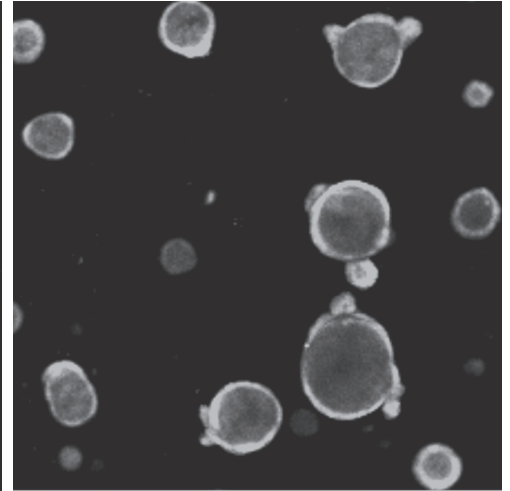
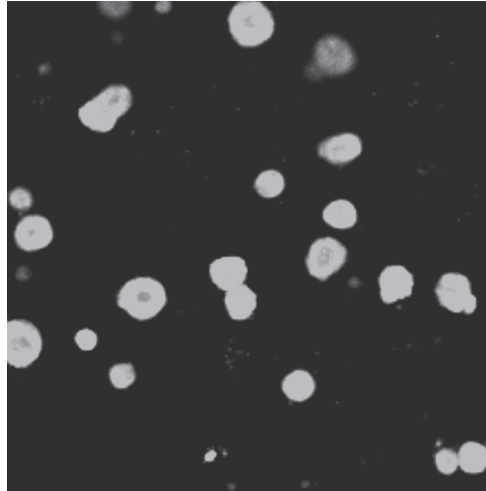
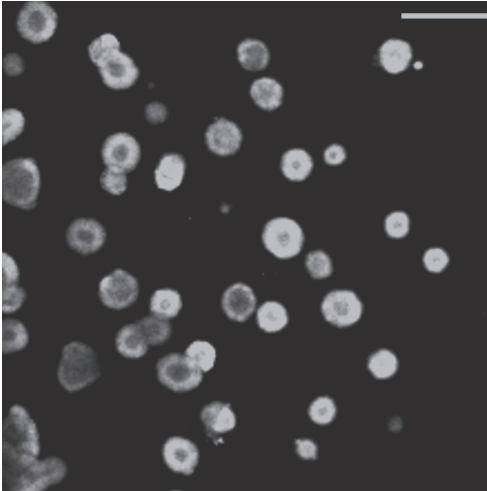




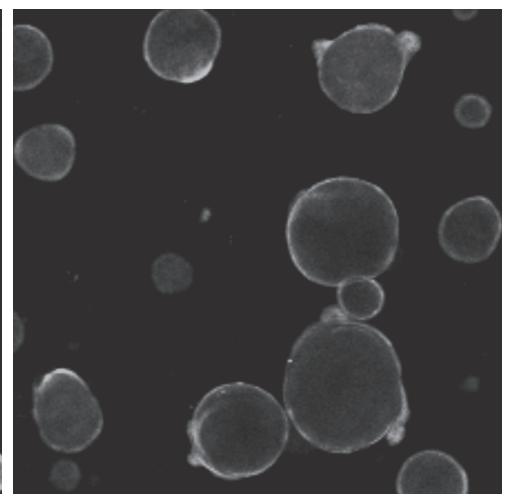
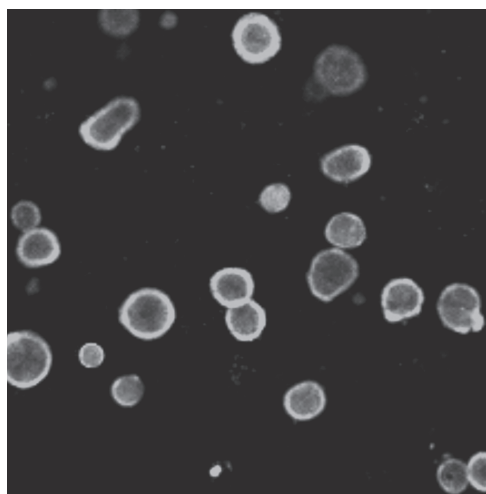
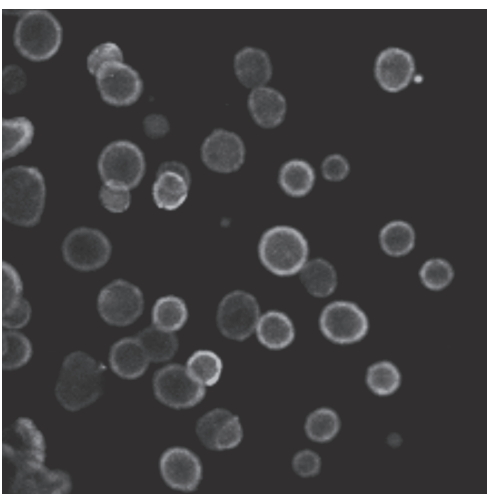
*Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - Onlus  
italian cystic fibrosis research foundation*



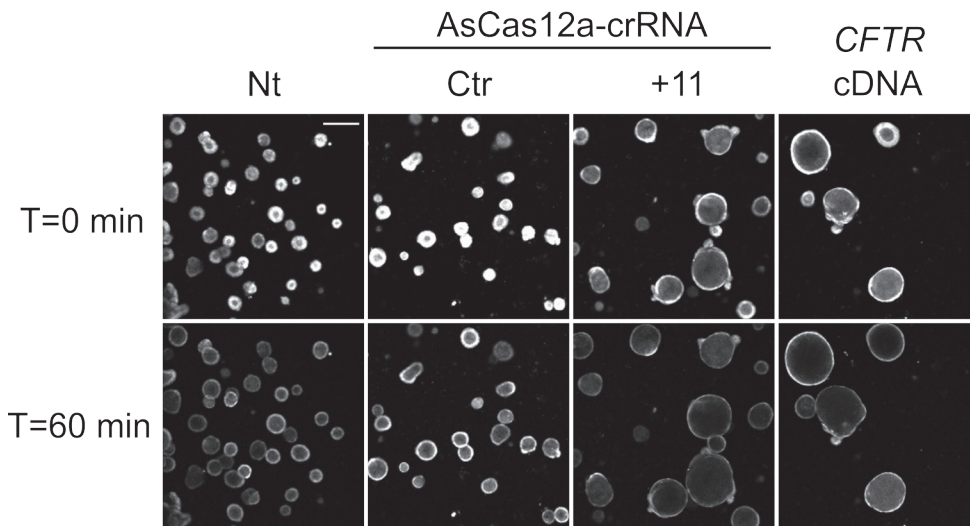
**24-26  
NOVEMBER  
2022**

# **20TH CONVENTION OF INVESTIGATORS IN CYSTIC FIBROSIS**

**XX CONVENTION D'AUTUNNO  
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA**



**VERONA**, Centro Congressi Camera di Commercio, Corso Porta Nuova, 96 · Verona



**3272-26A>G intestinal organoids.** Lumen formation and increased organoid size of intestinal organoids (swelling) depends on the activity of the CFTR anion channel and thus can be used to measure the restoration of CFTR function. 3272-26A>G intestinal organoids were transduced with lentiviral vectors carrying AsCas12a-crRNA control (Ctr) or specific for the 3272-26A>G mutation (+11) or with the CFTR cDNA. After AsCas12a-crRNA+11 treatment patient's organoids showed an increased organoid area at steady-state (T=0 min) compared to the organoids of control and untreated samples (Nt), thus indicating restored channel function following repair of the CFTR3272-26A>G allele. Noteworthy, there was no significant difference in organoid area between treatment with AsCas12a-crRNA+11 or transduction of WT CFTR cDNA, supporting the efficiency of the AsCas12a-crRNA+11 genetic editing in 3272-26A>G phenotypic reversion. In addition CFTR function was also assessed by the well-established forskolin-induced swelling (FIS) assay. The FIS assay (T=60 min) revealed an increase in AsCas12a-edited organoid area similar to the results obtained with lentiviral delivery of WT CFTR cDNA.

**Organoidi intestinali derivati da pazienti con la mutazione 3272-26A>G.** Negli organoidi intestinali, la formazione del lumen e l'aumento delle loro dimensioni dipendono dall'attività del canale CFTR e quindi possono essere usati per misurare il ripristino della sua funzione. L'immagine T=0 min rappresenta organoidi intestinali derivati da pazienti con la mutazione 3272-26A>G. Quando CFTR è mutato, gli organoidi rimangono piccoli (immagine Nt e Ctr). Trattando gli organoidi con il sistema di editing genetico CRISPR-Cas12a per correggere la mutazione 3272-26A>G, si può notare che gli organoidi sono più grandi (immagine +11). Ciò significa che CFTR è stato corretto grazie al sistema di editing e il canale è attivo. Possiamo anche notare come gli organoidi corretti con CRISPR-Cas12a siano molto simili a quelli che esprimono CFTR senza mutazioni (CFTR cDNA). Gli stessi organoidi sono anche stati trattati con forskolina (T=60 min), una molecola che attiva il canale CFTR: dove CFTR è mutato, gli organoidi rimangono di piccole dimensioni, mentre dove è corretto diventano ancora più grandi, confermando la correzione della mutazione.

Maule G, Casini A, Montagna C, Ramalho AS, De Boeck K, Debyser Z, Carlon MS, Petris G, Cereseto A. Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. Nat Communication, 2019, Aug 7;10(1):3556

In collaboration with / In collaborazione con



AZIENDA OSPEDALIERA  
UNIVERSITARIA INTEGRATA  
VERONA

With the support of / Con il sostegno di



CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO  
AGRICOLTURA VERONA

Editorial staff / Redazione

Luisa Alessio, Federica Lavarini, Ermanno Rizzi

Graphics and layout / Grafica e impaginazione

Porpora ADV - Michela Chesini  
Chiara Maccaferri

Cover image / Foto di copertina

Courtesy of Giulia Maule

Print / Stampa

November 2022, Fides Grafica Verona



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

# 20<sup>th</sup> Convention of FFC Ricerca investigators in cystic fibrosis

XX Convention d'autunno dei ricercatori  
in fibrosi cistica

Verona

24 - 26 November 2022

Camera di Commercio, Corso Porta Nuova 96

*Work in progress of projects funded by FFC Ricerca (2019-2022)*

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti  
finanziati da FFC Ricerca (2019-2022)

# General Index

Program at a glance .....	3
Full Index of Abstracts.....	4
Abstracts of oral presentations .....	8

## **Appendices**

1. Archive of Publications from FFC Ricerca Projects (2012–2022).....	68
2. Institutes and Laboratories involved in FFC Ricerca Projects.....	87
3. International Reviewers of FFC Ricerca Projects .....	91
4. FFC Ricerca Projects (2020 – 2022) adopted by Supporters .....	94

# Program at a glance

## Thursday, 24 November 2022

09:30 - 10:30	Registration and poster display
10:30 - 11:15	Introduction and greetings
11:15 - 12:05	<b>SESSION 1 - GENE EDITING IN CYSTIC FIBROSIS</b>
12:05 - 13:15	<b>SESSION 2 - NEW PERSPECTIVES IN CFTR MODULATORS</b>
13:15 - 14:50	Lunch & Poster session
14:50 - 15:40	<b>SESSION 3 - CFTR MODULATOR THERAPIES FOR ORPHAN MUTATIONS</b>
15:40 - 17:00	<b>SESSION 4 - CLINICAL STUDIES</b>
17:00 - 17:30	Coffee Break
17:30 - 18:45	<b>SESSION 5 - BIOMARKERS AND SCREENING IN CYSTIC FIBROSIS</b>

## Friday, 25 November 2022

08:30 - 09:40	<b>SESSION 6 - ALTERNATIVE PATHWAYS TO CORRECT CFTR</b>
09:40 - 11:05	<b>SESSION 7 - ANTI-INFLAMMATORY APPROACHES IN CYSTIC FIBROSIS</b>
11:10 - 11:40	Coffee Break
11:40 - 12:55	<b>SESSION 8 - STRATEGIES TO CONTRAST ANTIMICROBIAL RESISTANCE</b>
13:05 - 14:35	Lunch & Poster session
14:35 - 15:35	<b>SESSION 9 - NEW DRUGS AGAINST <i>MYCOBACTERIUM ABSCESSUS</i></b>
15:50 - 16:25	Coffee Break
16:25 - 16:55	<b>KEYNOTE SPEECH - Protecting inventions: a brief journey into the world of patents</b>
16:55 - 17:45	<b>SESSION 10 - THERATYPING AND PRIMARY CELLS MODELS</b>
20:00	Social Dinner

