC di Faenza**

#### FFC#9/2019

##### **Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani con FC: caratterizzazione della risposta ai modulatori di CFTR e saggio della risposta agli inibitori di RNFS**

Responsabile: **Nicoletta Pedemonte** (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Genova con Gruppo di sostegno FFC di Savona Spotorno** (€ 70.000), **Delegazione FFC di Valle Scrivia Alessandria** (€ 16.000), **Delegazione FFC di Montescaglioso** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Ascoli Piceno** (€ 26.000).

#### FFC#10/2019

##### **Riposizionamento di farmaci, studi computazionali, risonanza plasmonica di superficie e saggi biologici con culture cellulari: un approccio multidisciplinare per l'identificazione di nuovi farmaci ad azione correttiva su CFTR**

Responsabile: **Marco Rusnati** (Dip. Medicina Molecolare e Trasazionale Sez. di Oncologia e Immunologia, Università di Brescia)

Costo: € 36.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa e Siracusa con Delegazione FFC di Catania Mascalcucia**

#### FFC#11/2019

##### **Ruolo di modifiche post-traduzionali nel recupero funzionale di CFTR-F508del**

Responsabile: **Mauro Salvi** (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)

Costo: € 40.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Fabriano Ancona con il Gruppo di sostegno FFC di Umbertide Città di Castello Perugia**

#### FFC#12/2019

##### **Approccio proteomico per l'identificazione di nuovi biomarkers leucocitari correlati al recupero di funzionalità del canale CFTR dopo trattamento *ex vivo* con il potenziatore VX-770**

Responsabile: **Monica Aversa** (Università di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale)

Costo: € 50.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino**

#### FFC#13/2019

##### **Attivazione intrinca monocitaria come test di monitoraggio di farmaci per fibrosi cistica**

Responsabile: **Carlo Laudanna** (Università di Verona, Dipartimento di Medicina, Sez. Patologia Generale)

Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC della Valpolicella**

#### FFC#14/2019

##### **Studio dell'interazione tra epitelio e stroma in un modello 3D di FC su chip per la valutazione di nuove strategie terapeutiche**

Responsabile: **Paolo Netti** (Istituto Italiano di Tecnologia, Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Napoli San Giuseppe Vesuviano** (€ 50.000), **Delegazione FFC di Alberobello** (€ 40.000), **Gruppo di sostegno FFC di Crotona "Vita in te ci credo"** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Roma Monterotondo con Delegazione FFC di Roma Vaticano** (€ 10.000)



**FFC#15/2019****Inibizione farmacologica della resistenza alla colistina nei patogeni Gram-negativi della fibrosi cistica**

Responsabile: **Fiorentina Ascenzioni** (Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma)

Costo: € 65.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Tradate Gallarate**

**FFC#16/2019****Lotta contro le forme persistenti di *Pseudomonas aeruginosa* nell'infezione polmonare FC: miglioramento delle tecniche diagnostiche e delle strategie terapeutiche**

Responsabile: **Francesca Biavasco** (Dip. Scienze Ambientali e della Vita, Università Politecnica delle Marche, Ancona)

Costo: € 35.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Treviso Montebelluna**

**FFC#17/2019****Studio preclinico in vitro e in vivo di un approccio immunoterapeutico basato su liposomi bioattivi per il controllo dell'infezione causata da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Daniela Maria Cirillo** (Fondazione Centro San Raffaele, Divisione di immunologia Unità patogeni batterici emergenti, Milano)

Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Palermo**

**FFC#18/2019****Studio della patogenicità e del ruolo clinico di *Achromobacter xylosoxidans* nell'infezione polmonare in fibrosi cistica**

Responsabile: **Maria M. Lleò** (Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona)

Costo: € 80.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Novara** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Messina** (€ 10.000), **Gruppo di sostegno FFC di Seregno** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Lodi** (€ 8.000), **Gruppo di sostegno FFC di San Giovanni Rotondo** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Foggia** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Olbia** (€ 16.000)

