



**Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - ETS**
fibrosicisticaricerca.it

AREA 1

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



Progetto FFC#4/2020

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



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Fabio Bertozzi
(Istituto Italiano di Tecnologia, Chimica
Farmaceutica, Genova)



Ricercatori coinvolti: 4



Qual è la durata dello studio: 2 anni

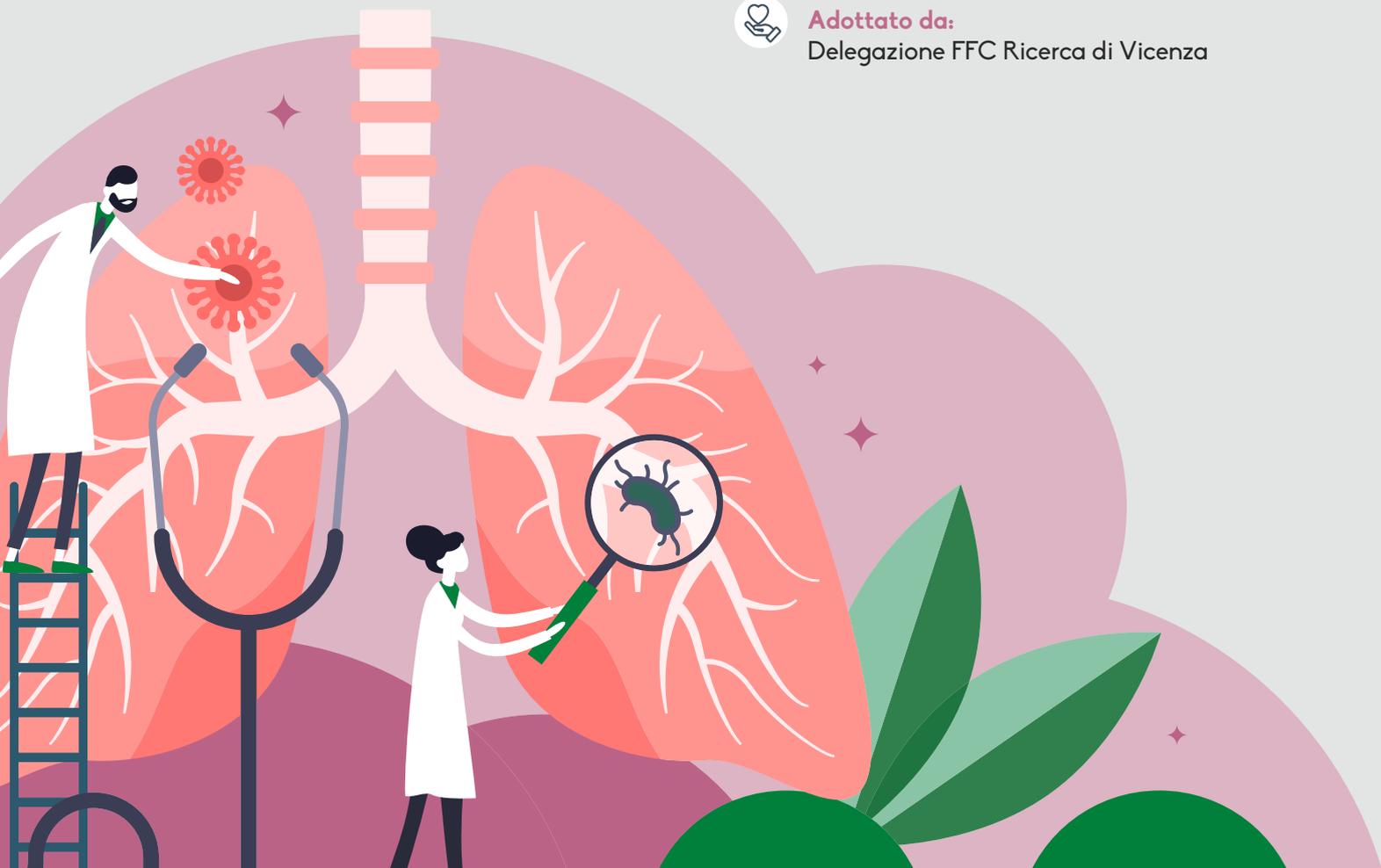


Finanziamento: € 75.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di Vicenza





Perché è importante

Nell'ambito del progetto [Task Force for Cystic Fibrosis](#) di FFC Ricerca, è stato identificato il correttore di CFTR chiamato ARN23765, che ha mostrato un'elevata potenza nel ristabilire la funzione della proteina CFTR mutata in cellule epiteliali bronchiali da pazienti con la mutazione F508del/F508del. Nonostante i dimostrati effetti biologici, il meccanismo d'azione e i possibili bersagli biologici di ARN23765 non sono stati ancora del tutto caratterizzati.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Per studiare i bersagli biologici e il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule viventi, è stato usato un particolare approccio biochimico, noto come *Photo-Affinity Labeling* (PAL). Questa tecnica si basa sulla sintesi di sonde chimiche strutturalmente correlate a ARN23765. Una sonda chimica è una piccola molecola capace di legarsi in modo reversibile a un bersaglio biologico; in questo caso, le sonde sono caratterizzate anche dalla presenza di una porzione fotoreattiva (cioè che reagisce alla luce) e di un gruppo chimico capace di legarsi a un marcatore molecolare (che permette di seguirne il percorso).



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Sono state progettate e sintetizzate alcune sonde foto-attivabili, poi somministrate in colture di cellule esponenti CFTR nativa o mutata (F508del). Le cellule sono state poi esposte alla luce UV per consentire alle sonde di legarsi in maniera stabile alle biomolecole con cui interagivano. Il marcatore legato alla sonda ha consentito di rilevare e/o isolare i complessi sonda-bersaglio, e quindi di identificare i possibili bersagli cellulari.