## Saturday, 26 November 2022

09:00 - 10:20	<b>SESSION 11 - ANTI-INFECTIVE STRATEGIES IN CYSTIC FIBROSIS</b>
10:30 - 12:10	<b>SESSION 12 - TREATMENT OF PULMONARY INFECTION</b>
12:10 - 12:40	Coffee Break
12:40 - 14:15	<b>SESSION 13 - PHARMACEUTICAL MODULATORS INTERACTION</b>
14:15 - 14:25	Closing remarks

# Full Index of Abstracts

## SESSION 1 - GENE EDITING IN CYSTIC FIBROSIS

*Chair: Francesco Blasi, Giulio Cabrini*

1. **Giulia Maule** (GMSG #1/2022) ..... 8  
Development of CRISPR-Cas delivery system for genome editing applications in cystic fibrosis
2. **Anna Cereseto, Daniele Arosio** (FFC#2/2021) ..... 9  
Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del CFTR defect
3. **Aldo Di Leonardo** (FFC#5/2021) ..... 10  
*In vitro* evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript

## SESSION 2 - NEW PERSPECTIVES IN CFTR MODULATORS

*Chair: Francesco Blasi, Tiziano Bandiera*

4. **Paola Barraja, Arianna Venturini** (FFC#3/2020) ..... 11  
Small nitrogen heterocycles as correctors of the mutant CFTR protein in cystic fibrosis
5. **Paola Barraja, J.V. Galletta** (Molecole 3.0) ..... 12  
New generation of pharmacological modulators to rescue mutant CFTR protein
6. **Fabio Bertozzi** (FFC#2/2022, FFC#4/2020) ..... 13  
Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach

## SESSION 3 - CFTR MODULATOR THERAPIES FOR ORPHAN MUTATIONS

*Chair: Marco Cipolli, Oscar Moran*

7. **Emilio Hirsch** (FFC#3/2022) ..... 14  
Rescuing rare CFTR mutants with a PI3K $\gamma$  mimetic peptide
8. **Adriana Chilin, Gergely Lukacs** (FFC#3/2021) ..... 15  
Toward the development of tailored therapies for insensitive CF gating mutations
9. **Laura Lentini, Ivana Pibiri** (FFC#6/2020) ..... 16  
Validation of the biodistribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems

## SESSION 4 - CLINICAL STUDIES

*Chair: Marco Cipolli, Roberto Buzzetti*

10. **Alberto Battezzati, Carla Colombo, Maria Cristina Lucanto, Vincenzina Lucidi, Andrea Mari** (FFC#24/2019) ..... 17  
Early derangements of glucose tolerance in cystic fibrosis: effect of CFTR modulators
11. **Cesare Braggion, Sonia Volpi** (Effetto Kaftrio) ..... 18  
Safety and effectiveness of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Kaftrio) in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease: an Italian observational, multicenter study
12. **Riccardo Percudani, Gianfranco Pasut, Rosaria Casciaro** (FFC#14/2022) ..... 19  
Actin-resistant acidic DNase for the treatment of CF pulmonary symptoms
13. **Vittorio Scaravilli** (FFC#27/2019) ..... 20  
Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation
14. **Gianluca Serafini, Riccardo Ciprandi** (FFC#21/2021) ..... 22  
Mental health in cystic fibrosis patients: the prognostic role of temperament, personality and attachment styles

## SESSION 5 - BIOMARKERS AND SCREENING IN CYSTIC FIBROSIS

Chair: *Graziella Borgo, Nicoletta Pedemonte*

15. **Carlo Laudanna** (FFC#7/2021) ..... 23  
Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test: validation phase
16. **Giovanni Morana** (FFC#26/2019)..... 24  
Standardized Ventilation Inflammation Perfusion and Structure (VIPS)  
MRI platform for monitoring cystic fibrosis lung disease
17. **Vito Terlizzi, Laura Elisabetta Claut, Antonella Tosco** (FFC#24/2020) ..... 25  
Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an Italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management, and outcome
18. **Carlo Castellani** (1 in 30 and You Don't Know It) ..... 26  
A platform for a better comprehension of the cystic fibrosis carrier test

## SESSION 6 - ALTERNATIVE PATHWAYS TO CORRECT CFTR

Chair: *Paola Melotti, Paolo Bernardi*

19. **Giorgio Cozza, Federica Rossin** (FFC#4/2021) ..... 28  
Oxidative stress and autophagy in cystic fibrosis: novel biochemical characterizations and drug discovery approaches
20. **Luis J. V. Galletta** (FFC#9/2022) ..... 29  
Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis
21. **Paolo Scudieri, Fabiana Ciciriello** (FFC#11/2021)..... 30  
Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect
22. **Mauro Piacentini, Valeria Raia** (FFC#8/2022, FFC#15/2020) ..... 31  
Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis

## SESSION 7 - ANTI-INFLAMMATORY APPROACHES IN CYSTIC FIBROSIS

Chair: *Laura Minicucci, Giulio Cabrini*

23. **Domenico Mattoscio** (FFC#11/2022) ..... 32  
Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis
24. **Antonio Recchiuti, Alessandra Aloisi** (FFC#20/2021)..... 33  
Nanotechnology-based Resolvin D1 as proresolving therapy in cystic fibrosis: preclinical studies for the delivery of innovative formulations to the clinic
25. **Ilaria Lampronti** (FFC#10/2022)..... 34  
Towards the development of GY-971a as anti-inflammatory drug in cystic fibrosis
26. **Vincenzo Summa, Lucia Altucci** (FFC#20/2020) ..... 35  
Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis
27. **Stefano Giovagnoli** (FFC#17/2020) ..... 36  
Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis

## SESSION 8 - STRATEGIES TO CONTRAST ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Chair: *Giovanni Taccetti, Maria Luisa Mangoni*

28. **Giovanni Bertoni** (FFC#14/2021) ..... 37  
Targeting small RNA-mediated regulation of virulence and antibiotic resistance to develop non-traditional therapeutic options against *Pseudomonas aeruginosa*
29. **Laurent Robert Chiarelli, Fiorella Meneghetti, Sonia Covaceuszach** (FFC#5/2022) ..... 38  
Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *Mycobacterium abscessus* iron acquisition pathways

30. <b>Federica Briani</b> (FFC#15/2021).....	39
Tackling phage resistance to increase the robustness of phage therapy for curing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections in patients with cystic fibrosis	
31. <b>Fiorentina Ascenzioni, Bruno Botta, Mattia Mori, Stefano Salmaso</b> (FFC#12/2021).....	40
Pharmacological inhibition of colistin resistance in Gram-negative cystic fibrosis pathogens	
32. <b>Anna Silvia Pistocchi</b> (FFC#12/2022).....	41
Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application	

## SESSION 9 - NEW DRUGS AGAINST MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

Chair: Michele Gangemi, Emilio Clementi

33. <b>Federico Gianmoni, Emanuele Borroni, Lanfranco Fattorini</b> (FFC#6/2022, FFC#17/2021).....	42
New drug combinations against non-tuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis	
34. <b>Maria Rosalia Pasca, Vadim Makarov, Santiago Ramón-García, Enrico Tortoli</b> (FFC#18/2021).....	43
New weapons against <i>Mycobacterium abscessus</i> and other nontuberculous mycobacteria	
35. <b>Maurizio Fraziano, Daniela Maria Cirillo</b> (FFC#13/2022).....	44
Fighting <i>Mycobacterium abscessus</i> infections by a novel combination therapy	
36. <b>Nicola Ivan Lorè, Lisa Cariani</b> (FFC#7/2022, FFC#23/2020).....	45
Genomic and phenotypic characterization of <i>Mycobacterium abscessus</i> and detection of host biomarkers to define mycobacterial infection in cystic fibrosis	

## SESSION 10 - THERATYPING AND PRIMARY CELLS MODELS

Chair: Carlo Castellani, Luis J. V. Galiotta

37. <b>Onofrio Laselva, Enza Montemitro, Graziano Pesole</b> (FFC#6/2021).....	46
Enhancing the prediction of clinical responses to CFTR modulators by <i>in vitro</i> assays using patient-derived tissues under conditions mimicking native status of CF airways	
38. <b>Paola Melotti, Marcel Bijvelds, Giuseppe Castaldo</b> (FFC#9/2020).....	47
Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators	
39. <b>Marco Lucarelli, Adriana Eramo</b> (FFC#8/2021).....	48
Therotyping of cystic fibrosis	
40. <b>Nicoletta Pedemonte, Renata Bocciardi</b> (FFC#10/2021).....	49
Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs	

## SESSION 11 - ANTI-INFECTIVE STRATEGIES IN CYSTIC FIBROSIS

Chair: Cesare Braggion, Natalia Cirilli

41. <b>Carla Vignaroli, Barbara Citterio, Gianmarco Mangiaterra</b> (FFC#16/2019).....	51
Fighting <i>Pseudomonas aeruginosa</i> persists in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies	
42. <b>Cristina Cigana, Daniela Girelli, Ersilia Fiscarelli</b> (FFC#16/2021).....	52
Linking elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease	
43. <b>Teresa Zelante</b> (FFC#15/2022).....	53
Study on anti-fungal immunoglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis	
44. <b>Barbara Cellini</b> (FFC#19/2021).....	54
Exploring the dual targeting of host and microbial sphingosine-1-phosphate lyase as antimicrobial strategy in cystic fibrosis	
45. <b>Alessandra Bragonzi, Giacomo Rossi</b> (FFC#2/2019).....	55
Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis models	



## SESSION 12 - TREATMENT OF PULMONARY INFECTION

Chair: Cesare Braggion, Alessandra Bragonzi

46. **Natalia Cirilli, Luca Tiano, Rosaria Gesuita** (FFC#22/2020)..... 56  
Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting:  
a translational research
47. **Moira Paroni, Helle Krogh Johansen** (FFC#18/2020)..... 57  
Counteracting inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*-activated  
lung-infiltrating Th1/17 cells: a novel approach for precision medicine in CF
48. **Paolo Visca, Raffaella Sorrentino** (FFC#19/2019)..... 59  
Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery  
of inhalable formulations to the clinic
49. **Giovanna Batoni, Arianna Pompilio** (FFC#13/2021)..... 60  
Probiotics: an emerging strategy to fight bacterial pulmonary infections  
in cystic fibrosis
50. **Annalisa Guaragna, Eliana De Gregorio** (FFC#13/2020) ..... 61  
Can old and new sweet glycomimetics act as antibacterial and antibiofilm agents  
in the treatment of CF lung disease infections?

## SESSION 13 - PHARMACEUTICAL MODULATORS INTERACTION

Chair: Graziella Borgo, Oscar Moran

51. **Andrea Armirotti, Elvira Sondo** (FFC#1/2021)..... 62  
Multiomics exploration of the CF primary bronchial epithelium lipidome and its role  
on CFTR rescue
52. **Massimo Aureli, Anna Tamanini** (FFC#1/2022, FFC#2/2020) ..... 63  
A lipid-based therapeutic approach to rescue F508del-CFTR and CFTR  
with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis
53. **Enrico Millo, Elena Cichero, Santina Bruzzone** (FFC#9/2021) ..... 64  
Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors  
combined with F508del CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis
54. **Felice Amato** (FFC#1/2020) ..... 65  
Peptide nucleic acids as a promising CFTR potentiator for the treatment of cystic fibrosis
55. **Maria Luisa Mangoni, Arianna Venturini, Mattia Mori** (FFC#4/2022) ..... 66  
Esculentin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial  
and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease

# Abstracts of oral presentations

## SESSION 1

## Gene editing in cystic fibrosis

Development of CRISPR-Cas delivery system for genome editing applications in cystic fibrosis

Sviluppo di sistemi di delivery di CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica



Giulia Maule (3rd from the left) and the CIBIO research group at University of Trento

1

### Giulia Maule

Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Italy

### Background and rationale

The discovery of new systems for genome editing has renewed the enthusiasm for the development of new gene therapy approaches for the treatment of genetic diseases, including cystic fibrosis (CF). Many studies have shown that CRISPR-Cas technology can efficiently correct some of the CFTR mutations that cause the disease. These strategies have proved to be very effective and precise in cell models derived from CF patients, however the main obstacle remains the *in vivo* delivery of CRISPR-Cas technologies.