**FFC#19/2019****Il gallio come agente antibatterico in fibrosi cistica: studi su modelli animali per il trasferimento di nuove formulazioni inalabili in clinica**

Responsabile: **Paolo Visca** (Dipartimento di Scienze, Unità Microbiologia, Università Roma Tre)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Franciacorta**

**FFC#20/2019****Studio di trattamenti antinfiammatori per la patologia polmonare FC in modelli murini di infezione delle vie aeree: approfondimenti sull'effetto antinfiammatorio del beta-sitosterolo e sull'attività antinfiammatoria/antinfettiva di L-miglustat**

Responsabile: **Maria Cristina Dehecchi** (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Laboratorio di Patologia Molecolare-Laboratorio Analisi)

Costo: € 65.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Melilli** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Pesaro con Gruppo di sostegno FFC di Rivarolo Canavese e Gruppo di sostegno FFC di Parma Fidenza** (€ 45.000), **Gruppo di sostegno FFC di Tremestieri** (€ 10.000)

**FFC#21/2019****Studio preclinico di una strategia terapeutica combinata basata su liposomi bioattivi e batteriofagi contro le infezio-****ni causate da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maurizio Fraziano** (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda**

**FFC#22/2019****Valutazione multitasking di analoghi della TMA come agenti antinfiammatori per il trattamento della fibrosi cistica**

Responsabile: **Ilaria Lampronti** (Dip. Scienze della vita e biotecnologie, Sez. biochimica e biologia molecolare, Università di Ferrara)

Costo: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna** (€ 45.000), **Delegazione FFC di Ferrara** (€ 15.000)

**FFC#23/2019****Azione potenziale dei batteriofagi come immunomodulatori nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Anna Silvia Pistocchi** (Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)

Costo: € 18.000.

Adottato totalmente da: **Associazioni Un Respiro in più Onlus con La mano tesa onlus**

**FFC#24/2019****Alterazioni precoci della tolleranza al glucosio in fibrosi cistica: effetti dei modulatori di CFTR**

Responsabile: **Alberto Battezzati** (Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea, DeFENS, Università di Milano)

Costo: € 120.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Milano Magenta** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Reggello** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna** (€ 30.000), **Delegazione FFC di Roma Pomezia** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Cerea** (€ 12.000), **Matilde e Paola per Elsa** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Lecce** (€ 13.000).

**FFC#25/2019****Il coinvolgimento attivo nel programma di cura del paziente con fibrosi cistica: uno studio trasversale con le diverse parti interessate**

Responsabile: **Rosaria Casciaro** (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Centro Fibrosi Cistica, Genova)

Costo: € 36.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Genova "Mamme per la ricerca"**

**FFC#26/2019****Standardizzazione di un protocollo di *imaging* con risonanza magnetica (MRI) per lo studio di ventilazione, infiammazione, perfusione e struttura al fine di migliorare il monitoraggio della patologia polmonare FC**

Responsabile: **Giovanni Morana** (Ospedale Ca' Foncello, Dip. Radiologia Diagnostica e Interventistica, Treviso)

Costo: € 75.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa e Siracusa con Delegazione FFC di Catania Mascalucia**

**FFC#27/2019****Disfunzione del ventricolo destro in pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmoni**

Responsabile: **Vittorio Scaravilli** (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Dipartimento Anestesia, Rianimazione ed Emergenza)

Costo: € 85.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Napoli San Giuseppe Vesuviano** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Como Don-**

**FFC#1/2020****Acidi nucleici peptidici come potenziali amplificatori di CFTR per il trattamento della fibrosi cistica**

Responsabile: **Felice Amato** (Centro CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Lab. di Ricerca in fibrosi cistica)

Costo: € 85.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna**

**FFC#2/2020****Strategie terapeutiche basate sui lipidi per ottimizzare l'efficacia dei farmaci innovativi per la cura della fibrosi cistica**