Che cosa hanno ottenuto

Le sonde foto-attivabili derivate da ARN23765 si legano a CFTR in cellule intatte, indicando che ARN23765 può ragionevolmente agire direttamente su CFTR. Questo risultato è di indubbio interesse poiché rivela per la prima volta l'interazione di un modulatore con CFTR in un ambiente biologico integro. Inoltre, tale metodologia ha permesso di identificare alcune interessanti proteine capaci di interagire con CFTR, che potrebbero rappresentare ulteriori bersagli di ARN23765.



Che cosa succederà ora

Lo studio prosegue grazie al progetto [FFC#2/2022](#) che si propone di chiarire ulteriormente il meccanismo d'azione di ARN23765 su CFTR e le regioni coinvolte nella correzione del canale. Le proteine individuate come potenziali ulteriori bersagli di ARN23765 verranno valutate e caratterizzate.

L'identificazione del meccanismo d'azione di ARN23765 contribuirà ulteriormente a caratterizzare questo correttore e a rafforzare il suo profilo come candidato allo sviluppo preclinico per il trattamento della fibrosi cistica.

Per saperne di più



Obiettivi

Identificare bersagli e meccanismo d'azione del correttore ARN23765, dal progetto *Task Force for Cystic Fibrosis*, anche per lo sviluppo di nuovi correttori di CFTR

Il gruppo di ricerca ha collaborato alla scoperta del correttore di CFTR-F508del ARN23765 nell'ambito del progetto strategico di FFC Ricerca *Task Force for Cystic Fibrosis*. Il gruppo si propone ora di studiare i bersagli specifici e il meccanismo d'azione di ARN23765, lavorando su cellule respiratorie primarie di soggetti con fibrosi cistica (FC), con un nuovo e sofisticato metodo, chiamato PAL (*Photo-Affinity Labeling*). Saranno sintetizzate sonde chimiche strutturalmente simili a ARN23765, caratterizzate da una parte fotoreattiva (attivata da raggi UV e capace di legarsi a molecole vicine alla collocazione del correttore) e da un gruppo a cui legare un marcatore molecolare, che rileverà la molecola, identificata dalla fotoreazione, con cui probabilmente ARN23765 interagisce. I risultati del progetto contribuiranno 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 della FC e alla progettazione di composti con migliori caratteristiche di attività e sicurezza.



Risultati

ARN23765 sembra agire direttamente su CFTR anche in un ambiente biologico integro

Il progetto si propone di identificare i possibili bersagli biologici e il meccanismo d'azione di ARN23765, un correttore di CFTR scoperto dal nostro gruppo di ricerca all'interno del progetto *Task Force for Cystic Fibrosis*, che ha mostrato un'elevata potenza nel ristabilire la funzione della proteina CFTR mutata in cellule epiteliali bronchiali da pazienti con la mutazione F508del/F508del. Nonostante i dimostrati effetti biologici, il meccanismo d'azione di ARN23765 non era stato ancora del tutto caratterizzato. Per studiare i bersagli biologici e il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule viventi, i ricercatori hanno usato un particolare approccio biochimico, noto come *Photo-Affinity Labeling* (PAL). Questa tecnica è basata sulla sintesi di sonde chimiche strutturalmente correlate a ARN23765. Una sonda chimica è una piccola molecola capace di legarsi in modo reversibile a un bersaglio biologico; in questo caso, le sonde sono caratterizzate anche dalla presenza di una porzione fotoreattiva (cioè che reagisce alla luce) e di un gruppo chimico capace di legarsi a un marcatore molecolare (per seguirne il percorso). Sono state così progettate e sintetizzate alcune sonde foto-attivabili che sono state poi somministrate in colture di cellule esprimenti CFTR nativa o mutata (F508del). Le cellule sono state poi esposte alla luce UV per consentire alle sonde di legarsi in maniera stabile alle biomolecole con cui interagivano. Il marcatore legato alla sonda ha consentito di rilevare e/o isolare i complessi sonda-bersaglio, e quindi ha permesso di identificare i possibili bersagli mediante tecniche sperimentali di elettroforesi di proteine su gel e/o spettrometria di massa. I dati ottenuti hanno dimostrato che le sonde foto-attivabili derivate da ARN23765 si legano a CFTR in cellule intatte, indicando che ARN23765 può ragionevolmente agire direttamente su CFTR. Questo risultato è di indubbio interesse poiché rivela per la prima volta l'interazione di un modulatore con CFTR in un ambiente biologico integro. Inoltre, tale metodologia ha permesso di identificare alcune interessanti proteine (attualmente in fase di valutazione) capaci di interagire con CFTR, che potrebbero rappresentare ulteriori bersagli di ARN23765.

Abstract presentati a congressi scientifici



- **Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach**
17th ECFS Basic Science Conference, Albufeira (Portugal), 30 March-02 April 2022
- **Characterization of corrector ARN23765 mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach**
17th ECFS Basic Science Conference, Albufeira (Portugal), 30 March-02 April 2022
- **Towards the characterization of corrector ARN23765 mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach**
XXVII National Meeting in Medicinal Chemistry (Società Chimica Italiana), Bari, 11-14 September 2022

Rendiconto economico



AREA 1

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

Progetto FFC#4/2020

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



Responsabile:

Fabio Bertozzi

(Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova - D3 Chimica Farmaceutica)



Periodo:

01/09/2020-31/08/2022



Grant assegnato:

€ 75.000



Usato per:

- Materiale di consumo
- Spese viaggio/convegni
- Borse di studio

€ 41.863,38
€ 2.808,83
€ 30.000,00

€ 74.672,21



Saldo (usato per altri progetti):

€ 327,79