### Hypothesis and objectives

The main target of therapeutic strategies is the lungs, being the leading cause of morbidity and mortality in CF patients. In this project we aim to develop an efficient delivery system for genome editing tools for the airway epithelia. Unlike “conventional” gene therapy approaches, genome editing requires a transient expression of CRISPR nucleases, which must be active only for the time necessary to make the correction into the target DNA. For this reason, delivery systems such as virus-like particles (VLPs), can be used for the transient delivery of CRISPR-Cas, combining the transduction efficiency of viral vectors with the transient expression of the cargo in the target cells.

### Essential methods

VEsiCas nanoparticles have proven to be efficient for the delivery of CRISPR-Cas9 nuclease. Therefore, we propose to modify the tropism of VEsiCas to specifically target the pulmonary epithelium. Moreover, based on approaches already tested and validated in relevant models for CF, new nucleases, such as Cas12a, and new CRISPR technologies, like base and prime editors, will be inserted into the nanoparticles. These new systems based on VEsiCas will be validated in polarized primary airway epithelial cells and subsequently tested *in vivo* in murine animal models.

### Conclusions

With this project we want to develop a new delivery system that will lead to an advancement in the treatment of patients with CF, since the delivery in the lung tissue is still one of the main obstacles in the search for a cure. The developed VEsiCas system could also be used for other lung diseases or be further adapted to specifically target other tissues, expanding its applications for genetic diseases treatment.

### Razionale dello studio

La scoperta e lo sviluppo di nuovi sistemi per l'*editing* genomico ha riaperto l'entusiasmo per l'elaborazione di nuove terapie per le malattie genetiche, offrendo la possibilità di ottenere una cura definitiva. Anche la ricerca per la cura della fibrosi cistica (FC) si è focalizzata sulla messa a punto di strategie di *editing* genomico. Molti studi hanno dimostrato che la tecnologia CRISPR-Cas è in grado di correggere alcune delle mutazioni che causano la FC in modo efficiente e preciso. Queste strategie si sono rivelate molto efficaci in modelli cellulari derivati da pazienti con FC, tuttavia l'ostacolo principale rimane il *delivery in vivo* di CRISPR-Cas. Il principale bersaglio di queste strategie sono i polmoni, essendo l'organo principalmente colpito nei pazienti con FC.

### Ipotesi e obiettivi

In questo progetto ci proponiamo di sviluppare un sistema efficiente di *delivery* per strumenti di *editing* genomico per le vie aeree. A differenza della terapia genica “convenzionale”, l'*editing* genomico richiede un'espressione transitoria delle nucleasi CRISPR usate per la correzione, che devono essere attive solo per il tempo necessario per apportare la modifica al DNA bersaglio. Per questo motivo, sistemi di *delivery* come VEsiCas, nanoparticelle derivate da virus, possono essere usate per il *delivery* transiente di CRISPR-Cas, unendo l'efficienza di *delivery* dei vettori virali con l'espressione del cargo nelle cellule target per un tempo limitato. Ci proponiamo quindi di modificare il tropismo di VEsiCas per targettare in modo specifico l'epitelio polmonare.

### Metodi

Basandosi su approcci già testati e validati in modelli rilevanti per la FC, verranno inserite all'interno delle nanoparticelle nuove nucleasi, come Cas12a, e nuove tecnologie CRISPR come *base* e *prime editors*. Questi nuovi sistemi basati su VEsiCas verranno validati in cellule polmonari primarie polarizzate e successivamente testati *in vivo* in modelli animali di topo.

### Conclusioni

Con questo progetto ci proponiamo di sviluppare un nuovo sistema di *delivery* che possa portare a un avanzamento nel trattamento dei pazienti affetti da FC, essendo tuttora il *delivery* nel tessuto polmonare uno dei principali ostacoli nella ricerca di una cura. Il sistema VEsiCas sviluppato inoltre potrebbe essere usato per altre malattie polmonari o essere ulteriormente adattato per targettare in maniera specifica altri tessuti, ampliando il suo uso per la cura delle malattie genetiche.

## Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del-CFTR defect

Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR



Anna Cereseto (1st from the left), Daniele Arosio (1st from the right) and the CIBIO research group at Trento University

2

**Davide Aiello<sup>1</sup>, Simone Amistadi<sup>2</sup>, Irene Carrozzo<sup>1</sup>, Giulia Maule<sup>1</sup>, Daniele Arosio<sup>1,2</sup>, Anna Cereseto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biophysics, National Research Council of Italy, Trento, Italy - <sup>2</sup> Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Italy (**FFC#2/2021, ongoing**)

### Background and rationale

*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 F508del 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 F508del defect.*

### Hypothesis and objectives

*Secondary mutations in the CFTR gene can be exploited to mitigate the F508del defect. Structural studies revealed that these mutations promote F508del-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 F508del 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 F508del deletion.*

### Essential methods

*We have used the recent CRISPR technology, base-editor, to introduce secondary mutations reported to neutralize the F508del 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 F508del reversal.*

### Preliminary results

*Selected mutations that were reported to counteract the folding defect of F508del have been validated. We have also identified the best combinations of neutralizing mutations and obtained initial results on CFTR localization to evaluate the reversion of F508del when modified with the identified neutralizing mutations. Beyond reversion through mutagenesis we obtained initial results on base-editing strategies to introduce the neutralizing mutations through advanced CRISPR-Cas approaches in the absence of DNA double strand breaks induced by Cas nuclease.*

### Conclusions

*Preliminary results showed that specific neutralizing mutations are optimal candidate to restore CFTR function altered by F508del mutation. We found additional neutralizing mutations compatible with the base-editing technology. We obtained initial results showing the efficacy of novel base-editors to introduce the neutralizing mutations. These strategies will lead to repair CFTR defects through novel efficient genome editing approach which can be potentially extended to other types of mutations in cystic fibrosis.*

### Razionale 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, l'enzima 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'amminoacido fenilalanina nella posizione 508 (F508del) 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 con F508del, 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 F508del possono essere in parte corretti da ulteriori mutazioni puntiformi nel gene CFTR, dette perciò neutralizzanti.

### Metodi

Abbiamo usato nuovi sistemi basati su CRISPR (CRISPR-base editor) per modificare in modo mirato esclusivamente un singolo nucleotide. I metodi CRISPR-base editor e mutagenesi mediata da PCR sono stati usati per introdurre le mutazioni neutralizzanti compatibili con le tecniche di editing genomico tramite base editing.

### Risultati preliminari

Abbiamo avviato ricerche finalizzate all'identificazione di nuove mutazioni neutralizzanti compatibili con il riparo della mutazione F508del tramite la tecnologia dell'editing genomico. 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. Nel corso del progetto abbiamo identificato e selezionato nuove mutazioni secondarie in grado di correggere il trasporto di CFTR in membrana e ripristinarne la funzione. Abbiamo anche ottenuto i primi risultati che dimostrano l'efficacia di nuovi strumenti di editing genomico basati su CRISPR-Cas, denominati base editor, in grado di apportare le modifiche volute nel CFTR con mutazione F508del. Sono in corso esperimenti di validazione della strategia per il ripristino della funzione di CFTR mutata.

## 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 F508del, che è difficile da riparare con i metodi di *editing* genomico oggi a disposizione. La nostra strategia prevede di aggirare i limiti dell'*editing* genomico sfruttando mutazioni secondarie neutralizzanti per mitigare il difetto principale. Abbiamo identificato nuove mutazioni secondarie neutralizzanti che sono in via di validazione usando strategie di *editing* genomico di seconda generazione definite *base editors*. La messa a punto di queste strategie innovative di *editing* genomico rappresenta anche un passo avanti per il loro uso per la neutralizzazione di altre mutazioni oltre alla F508del.

*In vitro* evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript

Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica (*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina CFTR con mutazioni stop



Aldo Di Leonardo (in the middle) and collaborators

3

**Roberta Flavia Chiavetta, Simona Titoli, Viviana Barra, Patrizia Cancemi, Raffaella Melfi, Aldo Di Leonardo**

Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, Department of Sciences and Chemical Biology and Pharmaceutical Technology (STEBICEF), University of Palermo, Italy  
(FFC#5/2021, ongoing)

## Background and rationale

Approximately 10% of cystic fibrosis (CF) patients worldwide have been reported to be compound heterozygous or homozygous for nonsense or stop mutations. Stop mutations in the CFTR gene introduce a Premature Termination Codon (PTC) that causes the translation of the CFTR protein to stop prematurely leading to a truncated, non-functional protein. We believe that novel therapeutic tools to treat stop mutations are worth to be investigated to increase the range of therapeutic opportunities for these CF patients.

## Hypothesis and objectives

We evaluated the possibility of rescuing the CFTR nonsense mutation (UGA) by sequence-specific RNA editing in CFF-16HBEge CFTR W1282X and CFTR G542X human cells.

## Essential methods

To recode the UGA PTC in a sense codon in the CFTR mutant mRNA, we used two different base editor tools that use ADAR enzymes (adenosine deaminase acting on RNA) to edit Adenosine to Inosine (A-to-I) within the mRNA:

- REPAIRv2 (RNA Editing for Programmable A to I Replacement, version 2) and the more compact version termed mini xABE (A to I Base Editor);
- RESTORE (Recruiting Endogenous ADARs to Specific Transcripts for Oligonucleotide-mediated RNA Editing).

## Preliminary results

Our immunofluorescence results show the recovery of the CFTR protein in the CFF-16HBEge CFTR W1282X cells with all the approaches. The rescue of CFTR full transcript was also confirmed by RT-qPCR by RESTORE. Moreover, the successful editing was confirmed by SANGER sequencing the region surrounding the edited site in the cDNA of the cells transfected with the minixABE plasmid. Delivery of RNA base-editing constructs could be challenging for therapeutic use. Thus, we have also tested the recombinant Adeno-Associated Viruses (rAAVs) as a strategy to enhance the delivery in human bronchial cell lines.

## Conclusions

Altogether our results suggest that UGA nonsense mutations in the CFTR transcript, might be efficiently corrected by RNA editing. Our findings pave the way for new and promising scenarios for the treatment of premature stop codon in the CFTR transcript by correcting mutated RNA that is safer than acting on mutated DNA.

## Razionale dello studio

Circa il 10% dei pazienti con fibrosi cistica nel mondo è eterozigote o omozigote per mutazioni non-senso o mutazioni stop. Le mutazioni stop nel gene CFTR introducono un codone di stop prematuro (PTC) nell'mRNA, causando l'interruzione precoce della traduzione della proteina CFTR che sarà quindi tronca e non funzionale. Sebbene alcune molecole usate per superare le mutazioni stop siano promettenti, è necessario investigare nuovi approcci per il recupero funzionale della proteina CFTR.

## Ipotesi e obiettivi

Abbiamo valutato la possibilità di correggere la mutazione non-senso CFTR (UGA) nell'RNA messaggero del gene CFTR, usando nuove tecniche di modifica (*editing*) sito-specifica, nelle linee cellulari bronchiali umane CFF-16HBEge CFTR W1282X e G542X.

## Metodi

Abbiamo usato differenti approcci di *editing* dell'RNA sito-specifici (REPAIRv2, minixABE e RESTORE) che sfruttano gli enzimi ADAR (adenosin-deaminasi che agiscono sull'RNA) per convertire l'adenosina in inosina (A>I) nell'RNA messaggero e ripristinare la corretta tripletta codificante. Tali sistemi vengono veicolati in cellule umane *in vitro* mediante micelle lipidiche. Una difficoltà che si può incontrare con questi sistemi di terapia genica è la loro veicolazione al sito bersaglio a fini terapeutici. Pertanto, abbiamo usato anche Virus Adeno Associati (AAVs) ricombinanti per valutare se il trasporto del sistema di *editing* può essere implementato.

## Risultati preliminari

Tramite RT-qPCR abbiamo confermato l'incremento dell'RNA messaggero del gene CFTR con il sistema RESTORE. L'avvenuta correzione della mutazione è stata confermata dal sequenziamento SANGER della regione circostante il sito da correggere nel cDNA delle cellule trasfettate con il sistema minixABE. Infine, mediante immunofluorescenza abbiamo osservato il recupero della proteina CFTR nelle cellule CFF-16HBEge CFTR W1282X con i sistemi REPAIRv2 e mini xABE e la sua localizzazione sulla membrana plasmatica con il sistema RESTORE.