Responsabile: **Massimo Aureli** (Università di Milano, Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale)

Costo: € 87.000

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica dedicato a Carmen Peterlana Cainelli** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Vercelli** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Vigevano** (€ 47.000)

**FFC#3/2020****Piccole strutture eterocicliche come correttori della proteina CFTR mutata in fibrosi cistica**

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF - Lab. di Sintesi degli eterocicli, Università di Palermo)

Costo: € 92.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Tradate Gallarate** (€ 50.000), **Fondazione Bruno Maria Zaini** (€ 42.000)

**FFC#4/2020****Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso una tecnica di marcatura indotta da foto-attivazione**

Responsabile: **Fabio Bertozzi** (Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, IIT - D3- Chimica Farmaceutica)

Costo: € 75.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vicenza**

**FFC#5/2020****Organoidi intestinali per la valutazione e la correzione farmacologica di anomalie nel trasporto di fluidi e correnti anioniche in pazienti affetti da pancreatite**

Responsabile: **Luca Frulloni** (Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina, Div. Gastroenterologia)

Costo: € 43.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa e Siracusa** (€ 21.500), **Delegazione FFC di Catania Mascali** (€ 21.500)

**FFC#6/2020****Valutazione della distribuzione e dell'attività di nuove molecole ad azione *readthrough* nel modello di topo e in altri sistemi di modello FC**

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

Costo: € 90.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Palermo**

**FFC#7/2020****Ruolo di modifiche post-traduzionali nel recupero funzionale di F508del CFTR**

Responsabile: **Mauro Salvi** (Università degli Studi di Padova, Dip. di Scienze Biomediche)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"**

**FFC#8/2020****Generazione di colture di cellule staminali delle vie aeree condizionalmente riprogrammate dall'epitelio nasale di pazienti con fibrosi cistica: valutazione della risposta a****farmaci modulatori del CFTR e correlazione con il profilo genetico (*theratyping*) e ripristino della funzione del CFTR mediante approcci di modificazione genica**

Responsabile: **Adriana Eramo** (Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare)

Costo: € 37.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Lecce** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Napoli San Giuseppe Vesuviano** (€ 10.000), **Gruppo di sostegno FFC di Campiglione Fenile** (€ 12.000)

**FFC#9/2020****Proposte terapeutiche basate sulla risposta al trattamento in laboratorio di mutazioni rare con farmaci modulatori di CFTR**

Responsabile: **Paola Melotti** (Centro Fibrosi Cistica, AOUI Verona)

Costo: € 87.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Pesaro con Delegazione FFC di Rivarolo Canavese e Gruppo di sostegno FFC di Fidenza**

**FFC#10/2020****La regolazione della virulenza e dell'antibiotico resistenza mediata da piccoli RNA come bersaglio per lo sviluppo di terapie non tradizionali contro *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Giovanni Bertoni** (Università degli Studi di Milano, Dip. di Bioscienze)

Costo: € 37.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Firenze** (€ 21.000), **Delegazione FFC di Prato** (€ 16.000)

**FFC#11/2020****L'alterazione dei segnali del *quorum sensing* di *Pseudomonas aeruginosa* nei pazienti con fibrosi cistica quale nuova frontiera di terapia antimicrobica**

Responsabile: **Paola Brun** (Università degli Studi di Padova, Dip. di Medicina Molecolare)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Como Dongo**

**FFC#12/2020****Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da micobatteri non tubercolari nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Lanfranco Fattorini** (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Dip. di Malattie Infettive)

Costo: € 52.000

Adottato totalmente da: **"In ricordo di Franco Miliotti"** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 32.000)

**FFC#13/2020****Studio del potenziale antimicrobico di glicomimetici iminosaccaridici nel trattamento di infezioni polmonari da fibrosi cistica**

Responsabile: **Annalisa Guaragna** (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche)