## Conclusioni

Complessivamente, i nostri risultati suggeriscono che le mutazioni non-senso UGA nell'mRNA del gene CFTR possono essere efficacemente corrette tramite *editing* dell'RNA messaggero. Queste osservazioni aprono prospettive promettenti nella correzione dei codoni di stop prematuri presenti nell'RNA messaggero di CFTR attraverso la correzione dell'RNA mutato, costituendo un approccio più sicuro rispetto a quelli che agiscono sul DNA mutato.

## SESSION 2

# New perspectives in CFTR modulators

*Small nitrogen heterocycles as correctors of the mutant CFTR protein in cystic fibrosis*

*Piccole strutture eterocicliche come correttori della proteina CFTR mutata in fibrosi cistica*



Paola Barraja (in the middle) and her research group

4

**Arianna Venturini<sup>1</sup>, Mario Renda<sup>1</sup>, Daniela Guidone<sup>1</sup>, Virginia Spanò<sup>2</sup>, Marilia Barreca<sup>2</sup>, Michele Genovese<sup>1</sup>, Maria Valeria Raimondi<sup>2</sup>, Alessandra Montalbano<sup>2</sup>, Luis J. V. Galiotta<sup>1</sup>, Paola Barraja<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>2</sup>Department of Sciences and Chemical Biology and Pharmaceutical Technology (STEBICEF), University of Palermo, Italy (FFC#3/2020, concluded)

## Background and rationale

*Molecular defects caused by F508del and other CFTR mutations can be corrected by small molecules called correctors and potentiators. Correctors stabilize CFTR and improve its trafficking to plasma membrane thus resulting as an effective therapeutic approach for cystic fibrosis (CF). Considering that F508del causes multiple defects to CFTR protein, combinations of correctors with complementary mechanisms of action are needed. We previously identified a class of new small molecules, called PP compounds, with high efficacy as F508del-CFTR correctors particularly in combination with class 1 correctors such as VX-809. Development of new CFTR modulators may be beneficial for the treatment of patients with F508del and other CF-causing mutations.*

## Hypothesis and objectives

*Our hypothesis is that chemical modification of the PP chemical scaffold followed by functional testing on cell lines and primary airway epithelial cells can improve efficacy and potency. Our main objective was to obtain a lead compound endowed with high activity as corrector and acceptable drug-like characteristics. Furthermore, as an additional objective we explored the mechanism of action of PP compounds.*

## Essential methods

*Iterative cycles of chemical synthesis were performed followed by testing of compounds as correctors on CFBE41o- cells expressing F508del-CFTR and the halide-sensitive yellow fluorescent protein (HS-YFP). For the most active compounds, dose-response curves and EC50 values were calculated and are then validated by short-circuit recordings on primary airway epithelial cells (bronchial and/or nasal). The ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) properties of selected compounds were also determined. Furthermore, the mechanism of action of compounds was investigated by determining their ability to stabilize different CFTR fragments.*

## Results

*Our synthetic efforts have produced so far nearly 300 compounds with tricyclic core (PP) that have been functionally tested. Many PP compounds with potency in the submicromolar range have been identified. Selected compounds have been successfully tested on CF bronchial epithelial cells showing high efficacy in combination with VX-809. Insight in the ADME profile of PP compounds has revealed a strong lipophilic character, limiting aqueous solubility and permeability. This feature needs to be addressed to improve the drug-like properties of PP compounds. Interestingly, the test on CFTR fragments has shown that PP compounds require the second transmembrane domain to show a stabilization effect.*

## Conclusions

*PP compounds appear promising for the future development of combinatorial treatments for CF although ADME profiling indicated the need for an improvement of water solubility. New cycles of chemical synthesis, evaluation of corrector activity and ADME/Tox properties are ongoing to develop candidates for preclinical and clinical development.*

## Razionale dello studio

Correttori e potenziatori sono piccole molecole in grado di correggere i difetti di stabilità e ripiegamento causati da mutazioni della proteina CFTR. L'uso di correttori è particolarmente indicato per il recupero di CFTR con la mutazione F508del, soprattutto combinando composti con meccanismo d'azione complementare. Nel corso dei nostri studi abbiamo identificato una nuova classe di piccole molecole, chiamate PP, altamente efficaci nel recupero funzionale della proteina CFTR con F508del, anche in cellule epiteliali primarie di pazienti con fibrosi cistica (FC) e soprattutto in combinazione con correttori di classe 1 (VX-809). Lo sviluppo di nuovi modulatori di CFTR è importante per il trattamento dei pazienti affetti da fibrosi cistica.

## Ipotesi e obiettivi

Ipotizziamo che ulteriori modifiche strutturali dei composti PP, possano migliorarne la potenza e l'efficacia. Il nostro obiettivo principale è ottenere un candidato altamente efficace come correttore, dotato di proprietà farmacologiche favorevoli, ed esplorarne il meccanismo di azione.

<b>Metodi</b>	Il nostro lavoro si basa su cicli ripetuti di sintesi e valutazione dell'attività su cellule CFBE41o- con espressione di CFTR con F508del. Per i composti più attivi viene determinata la relazione dose-risposta e calcolate l'efficacia massima e la potenza. I composti migliori vengono valutati attraverso test funzionali su cellule epiteliali (bronchiali e/o nasali) di pazienti con FC. Per alcuni composti sono state determinate le proprietà ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) e il meccanismo di azione mediante saggi di stabilizzazione di frammenti di CFTR.
<b>Risultati</b>	I nostri sforzi hanno portato finora alla sintesi di circa 300 composti PP a struttura tricyclica. Molti composti hanno mostrato efficacia significativa nel recupero funzionale della CFTR con F508del con una potenza submicromolare anche in cellule epiteliali primarie di pazienti con FC, soprattutto in combinazione con correttori di classe 1 (VX-809). Studi <i>in vitro</i> delle proprietà ADME hanno evidenziato un forte carattere lipofilo che limita la solubilità in acqua e la permeabilità. Saggi su diversi frammenti di CFTR, indicano che i composti PP richiedono il secondo dominio transmembrana per mostrare un effetto di stabilizzazione.
<b>Conclusioni</b>	I composti PP sono promettenti per lo sviluppo di nuovi trattamenti combinatori in pazienti con FC, ma è necessario migliorarne il profilo ADME. Sono in corso nuovi cicli di sintesi e valutazione dell'attività correttiva e delle proprietà ADME per ottenere un buon candidato per un possibile sviluppo preclinico e clinico.

**New generation of pharmacological modulators to rescue mutant CFTR protein**

Molecole 3.0 per la fibrosi cistica. Nuovi modulatori farmacologici per il recupero della proteina CFTR mutata



Picture above, Paola Barraja (in the middle) and her research group. Picture below, Luis Galiotta (on the right) and his research group

**5**

**Arianna Venturini<sup>1</sup>, Mario Renda<sup>1</sup>, Daniela Guidone<sup>1</sup>, Virginia Spanò<sup>2</sup>, Marilia Barreca<sup>2</sup>, Michele Genovese<sup>1</sup>, Maria Valeria Raimondi<sup>2</sup>, Alessandra Montalbano<sup>2</sup>, Luis J. V. Galiotta<sup>1</sup>, Paola Barraja<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>2</sup> Department of Sciences and Chemical Biology and Pharmaceutical Technology (STEBICEF), University of Palermo, Italy (**Molecole 3.0, ongoing**)

**Background and rationale**

Although significant advances have been obtained in the pharmacological treatment of cystic fibrosis (CF), with the recently approved Kaftrio, a combination of two correctors belonging to different classes VX-661 (class 1), VX-445 (class 3) and one potentiator VX-770, new modulators are still needed to rescue F508del and other CFTR mutants with trafficking defects. In the course of our previous studies (FFC#4/2018, FFC#3/2020) we have identified a class of new small molecules, PP compounds, as correctors with high efficacy in the rescue of F508del-CFTR on native epithelial cells of CF patients particularly in combination with class 1 correctors (VX-809).

**Hypothesis and objectives**

Within a class of 200 compounds based on a tricyclic core (PP), compound PP028 was highlighted as a lead candidate for the high rescue of F508del-CFTR particularly in combination with class 1 correctors. Lack of synergy with 4172 and VX-445 compounds (class 3 correctors) suggests that PP028 has a similar mechanism of action. Insight in the ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) profile of selected PP compounds indicated a high lipophilicity, limiting bio-availability. Our objective is to extend the chemical synthesis to generate candidates with improved features, either in terms of corrector potency/efficacy, and of drug-likeness.

**Essential methods**

Iterative cycles of chemical synthesis were performed followed by testing of compounds as correctors on CFBE41o- cells and primary bronchial epithelial cells expressing F508del-CFTR. Along with chemical manipulation of PP scaffold, a scaffold hopping (SH) approach was pursued to generate new analogues based on a free rotatable structure.

**Preliminary results**

Selected PP and SH derivatives were evaluated to assess the metabolic stability in human, rat, mouse liver microsomal models. Interestingly, good metabolic stability in human models was obtained. To study the corrector site of action, stabilization of CFTR fragments of different length including various CFTR domains was used to investigate the mechanism of action in comparison with other CFTR correctors. Stabilization by PP028 was only observed when the second membrane-spanning domain was included.

**Conclusions**

PP and SH compounds appear promising for the future development of combinatorial treatments for CF. New compounds reaching the same potency and efficacy of PP028 were obtained confirming the synergistic effect which proves to be the most promising feature of our family of correctors. New cycles of chemical synthesis, evaluation of corrector activity and ADME/Tox properties are ongoing to develop candidates for preclinical and clinical development.

**Razionale dello studio**

Sebbene siano stati fatti numerosi progressi nel trattamento della fibrosi cistica (FC), con la recente approvazione del Kaftrio, farmaco che contiene i due correttori VX-661 (classe 1) e VX-445 (classe 3) e il potenziatore VX-770, è necessaria la scoperta di nuovi modulatori per il recupero della CFTR mutata sia con F508del sia con altre mutazioni. Nel corso dei nostri precedenti studi (FFC#4/2018, FFC#3/2020) abbiamo identificato una nuova classe di molecole (composti PP) come correttori con alta efficacia nel recupero della CFTR mutata soprattutto in combinazione con correttori di classe 1 (VX-809).

## Ipotesi e obiettivi

Nell'ambito di un gruppo composto da circa 200 composti a struttura tricyclica (PP), è emerso un candidato promettente (PP028). L'assenza di effetto sinergico quando PP028 è usato con correttori di classe 3 (4172 e VX-445) fa pensare che correttori e PP028 agiscano con meccanismi simili. Studi ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) su composti PP selezionati, indicano una elevata lipofilia che potrebbe limitare la biodisponibilità. Il nostro obiettivo è estendere la sintesi chimica per generare correttori ottimizzati sia in termini di potenza/efficacia sia come proprietà farmacologiche.

## Metodi

L'esplorazione dello spazio chimico, basata su cicli di sintesi seguita dalla valutazione dell'attività correttrice su cellule CFBE41o- e su cellule epiteliali bronchiali primarie con espressione di CFTR con la mutazione F508del, è stata effettuata sia attraverso manipolazione strutturale dello scaffold PP che mediante una strategia di *scaffold hopping* (SH) generando analoghi con struttura flessibile.

## Risultati preliminari

Sono stati condotti saggi su alcuni composti PP e SH per valutare la stabilità metabolica *in vitro* in modelli microsomiali epatici di uomo, ratto e topo. I dati raccolti hanno evidenziato una buona stabilità sul modello umano. Allo scopo di studiare il sito d'azione dei correttori, sono stati usati frammenti di CFTR di diversa lunghezza, che incorporano vari domini della proteina. Si osserva una stabilizzazione da parte di PP028 quando è presente il secondo dominio transmembrana.

## Conclusioni

I composti PP e SH sono promettenti per lo sviluppo di trattamenti combinatori per la FC. Abbiamo già ottenuto nuovi composti con potenza ed efficacia paragonabili a PP028, confermando la capacità di sinergizzare con correttori di classe 1 che è la caratteristica più preziosa dei nostri composti. Sono in corso nuovi cicli di sintesi e valutazione dell'attività e delle proprietà ADME/Tox allo scopo di sviluppare candidati ottimizzati per uno sviluppo preclinico e clinico.

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

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



Fabio Bertozzi (on the right) with IIT collaborators, Elisa Romeo and Francesco Saccoliti

6

### Fabio Bertozzi<sup>1</sup>, Elisa Romeo<sup>2</sup>, Francesco Saccoliti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova - <sup>2</sup> Structural Biophysics and Translational Pharmacology, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova.

(FFC#4/2020, concluded; FFC#2/2022 new)

## Background and rationale

*Cystic Fibrosis (CF) is a rare genetic disease characterized by deficiencies in the synthesis or function of the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) anion channel, caused by mutations in the CFTR gene. Within the Task Force for Cystic Fibrosis project, our group discovered ARN23765, a CFTR corrector with a sub-nanomolar potency in rescuing the function of mutant CFTR in human bronchial epithelial cells from F508del/F508del CF patients. Despite the validated pharmacological effects, the mechanism of action of ARN23765 has not yet been conclusively defined.*

## Hypothesis and objectives

*The aim of our project is to identify the biological target(s) and the mechanism of action of ARN23765 by Photo-Affinity Labeling (PAL) studies in live cells. The discovery of off-targets unrelated to the known CFTR-interacting proteins will also be an important finding, helping to predict the potential side effects of the compound.*

## Essential methods

*The experimental strategy is based on the design and synthesis of chemical probes structurally related to ARN23765, carrying both a photo-reactive moiety and a reporter/purification tag, or a chemical group for the ligation to such a tag. These photo-affinity probes are incubated with cells or cell lysates expressing either wild type (wt) or F508del-CFTR and then exposed to UV light. The photo-reactive moiety, upon activation by UV light, cross-links to bio-molecules in close proximity. The reporter molecule is used to detect and/or isolate probe-protein adducts for the identification of the target(s) by Western blot and/or mass spectrometry analysis.*

## Results

*We synthesized ARN23765-like photo-affinity probes that allowed capturing CFTR in wt- and F508del- CFTR-overexpressing CFBE41o- cells, demonstrating for the first time the interaction of a corrector to CFTR in live cells. Additional targets or proteins interacting with CFTR, which were identified with PAL experiments coupled to mass spectrometry techniques, are still under evaluation.*

## Conclusions

*Our data show that ARN23765-like photo-affinity probes bind to CFTR in living cells, indicating that corrector ARN23765 may reasonably act directly on CFTR. To the best of our knowledge, this outcome is of great interest since it discloses the unprecedented interaction of a modulator to CFTR in an integral biological setting. Furthermore, a set of interesting proteins involved in CFTR interaction, that could represent additional targets of ARN23765, were also identified.*

## Appendix Project FFC#2/2022

*We will pursue our studies for the elucidation of the mechanism of action of ARN23765 on CFTR. Computational docking analyses will provide indications on the molecular bases for the interaction of ARN23765 with CFTR. Functional studies using CFTR domains will help identifying the protein regions involved in ARN23765-induced correction. PAL experiments in live cells combined with mass spectrometry will help identifying CFTR peptides bound to ARN23765-derived probes. Finally, binding site mutations will be performed to corroborate our results. The identification of the ARN23765 mechanism of action will contribute to further characterize this corrector and strengthen its profile as preclinical development candidate for the treatment of CF.*

## Razionale dello studio

Nell'ambito del progetto *Task Force for Cystic Fibrosis*, il nostro gruppo ha scoperto ARN23765, un correttore di CFTR con F508del, che mostra un'elevata potenza nel ristabilire la funzione della proteina mutata in cellule epiteliali bronchiali da pazienti F508del/F508del. Nonostante i dimostrati effetti biologici, il meccanismo d'azione di ARN23765 non è stato ancora definito.

## Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo del nostro progetto sta nell'identificare i bersagli biologici e il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule viventi attraverso un approccio biochimico, noto come *Photo-Affinity Labeling* (PAL). Inoltre, l'eventuale scoperta di proteine non direttamente correlate a CFTR sarà di aiuto per comprendere potenziali effetti indesiderati del composto.

## Metodi

L'approccio sperimentale è basato sulla sintesi di sonde chimiche strutturalmente correlate a ARN23765, caratterizzate dalla presenza di una porzione fotoreattiva e di un marcatore molecolare o di un gruppo chimico che consente il legame con il marcatore stesso. Queste sonde foto-attivabili sono incubate con cellule o lisati cellulari che esprimono CFTR nativa (wt) o mutata (F508del) e successivamente attivate dalla luce UV. La funzionalità foto-reattiva per irraggiamento con la luce si legherà alle biomolecole nelle immediate vicinanze. Il marcatore legato alla sonda consentirà di rilevare e/o isolare gli addotti tra il composto e la proteina per l'identificazione del bersaglio mediante western blot e/o spettrometria di massa.

## Risultati

Abbiamo sintetizzato sonde derivate da ARN23765 che hanno permesso di rilevare CFTR in cellule CFBE41o- che esprimono CFTR wt- o con F508del, dimostrando per la prima volta l'interazione di un correttore con CFTR in cellule vive. Mediante esperimenti PAL accoppiati a tecniche di spettrometria di massa abbiamo identificato ulteriori proteine (target o interattori di CFTR) che sono in fase di valutazione.

## Conclusioni

I dati mostrano 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, sono state identificate alcune interessanti proteine capaci di interagire con CFTR, che potrebbero rappresentare ulteriori bersagli di ARN23765.

## Appendice Progetto FFC#2/2022

Con il nuovo progetto proseguiremo gli studi per la delucidazione del meccanismo d'azione di ARN23765 su CFTR. Mentre tecniche computazionali forniranno indicazioni sulle interazioni molecolari di ARN23765, studi funzionali con domini aiuteranno a identificare le regioni di CFTR coinvolte nella correzione indotta da ARN23765. Esperimenti di PAL in cellule vive saranno combinati con la spettrometria di massa per identificare i peptidi di CFTR legati alle sonde molecolari derivate da ARN23765. Infine, verranno eseguite indagini di struttura-funzione mediante l'introduzione di mutazioni nel sito di legame. 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.

## SESSION 3

# CFTR modulator therapies for orphan mutations

*Rescuing rare CFTR mutants with a PI3K $\gamma$  mimetic peptide*

Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3K $\gamma$



Emilio Hirsch (in the middle) and his research group

7

**Alessandra Ghigo<sup>1,2</sup>, Alessandra Murabito<sup>1</sup>, Angela Della Sala<sup>1</sup>, Marco Mergio<sup>1</sup>, Valeria Capurro<sup>3</sup>, Alessia Loffreda<sup>4</sup>, Andrea Raimondi<sup>4</sup>, Elvira Sondo<sup>3</sup>, Carlo Tacchetti<sup>4</sup>, Gergely Lukacs<sup>5</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>3</sup>, Emilio Hirsch<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Italy - <sup>2</sup> Kither Biotech Srl, Torino, Italy - <sup>3</sup> Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy - <sup>4</sup> Experimental Imaging Center, San Raffaele Scientific Institute, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy - <sup>5</sup> Department of Physiology, McGill University, Montréal, Quebec, Canada (FFC#3/2022, new)

## Background and rationale

*Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-activated Cl<sup>-</sup> channel whose dysfunction leads to respiratory failure. The approval of CFTR modulators has opened the possibility of targeting the basic molecular defects underlying CF. Nevertheless, these molecules fail to completely rescue the activity of CFTR mutants (up to 10 and 60% of physiological values), and patients with rare mutations are not eligible for these treatments.*

## Hypothesis and objectives

*This project aims at demonstrating that an innovative medicinal product targeting the phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) can be exploited to reinstate the function of rare class III-IV CFTR mutants, either directly or by potentiating the efficacy of approved CFTR modulators.*

## Essential methods

*We will investigate the ability of the PI3K $\gamma$  mimetic peptide (PI3K $\gamma$  MP) to rescue the activity of rare CFTR mutants either as a single agent or in combination with Kaftrio by evaluating CFTR activity in cell lines and primary cells expressing rare class III-IV CFTR variants.*



### Preliminary results

Previous experiments from our laboratory indicate that PI3K $\gamma$  MP inhibits PI3K $\gamma$ -bound phosphodiesterase 4 (PDE4) and drives a localized increase in cAMP responsible for PKA-mediated phosphorylation and opening of wild-type CFTR. In primary bronchial F508del cells, PI3K $\gamma$  MP potentiates Cl<sup>-</sup> secretion up to 5 and 2 folds when added on top of Orkambi and Kaftrio, respectively.

### Conclusions

With this project, we expect to verify that the mechanism of action of PI3K $\gamma$  MP, i.e. localized cAMP/PKA elevation in the CFTR compartment, can be exploited to (i) directly rescue the activity of rare class III/IV mutants that can be responsive to cAMP stimulation<sup>3,4</sup>; (ii) enhance the efficacy of Kalydeco in rescuing class III mutants (“dual potentiator” approach) and (iii) potentiate the effects of Kaftrio on rare CFTR mutants for which this treatment has been recently approved. Notably, PI3K $\gamma$  MP is a preclinically advanced compound, since certified safety and toxicology studies in animals are already ongoing. Thus, proof-of-concept studies resulting from this project could be translated to the clinic through an accelerated pathway because they could benefit from already completed regulatory procedures.

### Razionale dello studio

La fibrosi cistica è una patologia causata da mutazioni nel gene che codifica per il CFTR, canale al cloruro attivato dal cAMP la cui disfunzione porta a insufficienza respiratoria. L'approvazione dei modulatori del CFTR ha aperto alla possibilità di bersagliare i difetti molecolari alla base della patologia. Tuttavia, queste molecole non riescono a ripristinare completamente l'attività dei mutanti del CFTR (fino al 10-60% dell'attività fisiologica), e i pazienti con mutazioni rare non sono eleggibili per questi trattamenti.

### Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo di questo progetto è quello di dimostrare che un medicinale innovativo che inibisce l'attività dell'enzima fosfoinositide 3-chinasi  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) possa essere sfruttato per ripristinare la funzione di mutanti rari del CFTR di classe III-IV, direttamente o potenziando l'efficacia dei modulatori approvati.

### Metodi

Indagheremo la capacità del peptide PI3K $\gamma$  di ripristinare l'attività di mutanti rari del CFTR, sia come agente singolo sia in combinazione con modulatori, valutando l'attività del canale in linee cellulari e cellule primarie che esprimono varianti rare del CFTR di classe III-IV.

### Risultati

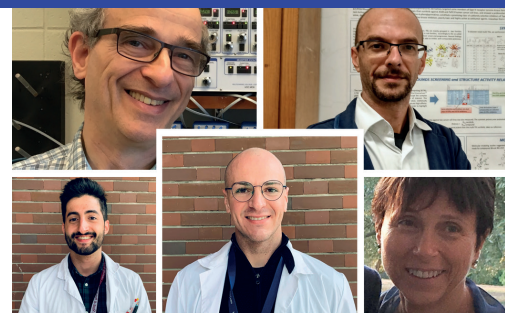
Esperimenti preliminari condotti nel nostro laboratorio indicano che PI3K $\gamma$  sia in grado di inibire l'attività della fosfodiesterasi 4 (PDE4) portando a un aumento localizzato di cAMP responsabile della fosforilazione mediata da PKA e dell'apertura del CFTR wt. Nelle cellule bronchiali primarie derivate da pazienti che esprimono CFTR con F508del, PI3K $\gamma$  potenzia fino a 5 e 2 volte la secrezione di cloro quando usato in combinazione rispettivamente con l'Orkambi e il Kaftrio.

### Conclusioni

Ci aspettiamo di convalidare PI3K $\gamma$  MP come medicinale in grado di (i) ripristinare la funzionalità di varianti rare del CFTR note per essere responsive al pathway di segnalazione del cAMP; (ii) potenziare l'effetto del Kalydeco nel ripristino dell'attività di mutanti di classe III e (iii) aumentare l'efficacia del Kaftrio su mutanti rari del CFTR per i quali questo trattamento è stato recentemente approvato. Inoltre, è importante notare che PI3K $\gamma$  è un composto a uno stadio di sviluppo preclinico avanzato, dato che studi certificati di sicurezza e tossicologia su non-roditori sono già in corso d'opera. Pertanto, prevediamo che i risultati di questo progetto possano essere traslati al paziente attraverso un percorso accelerato poiché potrebbero beneficiare di procedure normative già completate.