Costo: € 65.000. **Adottabile**

**FFC#14/2020****Nuove armi contro *Mycobacterium abscessus* e altri micobatteri non tubercolari**

Responsabile: **Maria Rosalia Pasca** (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia Lazzaro Spallanzani)

Costo: € 57.000

Adottato parzialmente da: **Smartform/Tattooform** (€ 15.000), **Guadagnin srl** (€ 8.000). **Adottabile per: € 34.000**

**FFC#15/2020****Utilizzare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mauro Piacentini** (Università di Roma Tor Vergata, Dip. di Biologia)

Costo: € 85.000  
Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Alberobello** (€ 20.000), **Delegazione FFC della Valdadige** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Novara** (€ 8.000). **Adottabile per:** € 47.000

#### **FFC#16/2020**

**Bersaglio terapeutico combinato della sfingosina-1-fosfato-lisasi dell'ospite e del patogeno come strategia antimicrobica nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Barbara Cellini** (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Medicina Sperimentale)

Costo: € 55.000. **Adottabile**

#### **FFC#17/2020**

**Piattaforme di veicolazione orale e polmonare per il riposizionamento di anakinra nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Stefano Giovagnoli** (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Scienze Farmaceutiche)

Costo: € 85.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC della Franciacorta e Valle Camonica**

#### **FFC#18/2020**

**Combattere l'infiammazione cronica polmonare scatenata dalle cellule Th1/17 patogeniche attivate da *P. aeruginosa*: un nuovo approccio di medicina di precisione in fibrosi cistica**

Responsabile: **Moira Paroni** (Università degli Studi di Milano, Dip. di Bioscienze)

Costo: € 85.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Sassari Castelsardo con Gruppo di sostegno FFC di Siniscola Nuoro**

#### **FFC#19/2020**

**Terapie prorisolutive per la fibrosi cistica mediante resovina D1 e nanotecnologie: studi preclinici per la consegna alla clinica di formulazioni innovative**

Responsabile: **Antonio Recchiuti** (Università G. d'Annunzio Chieti-Pescara, Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Crevalcore**

#### **FFC#20/2020**

**L'inibizione selettiva di HDAC6 quale nuova strategia per combattere l'infiammazione e il rimodellamento fibrotico nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Vincenzo Summa** (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Farmacia)

Costo: € 55.000

Adottato da: **Delegazione FFC di Latina** (€ 16.000). **Adottabile per:** € 39.000

#### **FFC#21/2020**

**Uso della risonanza magnetica multivolumetrica per studiare gli effetti della terapia con modulatori di CFTR**

Responsabile: **Andrea Aliverti** (Politecnico di Milano, Dip. di Elettronica, Informazione e Bioingegneria)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Roma**

#### **FFC#22/2020**

**Ruolo delle forme batteriche vitali ma non coltivabili (VBNC) nei pazienti con fibrosi cistica dal punto di vista clinico**

Responsabile: **Natalia Cirilli** (Ospedali Riuniti, Dip. Materno Infantile, Centro FC, Ancona)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Ascoli Piceno** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Fabriano Ancona** (€ 25.000), **Delegazione FFC di Umbertide Città di Castello** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Torino** (€ 10.000)

#### **FFC#23/2020**

**Identificazione di nuovi marcatori biologici per la progressione della malattia polmonare indotta da *Mycobacterium abscessus* in fibrosi cistica**

Responsabile: **Nicola Ivan Lorè** (Università Vita-Salute, Ospedale San Raffaele, Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive)

Costo: € 88.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Milano** (€ 50.000), **Delegazione FFC di Olbia** (€ 38.000)

#### **FFC#24/2020**

**Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): studio osservazionale multicentrico per valutare prevalenza, dati clinici, gestione ed esiti in 6 centri italiani di riferimento regionale**

Responsabile: **Vito Terlizzi** (Ospedale A. Meyer, Firenze, Centro Fibrosi Cistica)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Acqui Terme**