Toward the development of tailored therapies for insensitive CF gating mutations

Verso lo sviluppo di terapie personalizzate per i pazienti con FC con mutazioni di gating resistenti



Adriana Chilin (bottom right), Gergely Lukacs (up left) and the lab collaborators (Giovanni Marzaro, Christian Vaccarin, Marco Verona from right to left)

8

### Adriana Chilin<sup>1</sup>, Gergely Lukacs<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua, Italy - <sup>2</sup> Department of Physiology, McGill University, Montréal, Canada.

(FFC#3/2021, ongoing)

### Background and rationale

Class III CFTR mutations, colloquially called gating defects, compromise protein ionophoretic activity and are present in 5% of the cystic fibrosis (CF) population. These mutations have a wide range of responsiveness to currently approved drugs, highlighting the need for new gating potentiators characterized by an independent mechanism of action compared to the approved compounds. This new CFTR modulator could benefit a wide range of CF populations and pave the way toward the development of patient-tailored multidrug therapy regimes.

### Hypothesis and objectives

Our work focused on optimizing a previously identified pyrazole-pyrimidinone derivative capable of significantly improving the function of different class III CFTR mutations. This project aims to optimize the pharmacodynamic profile of our hit compound, with the aim of identifying novel modulators that, alone or in combination, can efficiently rescue variants of gating-deficient and therapy-resistant CFTRs.

### Essential methods

A second generation of pyrazole-pyrimidinone derivatives was designed by computational-aided methodologies. Then we produced the most promising candidates, which were screened, alone or in combination with other CFTR potentiators, against gating mutations present in the CF population (G551D- and N1303K-CFTR). Moreover, combinatorial potentiator profiling and cluster analysis identified the most effective modulator associations and shed light on the mechanism of action of our compounds.

### Preliminary results

Interestingly, this screening identified six compounds capable of outperforming the Kaftrio combination on G551D- and N1303K-CFTR when administered with VX-770 or VX445. The strong synergistic effect on the CFTR function enhancement exerted by our compounds in association with all other potentiators tested suggests the involvement of a novel and independent mechanism of action.

## Conclusions

*Due to the high heterogeneity in CFTR mutations, many patients remain partially or non-responsive to available drugs. Developing a class of compounds characterized by a novel mechanism of action may represent a crucial factor in the establishment of therapeutic approaches for CF patients affected by these resistant CFTR mutations. These molecules will broaden the spectrum of therapeutics available and we expect to pave the way toward a novel personalized therapy approach for (ultra-) rare CFTR gating mutations.*

## Razionale dello studio

Le mutazioni di classe III di CFTR, colloquialmente chiamate difetti di *gating*, compromettono l'attività ionoforetica della proteina e sono presenti nel 5% dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Esse posseggono un'ampia gamma di risposte ai farmaci attualmente approvati, evidenziando la necessità di nuovi composti caratterizzati da un nuovo meccanismo d'azione sulla proteina CFTR. Tali nuovi farmaci porterebbero beneficio a un'ampia popolazione di pazienti e aprirebbero la strada allo sviluppo di regimi terapeutici multifarmaco personalizzati.

## Ipotesi e obiettivi

Il nostro lavoro è focalizzato all'ottimizzazione di un derivato pirazol-pirimidinico in grado di migliorare significativamente la funzione di diverse mutazioni di *gating*. Questo progetto si concentra sull'ottimizzazione del profilo farmacodinamico del nostro composto, mirando all'identificazione di nuove molecole che, da sole o in combinazione, possano migliorare la funzione di mutazioni resistenti alle terapie attuali.

## Metodi

Una nuova generazione di derivati pirazolo-pirimidinici è stata progettata mediante metodologie computazionali. I candidati più promettenti sono stati sintetizzati e successivamente sottoposti a screening, da soli o in combinazione con altri potenziatori di CFTR, contro comuni mutazioni di *gating* (G551D e N1303K). Tramite studi combinatoriali di *profiling* e di *cluster analysis* sulle molecole più promettenti, sono state identificate associazioni di modulatori più efficaci, suggerendo un possibile meccanismo d'azione per i nostri composti.

## Risultati preliminari

Questo screening ha portato all'identificazione di sei composti più efficaci della combinazione Kaftrio sulle mutazioni di CFTR G551D e N1303K quando somministrati in combinazione con VX770 o VX445. Il forte sinergismo esercitato dai nostri composti in associazione con tutti gli altri potenziatori testati suggerisce il coinvolgimento di un nuovo e indipendente meccanismo d'azione su CFTR.

## Conclusioni

A causa dell'elevata eterogeneità nelle mutazioni di CFTR, molti pazienti non rispondono adeguatamente ai farmaci disponibili. Lo sviluppo di una classe di composti caratterizzati da un nuovo meccanismo d'azione può rappresentare un fattore cruciale per stabilire nuovi approcci terapeutici per i pazienti affetti da FC con mutazioni CFTR resistenti ai farmaci. Queste molecole ampliaranno lo spettro delle terapie disponibili, aprendo la strada a un nuovo approccio terapeutico personalizzato per mutazioni (ultra)-rare di CFTR.

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

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



Laura Lentini and Ivana Pibiri (in the middle) and their research group

9

**Laura Lentini<sup>1</sup>, Andrea Pace<sup>2</sup>, Maria Grazia Zizzo<sup>1</sup>, Federica Corrao<sup>1</sup>, Marco Tutone<sup>2</sup>, Pietro Salvatore Carollo<sup>1</sup>, Riccardo Perriera<sup>1</sup>, Ignazio Fiduccia<sup>2</sup>, Marianne Carlon<sup>3</sup>, François Vermeulen<sup>3</sup>, Anabela Ramalho<sup>3</sup>, Raffaella Melfi<sup>1</sup>, Aldo Di Leonardo<sup>1</sup>, Ivana Pibiri<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), Cellular biology section and - <sup>2</sup> Chemistry section, University of Palermo, Italy - <sup>3</sup> Laboratory for Molecular Virology and Gene Therapy, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, KU Leuven, Belgium (FFC#6/2020, ongoing)

## Background and rationale

*Among the mutations of the Cystic Fibrosis Transconductance Regulator (CFTR) gene, causing cystic fibrosis (CF), nonsense mutations are the second most diffuse mutations. In particular, in Italy, about 20,5% of CF patients have a stop mutation. A proposed approach restoring the nonsense mutated CFTR gene is translational readthrough of premature termination codons (PTCs) by Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs). By computational and biological screening, we identified three new small molecules showing high readthrough activity. Based on the results of the project FFC#3/2017 we hypothesize that (i) the efficacy of TRIDs observed in vitro is reproducible in vivo; (ii) the CFTR protein produced after the readthrough recovers its functionality; (iii) the Mechanism Of Action (MOA) could involve an interaction with the mRNA or proteins favoring interaction with t-RNA directly or indirectly.*

## Hypothesis and objectives

*The main scope of this project was to assess the molecules toxicity and the biodistribution in vivo, to evaluate CFTR expression and functionality after treatment with TRIDs in vivo and in CF organoids. A side objective was to study the possible MOA.*

## Essential methods

*(i) Scale up of the synthesis to obtain adequate amounts of the selected TRIDs. (ii) Study of the TRIDs metabolism in human liver microsomes and study of the biodistribution in a wild type mouse model. (iii) Analysis of CFTR expression (by western blot and Real time RT-PCR) and functionality after treatment with NV TRIDs in CFTRG542X stop mouse model and in human CF intestinal organoids carrying nonsense CFTR mutations. (iv) Computational evaluation of the TRIDs biological targets and MOA.*

### Preliminary results

Our studies performed on human liver microsomes and in mice models, showed a good metabolic stability and biodistribution of our molecules. Histological analyses performed on different organs of the treated mice showed no deleterious effects in acute toxicity experiments. Moreover, a moderate rescue of the CFTR activity was observed in CF organoids in combination with CFTR modulators. Finally, a possible biological target of the NV molecules was explored by docking and Molecular Dynamics simulations, indicating that the FTSJ1 protein could be involved in the readthrough process induced by our TRIDs.

### Conclusions

Our findings have translational potential and provide the validation of molecules with readthrough activity for the rescue of the CFTR function.

### Razionale dello studio

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

### Ipotesi e obiettivi

Nel nostro precedente progetto (FFC#3/2017) abbiamo identificato tre molecole che presentano elevata attività *readthrough* e una bassa tossicità sia *in vitro* sia *in vivo* (modello zebrafish). Scopo di questo progetto è stato quello di valutare stabilità, tossicità e biodistribuzione di queste molecole in modello di topo oltre all’efficacia su modelli avanzati di FC. Infine, ulteriore obiettivo è stato quello di valutare a fondo il loro meccanismo d’azione (MOA).

### Metodi

Ceppi di topi wt sono stati usati per lo studio di tossicità acuta delle tre molecole NV848, NV914, NV930 e per la biodistribuzione di queste *in vivo*. Stiamo completando gli studi di espressione di CFTR in un sistema modello di topo CFTR<sup>UGAstop</sup> dopo il trattamento con le tre molecole NV. Abbiamo stimato l’attività delle nuove molecole in organoidi umani intestinali con mutazioni stop del gene CFTR. Studi computazionali sono invece stati effettuati per comprendere il bersaglio biologico e il meccanismo d’azione delle molecole.

### Risultati preliminari

I risultati ottenuti hanno mostrato una buona stabilità e tollerabilità delle tre molecole NV848, NV914, NV930 *in vivo*, oltre alla capacità di raggiungere differenti distretti dell’organismo (NV848). È stato anche possibile osservare un recupero dell’attività di CFTR in organoidi intestinali FC con mutazione W1282X in combinazione a correttori e potenziatori. Inoltre gli studi hanno mostrato la non interferenza delle tre molecole con i codoni di stop naturali e il possibile coinvolgimento della proteina FTSJ1 nel meccanismo di *readthrough* dei codoni stop. Sono in fase di completamento gli esperimenti sul modello di topo CFTR<sup>UGAstop</sup>.

### Conclusioni

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

## SESSION 4

# Clinical studies

### Early derangements of glucose tolerance in cystic fibrosis: effect of CFTR modulators

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



Clockwise from the top-left: Alberto Battezzati, Carla Colombo, Andrea Mari, Maria Cristina Lucanto and Vincenzina Lucidi

10

**Alberto Battezzati<sup>1</sup>, Simona Bertoli<sup>1</sup>, Giulia Maria De Carlo<sup>1</sup>, Andrea Foppiani<sup>1</sup>, Gianfranco Alicandro<sup>1</sup>, Carla Colombo<sup>2</sup>, Maria Chiara Russo<sup>2</sup>, Valeria Dacco<sup>2</sup>, Vincenzina Lucidi<sup>3</sup>, Fabiana Ciciriello<sup>3</sup>, Riccardo Valerio Debiase<sup>3</sup>, Anna Lisa Montemari<sup>3</sup>, Federico Alghisi<sup>3</sup>, Maria Cristina Lucanto<sup>4</sup>, Esterina Quattromano<sup>4</sup>, Simona Cristadoro<sup>4</sup>, Andrea Mari<sup>5</sup>, Roberto Bizzotto<sup>5</sup>, Eleonora Grespan<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> International Center for the Assessment of Nutritional Status, DeFENS, University of Milan, Italy - <sup>2</sup> Cystic Fibrosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Italy - <sup>3</sup> Fibrosis Unit, Pediatric Hospital “Bambino Gesù”, Rome, Italy - <sup>4</sup> Cystic Fibrosis Center, Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Messina, Italy - <sup>5</sup> Institute of Neuroscience, National Research Council, Padua, Italy (FFC#24/2019, ongoing)

### Background and rationale

Diabetes (CFRD) is a frequent and serious complication in cystic fibrosis (CF), caused by defects in insulin secretion. New modulator therapies targeted at CFTR have become available raising hope to prevent or treat CFRD.

### 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 objective is to evaluate if modulator treatment prescribed in children can ameliorate insulin secretory defects when compared to CF natural history.

### Essential methods

We used the oral glucose tolerance test as previously developed to assess the insulin secretion parameters at baseline and aimed to repeat all studies in enrolled patients. Patients waiting or non-eligible for modulator therapy were also studied to assess the natural history.

<b>Preliminary results</b>	<i>The implications of the on-going COVID-19 pandemic have severely limited the opportunities to perform OGTT (Oral Glucose Tolerance Test). Nonetheless, the historical data analysis and follow-up of previous patients are still ongoing. We were able to determine an association between reduced adult height in CF and prepuberal reduction in <math>\beta</math>-cell glucose sensitivity, that causes a late insulin response to glucose. We were also able to identify an elevation of insulin secretory parameters during puberty in CF, while the subsequent elevation in glucose levels is more severe in pancreatic insufficient patients, is associated with <math>\beta</math>-cell glucose sensitivity decline, even with a conserved insulin sensitivity and reduced insulin clearance.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>The study aims to evaluate the effects of modulators on insulin secretion defects that lead to CFRD. For the ongoing pandemic we were not able to significantly improve on the results produced in 2021, but we have advanced the knowledge on the natural history of secretory defects, contributing to define the national references, that will allow to evaluate clinical courses and effects of new therapies, also considering the imminent use of Kaftrio beginning from 6 years of age.</i>
<b>Razionale dello studio</b>	Il diabete in fibrosi cistica (CFRD, <i>Cystic Fibrosis Related Diabetes</i> ) è una complicanza frequente e severa causata da un deficit progressivo di secrezione insulinica. Nuovi farmaci per il difetto genetico di base aprono la possibilità di prevenire o trattare il CFRD.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Si è ipotizzato che i farmaci modulatori possano migliorare la secrezione insulinica ma che, nei primi studi che non hanno evidenziato un effetto netto, la terapia sia stata somministrata in fase troppo avanzata per risultare efficace. L'obiettivo è valutare se il trattamento con i modulatori somministrato in età precoce può migliorare la secrezione insulinica rispetto al suo naturale decorso in fibrosi cistica (FC).
<b>Metodi</b>	Si è impiegato il carico orale di glucosio per identificare le alterazioni di secrezione insulinica, con il proposito di ripeterlo a distanza in tutti i bambini arruolati. I pazienti in attesa di ricevere la terapia e i pazienti con mutazioni per cui non vi è indicazione sono stati inclusi per valutare il decorso naturale dei deficit secretori.
<b>Risultati preliminari</b>	Le problematiche connesse all'emergenza da COVID-19 hanno limitato severamente la possibilità di realizzare OGTT (test di tolleranza al carico orale di glucosio), mentre è proseguita l'analisi di dati storici e il follow-up clinico dei soggetti precedentemente reclutati. Si è potuto definire che la nota riduzione strutturale in pazienti adulti affetti da FC è legata alla riduzione della sensibilità $\beta$ -cellulare al glucosio in età prepuberale, che causa una risposta ritardata al glucosio. Inoltre l'analisi dei dati storici combinata con quelli acquisiti in questo progetto indica che la pubertà sembra associata a un incremento della capacità secretoria in FC. Inoltre, che il lento incremento della risposta glicemica post-puberale è più severo in pazienti con insufficienza pancreatica ed è associato a un declino della responsività $\beta$ -cellulare, pur con una conservata sensibilità insulinica e ridotta clearance insulinica.
<b>Conclusioni</b>	Lo studio mira a comprendere se i nuovi farmaci modulatori hanno un effetto sulle alterazioni che portano a CFRD. Per la pandemia non si è ancora progredito significativamente rispetto a quanto riportato nel 2021 sull'effetto dei nuovi modulatori. È però avanzata la conoscenza della storia naturale dei difetti secretori, contribuendo alla definizione di riferimenti nazionali per valutare i decorsi clinici e l'effetto delle nuove terapie, anche in vista dell'impiego del Kaftrio a partire dai 6 anni.

*Safety and effectiveness of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Kaftrio) in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease: an Italian observational, multicenter study*

Effetto Kaftrio nella malattia avanzata. Sicurezza ed efficacia di elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor (Kaftrio) in persone con fibrosi cistica e malattia polmonare avanzata: uno studio italiano, osservazionale e multicentrico



Cesare Braggion

11

**Cesare Braggion<sup>1</sup>, Sonia Volpi<sup>2</sup>, Gruppo di Studio SITTA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> FFC Ricerca Italian Cystic Fibrosis Research Foundation -

<sup>2</sup> Cystic Fibrosis Veneto Regional Center, AOUI Verona, Italy -

<sup>3</sup> Principal investigator e data manager dei Centri/Servizi di Supporto aderenti allo studio

(Effetto Kaftrio, ongoing)

**Background and rationale**

*The cystic fibrosis (CF) modulator drug elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) proved highly effective in controlled clinical trials for people with CF (pwCF) with at least one F508del allele. PwCF with advanced lung disease were not eligible to participate in clinical trials but may benefit from treatment with ETI. In Italy, a compassionate use program was established in June 2019 by Vertex Pharmaceuticals (DM 07/09/2017) to enable pwCF, 12 years of age or older, heterozygous for F508del and one minimal function (MF) mutation and with severe lung disease to receive ETI free of charge whilst awaiting national funding approval, which occurred in July 2021. After this date the drug was supplied by the Italian Healthcare Service.*

**Hypothesis and objectives**

*The availability of an effective treatment for patients facing respiratory failure, lung transplantation or death is of paramount importance, so the Italian Cystic Fibrosis Foundation funded an observational, retrospective study aimed to assess through 24 months the safety and effectiveness of ETI in pwCF enrolled in the compassionate use program.*

<b>Essential methods</b>	<i>24/25 Italian CF Centers participated in a retrospective observational study, designed to obtain real-world data in pwCF (age ≥ 12 years, genotype: F508del/MF allele) with advanced respiratory disease (FEV1 &lt; 40% pred.). Demographic and clinical data were collected from patient files for 2 years prior to and 2 years after ETI was initiated. Outcomes included treatment-related adverse events, temporary or definitive interruption of the drug, change in FEV1, sweat chloride concentration, use of antibiotics, body mass index and quality of life.</i>
<b>Preliminary results</b>	<i>The study is still ongoing. At the end of August 2022 72 pwCF were enrolled (49% of the expected eligible pwCF). The mean (range) age was 33.6 (15.8 - 58.1) years, mean FEV1 was 34.3 (11 - 55) %pred.; 7 (10%) pwCF were on a waiting list for lung transplantation.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>Short-term descriptive reports (3-6 months) showed a rapid clinical improvement after the initiation of ETI in pwCF with advanced lung disease. Completion of our study through at least 24 months of ETI will better characterize long-term outcomes and provide an understanding of the durability of the early health improvements.</i>

**Razionale dello studio** Gli studi clinici di fase 3 hanno dimostrato che il modulatore elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) è efficace nelle persone con fibrosi cistica (FC), eterozigoti per almeno una mutazione F508del. La presenza di una malattia polmonare avanzata esclude dai trial clinici autorizzativi ma ETI potrebbe essere vantaggioso anche in questa condizione. Dopo il giugno 2019 Vertex Pharmaceuticals ha fornito ETI alle persone con FC di età ≥ 12 anni, eterozigoti per F508del e una mutazione a funzione minima e con una malattia polmonare avanzata (FEV1 < 40% pred.), dopo la loro inclusione in un programma di uso ex-compassionevole (DM 07/09/2017). Il farmaco è stato autorizzato per l'immissione in commercio nel luglio 2021.

**Ipotesi e obiettivi** Alla malattia polmonare avanzata si può associare insufficienza respiratoria e necessità di un trapianto polmonare, con rischio di morte nell'attesa: la disponibilità di un farmaco efficace, come ETI, è perciò di grande importanza. Per questa ragione la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica ha finanziato uno studio osservazionale e retrospettivo per valutare la sicurezza e l'efficacia di ETI nelle persone con FC incluse nel programma di uso ex-compassionevole.

**Metodi** 24/25 Centri FC hanno aderito a questo studio, finalizzato a valutare nella vita reale gli effetti di ETI nelle persone con FC incluse nel programma ex-compassionevole. Saranno confrontati i dati demografici e clinici, raccolti durante i due anni precedenti e i due successivi l'avvio della terapia. Le misure di esito saranno gli effetti avversi correlati al farmaco, la sua sospensione temporanea o definitiva, la variazione di FEV1, del cloro sudorale, del numero di cicli antibiotici, dell'indice di massa corporea e della qualità di vita.

**Risultati preliminari** Lo studio è in corso. Alla fine di agosto 2022 sono state arruolate 72 persone, che rappresentano il 49% del totale atteso. Il valore medio (range) dell'età e del FEV1 erano rispettivamente di 33,6 (15,8 – 58,1) anni e 34,3 (11 – 55) % predetto. Il 10% è stato incluso nella lista d'attesa per il trapianto polmonare.

**Conclusioni** Studi di breve durata (3-6 mesi) hanno già riportato il rapido miglioramento clinico ottenuto dopo l'inizio di ETI nelle persone inserite in un programma di uso ex-compassionevole. Il completamento del nostro studio consentirà di caratterizzare gli esiti del trattamento con ETI nell'arco di 2 anni di terapia e di valutare se i risultati raggiunti saranno persistenti.

**Actin-resistant acidic DNase for the treatment of CF pulmonary symptoms**

Una DNasi acida resistente all'actina per il trattamento dei sintomi polmonari della FC



Clockwise from the left: Rosaria Casciaro, Gianfranco Pasut (at the top, on the right), Riccardo Percudani (at the bottom in the middle)

12

**Riccardo Percudani<sup>1</sup>, Gianfranco Pasut<sup>2</sup>, Rosaria Casciaro<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Italy - <sup>2</sup> Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua, Italy - <sup>3</sup> Istituto Giannina Gaslini, Centro Fibrosi Cistica, Genova, Italy (FFC#14/2022, new)

**Background and rationale**

*In a previous FFC project (FFC#9/2018) we studied different DNases encoded by the human genome for evaluating alternatives to the mucolytic agents used in the treatment of pulmonary symptoms in cystic fibrosis (CF) patients. A recombinantly produced human DNase1L2 revealed favorable properties for use in CF lung disease and potential for development as a new drug.*

**Hypothesis and objectives**

*As a continuation of the project, we aim at finalizing the preclinical characterization of DNase1L2 in artificial and patient mucus, and enhancing its activity through generation of a chimeric protein with improved action for complexed DNA that in conjunction with PEGylation will generate an innovative approach for mucus thinning. Furthermore, the structural basis of DNase1L2 unique catalytic properties will be investigated.*

**Essential methods**

*This two-years multicenter project will be carried out by research groups of the Universities of Parma and Padua, and the Gaslini Institute of Genova. The project involves the recombinant production of human DNase1L2 in native and genetically engineered form, its conjugation with polyethylene glycol (PEG) for an enhanced in vivo activity, and its in vitro and ex vivo characterization using cell cultures and patient sputum. A structural characterization will be carried out in collaboration with an external laboratory with expertise in x-ray crystallography and Cryo-EM.*

<b>Preliminary results</b>	<i>We have obtained preliminary results on the measurement of the mucolytic efficacy of DNase preparations on patient sputum. We have developed methods for the rational design of gene fusions and production of chimeric proteins combining the desired functional properties in a single peptide chain, and explored different strategies for improving the in vivo activity of proteins through covalent modifications. We have started experiments for the generation of networks of extracellular DNA fibers and their visualization through atomic force microscopy. We have set up protocols for preparation of DNase1L2 in a form suitable for structural characterization.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>We expect to gain insights into the management of CF pulmonary symptoms through resolution of extracellular DNA fibers and develop a DNase1L2 conjugate with improved pharmacological properties for better treatment of CF pulmonary symptoms.</i>
<b>Razionale dello studio</b>	In un precedente progetto FFC Ricerca (FFC#9/2018) abbiamo studiato diverse DNasi codificate dal genoma umano per valutare alternative agli agenti mucolitici usati nel trattamento dei sintomi polmonari nei pazienti con FC. Una DNasi umana (DNasi1L2) prodotta in forma ricombinante ha rivelato proprietà favorevoli per l'impiego nella malattia polmonare della FC e potenzialità utili per lo sviluppo come nuovo farmaco.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Come proseguimento del progetto, ci proponiamo di portare a termine la caratterizzazione pre-clinica della DNase1L2 nel muco artificiale e dei pazienti, e di potenziarne l'attività attraverso la generazione di una proteina chimerica con un'azione migliorata diretta contro il DNA complessato che, insieme alla PEGilazione, genererà un approccio innovativo per la riduzione della viscosità del muco. Inoltre, verranno studiate le basi strutturali delle proprietà catalitiche uniche della DNase1L2.
<b>Metodi</b>	Questo progetto multicentrico biennale sarà condotto da gruppi di ricerca delle Università di Parma e Padova e dell'Istituto Gaslini di Genova. Il progetto prevede la produzione ricombinante di DNase1L2 umana in forma nativa e geneticamente modificata, la sua coniugazione con polietilenglicole (PEG) per una maggiore attività <i>in vivo</i> , e la sua caratterizzazione <i>in vitro</i> ed <i>ex vivo</i> usando colture cellulari ed espettorato di pazienti. La caratterizzazione strutturale sarà effettuata in collaborazione con un laboratorio esterno esperto in cristallografia a raggi X e Cryo-EM.
<b>Risultati preliminari</b>	Abbiamo ottenuto risultati preliminari sulla misurazione dell'efficacia mucolitica dei preparati di DNasi sull'espettorato dei pazienti. Abbiamo sviluppato metodi per la progettazione razionale di fusioni geniche e la produzione di proteine chimeriche che combinano le proprietà funzionali desiderate in un'unica catena polipeptidica, ed esplorato diverse strategie per migliorare l'attività <i>in vivo</i> delle proteine attraverso modifiche covalenti. Abbiamo avviato esperimenti per la generazione di reti di fibre di DNA extracellulare e la loro visualizzazione attraverso la microscopia a forza atomica. Abbiamo messo a punto protocolli per la preparazione della DNase1L2 in una forma adatta alla caratterizzazione strutturale.
<b>Conclusioni</b>	Ci aspettiamo di acquisire conoscenze sulla gestione dei sintomi polmonari della fibrosi cistica attraverso la risoluzione delle fibre extracellulari di DNA e di sviluppare un coniugato di DNase1L2 con proprietà farmacologiche migliorate per un efficace trattamento dei sintomi polmonari della fibrosi cistica.