### Consiglio di Amministrazione

**Presidente** Matteo Marzotto

**Presidente emerito** Vittoriano Faganelli

**Vicepresidenti** Paolo Faganelli,  
Michele Romano

**Consiglieri:** Michele Bauli,

Riccardo Boatto, Cesare Braggion,

Sandro Caffi, Francesco Cobello, Michele

Gangemi, Giuseppe Lauria Pinter, Giuseppe

Magazzù, Gianni Mastella, Laura Minicucci,

Patrizia Volpato

### Direzione scientifica

**Direttore** Gianni Mastella

**Vicedirettore** Graziella Borgo

### Comitato di consulenza scientifica

**Presidente** Giorgio Berton

**Consulenti** Paolo Bernardi, Paola Bruni,

Roberto Buzzetti, Carlo Castellani, Oscar Moran,

Gian Maria Rossolini

### Presidenza e Segreteria

**(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

graziella.borgo@fibrosicisticaricerca.it

### Direzione di Gestione (G. Zanferrari)

Tel. 045 8127028

giuseppe.zanferrari@fibrosicisticaricerca.it

### Amministrazione (G. Cadoni, M. Bergamaschi, M. Giacomuzzi)

Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025

gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it

michela.bergamaschi@fibrosicisticaricerca.it

marina.giacomuzzi@fibrosicisticaricerca.it

### Comunicazione

**(V. Merighi, S. Chignola, I. Boarato, G. Bovi)**

Tel. 045 8123599 - 7026

valeria.merighi@fibrosicisticaricerca.it

stefania.chignola@fibrosicisticaricerca.it

isabella.boarato@fibrosicisticaricerca.it

giulia.bovi@fibrosicisticaricerca.it

*Progetti editoriali:* M. Zanolli

marina.zanolli@fibrosicisticaricerca.it

*Ufficio stampa:* P. Adami

Tel. 348 3820355

patrizia@clabcomunicazione.it

### Raccolta Fondi e Rapporti con il Territorio

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

Tel. 045 8123605 - 7032 - 7033 - 7029

fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it

laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it

gjusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it

francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it

*Corporate relations:* PF. Micara

Tel. 045 812 7029

pierfrancesco.micara@fibrosicisticaricerca.it

### fibrosicisticaricerca.it

**Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica**

**fondazioneffc**

**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (FFC)**



**Presidente**

MATTEO MARZOTTO



**Direttore Scientifico**

GIANNI MASTELLA



**Presidente Comitato Scientifico**

GIORGIO BERTON

### Delegazioni della Fondazione

Alessandria - Acqui Terme	366 1952515
Alessandria - Valle Scrivia	347 3095778
Ancona - Fabriano	347 8638704
Ascoli Piceno	320 4792114
Asti - Moncalvo	339 5819218
Avellino	349 3940749
Bari - Alberobello	329 2113764
Belluno	0437 943360
Bergamo - Trescore Balneario	338 4276716
Bergamo - Villa D'almè	335 8369504
Biella	331 9028525
Bologna	348 1565099
Brescia - Franciacorta Valle Camonica	340 6589530
Brindisi - Torre	327 2056244
Cagliari - Villasimius	348 7162291
Catania Mascalucia	333 1909983
Catania - Paternò	348 7237760
Catanzaro - Soverato	347 5283975
Cecina e Rosignano	340 6113886
Como - Dongo	334 3081368
Cosenza Nord	349 0519433
Cosenza Sud	347 9041138
Cuneo - Alba	333 6301943
Fermo	339 4758897
Ferrara	347 4468030
Firenze	333 6485308
Firenze - Reggello	328 7043136
Foggia	320 4848190
Genova	348 1634818
Grosseto - Manciano	333 8221877
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	388 3498587
Lecco Valsassina	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	334 6655844
Oristano - Riola Sardo	042 5133252
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	338 4124077
Parma	0521 386303
Pavia	338 3950152
Pavia - Vigevano	339 2001843
Perugia	371 1464395
Perugia - Umbertide Città di Castello	320 9273469
Pesaro	347 0191092
Pescara	347 0502460
Prato	328 9076797
Ragusa - Vittoria Siracusa	338 6325645
Reggio Calabria	342 5618929
Reggio Emilia	0522 874720
Roma	331 8655610
Roma - Monterotondo	349 6500536
Roma - Pomezia	349 1538838
Roma - Vaticano	328 2442701
Rovigo	349 1252300
Sassari - Castelsardo	338 8437919
Siena	348 5435913
Sondrio - Morbegno	349 6852688
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	349 7246586

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 - Val d'Alpone	328 9688473
Verona - Valdadige	340 6750646
Verona - Valpolicella	339 3316451
Vibo Valentia San Costantino Calabro	388 7767773
Vicenza	333 8877053
Viterbo	339 2107950

### Gruppi di sostegno della Fondazione

Agrigento	329 0165039
Alessandria - Casale Monferrato	392 6657566
Ancona Falconara	347 3329883
Arezzo	380 7784658
Bari - Altamura	334 7295932
Bari - Bitritto	340 1618950
Barletta	0883 519569
Benevento	347 4722532
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bologna - Crevalcore	380 6570161
Bolzano	327 9151521
Bolzano - Val Badia	333 6911430
Brindisi - Latiano	347 6350915
Cagliari - Isili	388 8925391
Campobasso	346 8744118
Codogno e Piacenza	348 1113384
Cosenza - Cassano allo Ionio	346 3553586
Cremona	389 1191703
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Crotone "Vita in te ci credo"	328 6146195
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Foggia - Manfredonia	347 5012570
Foggia - San Giovanni Rotondo	340 8789661
Genova "Mamme per la ricerca"	333 4761744
Gorizia - Grado	328 6523404
Imperia	339 5073139
La Spezia - Sarzana "Natalina"	349 7665757
Macerata - Civitanova Marche	349 3746720
Medio Campidano	349 7829841
Messina - Capo D'Orlando	331 9564678
Messina - Tremestieri	342 7197671
Milano - Casarile	339 2055787
Milano - Lainate	348 3807009
Milano - Magenta	339 4887552
Milano - Seregno	338 4848262
Modena - Sassuolo	333 5862932
Napoli - Saviano	339 3185405
Nuoro - Siniscola	320 7953209
Padova - Urbana	347 0814872
Parma - Fidenza	334 6994359
Pistoia - Montecatini Terme	327 7054157
Ravenna - Faenza	0546 44310
Rovigo - Adria	377 2077527
Salerno - Golfo di Policastro	328 8660690
Sassari - Alghero	347 8650806
Savona - Spotorno	334 3368141
Siracusa - Melilli	333 2005089
Taormina	347 4222790
Teramo - Martinsicuro	388 9400461
Torino - Campiglione - Fenile	349 6250546
Torino - Chivasso	011 9172055
Torino - Ivrea	335 7716637
Torino - Nichelino	333 2923955
Trento - Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica	340 5228888
Venezia - Mirano	340 1668645
Verona "Rita"	347 6064471



Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus  
fibrosicisticaricerca.it

**NON  
SPEZZARE  
LA VITA.  
SOSTIENI  
LA  
RICERCA.**

**ANCHE  
A NATALE.**



**UNA CURA PER TUTTI  
NATALE PER LA  
RICERCA FFC 2020**

**Grazie ai ricercatori come Francesco, possiamo trovare una cura per tutti. Anche per i malati come Davide. Unisciti a noi. Su fibrosicisticaricerca.it cerca i doni natalizi che aiutano la ricerca.**

Davide Valter, 21 anni, malato di fibrosi cistica e Francesco Berti, ricercatore, FFC ringrazia l'Istituto Italiano di Tecnologia.

## Per donare

- Online sul sito: [fibrosicisticaricerca.it](http://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](http://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.