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

Disfunzione del ventricolo destro in pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmoni



Vittorio Scaravilli

13

#### Vittorio Scaravilli <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anesthesia, Critical Care and Emergency, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>2</sup> Department of Biomedical, Surgical, and Dental Sciences, University of Milan, Italy (FFC#27/2019, ongoing)

### Background and rationale

*Patients with cystic fibrosis (CF) have subclinical right ventricle (RV) dysfunction. During lung transplantation (LUTX), RV failure and shock may occur. In this scenario, emergent intraoperative extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is lifesaving but associated with 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 CF patients. Levosimendan is a calcium-sensitizer inotrope used for cardiac failure, capable of improving RV function, but never documented in the CF LUTX candidates.*

### Hypothesis and objectives

*We hypothesize that in CF patients undergoing LUTX: (i) preoperative RV strain is predictive of intraoperative RV failure; (ii) in patients with RV dysfunction, levosimendan is effective in reducing RV strain.*

### Essential methods

*(i) Prospective observational study of RV strain of CF patients undergoing LUTX; (ii) prospective interventional trial to test levosimendan in reducing RV strain in this patients' cohort.*

## Preliminary results

The COVID-19 pandemic has slowed recruitment; the study received an amendment for a further 1-year and expanded the patients' cohort to all patients enlisted for LUTX. Of the 42 patients enlisted for LUTX at our center: 2 were lost to follow-up, 9 are scheduled for baseline echocardiography in the next month, and 31 have been included (7 CF) and their preoperative echocardiography performed. Despite minimal macroscopic morphologic alterations (see Table 1), RV global and free wall longitudinal strain were greatly depressed. We retrospectively analyzed the use of postoperative inotropes (including levosimendan) in CF patients undergone LUTX from 2017 to 2022. Of the 74 CF patients enrolled, 37 (50%) used inotropes (INO+), and 11 (30%) of those were treated with Levosimendan (LEVO+). INO+ patients had more use of intraoperative ECMO (25 (68%) patients vs 15 (40%),  $p=0.018$ ), longer hospital length of stay (24 [20–30] days vs 21 [19–23],  $p=0.005$ ) but similar mortality. Similar outcomes were documented between LEVO+ and LEVO- patients. One LEVO+ patient developed atrial fibrillation.

## Conclusions

We documented that CF LUTX candidates have severely depressed RV strain. The ongoing study will assess the impact of this alteration on intraoperative and postoperative complications. Moreover, in a retrospective analysis, levosimendan was safe.

Index	Normal	Measured	p Z-test (Vs. normal population)
Right atrium area (cm <sup>2</sup> )	14±2	13±6	0.098
RV end-diastolic area (cm <sup>2</sup> )	18±4	17±7	0.544
RV basal diameter (mm)	33±4	36±12	< 0.001
RV FAC (%)	49±7	37±7	< 0.001
TAPSE (mm)	23±3	18±4	< 0.001
Pulmonary Artery Acceleration Time (ms)	130±20	93±37	< 0.001
S' vel RV (cm/s)	15±2	10±2	< 0.001
RV global longitudinal strain (RV GLS)	-24±3	-16±5	< 0.001
RV free wall longitudinal strain (RV FWLS)	-28±5	-18.±7	< 0.001

RV, right ventricle; FAC, fractional area change; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; S', tissue Doppler positive peak systolic wave velocity.

## Razionale dello studio

I pazienti con fibrosi cistica (FC) che necessitano di trapianto polmonare hanno una alterazione asintomatica della funzione del ventricolo destro che si manifesta durante l'intervento con deterioramento cardiaco acuto e necessità di circolazione extracorporea, che può essere associata a un peggioramento della prognosi del trapianto a breve termine. Il Levosimendan è un nuovo farmaco, usato fino a ora per pazienti con malattie cardiache, che è capace di migliorare la funzione del ventricolo destro.

## Ipotesi e obiettivi

Gli obiettivi sono: (i) validare nuove tecniche ecografiche non invasive per la diagnosi dei pazienti a più alto rischio di disfunzione intraoperatoria del ventricolo destro; (ii) verificare se il trattamento con Levosimendan possa essere efficace nel ridurre tale rischio.

## Metodi

Studio osservazionale prospettico (studio del cuore destro con ecografia in soggetti in lista per il trapianto) e una seconda fase interventistica (trattamento con Levosimendan dei pazienti a rischio per disfunzione ventricolare destra).

## Risultati preliminari

Lo studio è stato rallentato dalla pandemia di COVID-19. Abbiamo ottenuto una estensione temporale dello studio, e ampliato le analisi a tutti i pazienti candidati a trapianto. A oggi, dei 42 pazienti in lista presso il centro promotore (Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), 31 pazienti (7 con FC) sono stati studiati. Abbiamo osservato una grave riduzione dello strain del ventricolo destro, a fronte di una funzione globalmente preservata. Inoltre abbiamo condotto uno studio retrospettivo sull'uso di farmaci inotropi (compreso il Levosimendan) nei pazienti con FC sottoposti a trapianto. 74 pazienti con FC sono stati inclusi, il 50% ha avuto bisogno di inotropi per disfunzione cardiaca post operatoria, e 11 sono stati trattati con Levosimendan. I pazienti trattati con inotropi hanno avuto un maggiore uso di circolazione extracorporea e una degenza ospedaliera più lunga. Il Levosimendan ha avuto effetti comparabili ad altri inotropi, senza complicanze aggiunte.

## Conclusioni

Abbiamo documentato come i pazienti con FC hanno una alterazione importante dello strain del ventricolo destro, e – per la prima volta in letteratura – come il Levosimendan sia sicuro nei pazienti con FC. Lo studio in corso permetterà di valutare l'impatto dell'alterazione dello strain sul decorso operatorio e postoperatorio, e valuterà l'efficacia del Levosimendan nel migliorarlo.



**Gianluca Serafini**

Department of Neuroscience, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINO-GMI), Section of Psychiatry, University of Genoa, Italy  
**(FFC#21/2021, ongoing)**

**Background and rationale**

*The advances in care for cystic fibrosis (CF) have improved life perspectives, but today CF is still a life limiting condition and it follows that depression and anxiety are among the most frequent conditions reported in CF. Temperament is a potential risk factor for disorders of the mood and anxiety. Furthermore, personality traits and the attachment styles can influence the course of underlying psychiatric or medical conditions.*

**Hypothesis and objectives**

*The research hypothesis is that temperament, personality and attachment styles allow to identify patients more at risk related to the clinical treatment. The aims are to investigate: temperamental characteristics that contribute to developing mood and anxiety disorders in CF patients; the role of personality and attachment styles towards the medication adherence; the impact of illness perception and dissociative symptoms on the clinical course and treatment.*

**Essential methods**

*A study composed of two phase has been planned. 65 patients from the age of 14 y.o. have been enrolled and parents of adolescent patients (14 to 17 y.o.). After a psychological assessment, validated psychological tests have been administered; some of them will be re-administered for a reassessment after 12 months.*

**Preliminary results**

*It has been found that patients present a predominant temperament (hyperthymic) characterized by a positive mood, followed by a temperament depressive and anxious, confirmed by 60.1% of patients with anxiety and 42.1% of them with depression. Parents of adolescent patients reported the same predominant temperaments with similar anxiety (60%) and depression (40%). A predominant anxious/ambivalent attachment style has been found for patients. The personality tests highlighted social difficulties, negative emotions experienced, propension to anger in the patients; suicidal thoughts, social problems and negative emotions also for parents of adolescent patients. Patients reported high perception of their disease with intermediate adherence to therapies. Finally, in relation to dissociative symptoms a low percentage (6.2%) of patients reported high levels of dissociation and no parent referred dissociative symptoms.*

**Conclusions**

*Data found will be better evaluated in the second phase of the study to investigate the evolutions of the psychological factors analyzed to identify patients at risk of developing psychopathological conditions, in order to support a person-centered care.*

**Razionale dello studio**

I progressi nella cura della fibrosi cistica (FC) hanno migliorato le prospettive di vita, ma oggi la FC è ancora una condizione invalidante e depressione e ansia sono tra le condizioni più frequenti riportate nella malattia. Il temperamento è un potenziale fattore di rischio per disturbi dell'umore e ansia. Inoltre, i tratti della personalità e gli stili di attaccamento possono influenzare il decorso di condizioni psichiatriche o mediche sottostanti.

**Ipotesi e obiettivi**

L'ipotesi di ricerca è che temperamento, personalità e stili di attaccamento consentano di identificare pazienti più a rischio relativamente al trattamento clinico. Gli obiettivi sono di indagare: le caratteristiche temperamentali che contribuiscono allo sviluppo di disturbi dell'umore e d'ansia nei pazienti con FC; il ruolo della personalità e degli stili di attaccamento nei confronti dell'aderenza alle terapie; l'impatto della percezione della malattia e dei sintomi dissociativi sul decorso clinico e sul trattamento.

**Metodi**

È stato pianificato uno studio articolato in due fasi. Sono stati arruolati 65 pazienti dall'età di 14 anni e genitori di pazienti (dai 14 ai 17 anni); sono stati somministrati test psicologici validati, alcuni dei quali verranno ri-somministrati per una rivalutazione dopo 12 mesi.

**Risultati preliminari**

È stato riscontrato che i pazienti presentano un temperamento predominante (ipertimico) caratterizzato da umore positivo, seguito da un temperamento depressivo e ansioso, dato confermato dal 60,1% di pazienti con ansia e dal 42,1% con depressione. È stato riscontrato uno stile di attaccamento predominante di tipo ansioso/ambivalente nei pazienti. Si confermano gli stessi risultati per i genitori dei pazienti adolescenti. I test di personalità hanno evidenziato nei pazienti difficoltà sociali, emozioni negative vissute, propensione alla rabbia; pensieri suicidari, problemi sociali ed emozioni negative anche per i genitori. I pazienti hanno riportato un'elevata percezione della loro malattia con un'aderenza intermedia alle terapie. Infine, una bassa percentuale (6,2%) di pazienti ha riportato alti livelli di dissociazione e nessun genitore ha riferito sintomi dissociativi.

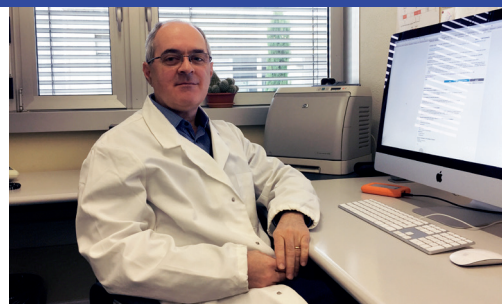
**Conclusioni**

I dati riscontrati saranno meglio valutati nella seconda fase dello studio per indagare le evoluzioni dei fattori psicologici analizzati, per identificare i pazienti a rischio di sviluppare condizioni psicopatologiche, al fine di supportare una cura centrata sulla persona.



Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test: validation phase

Attivazione integrinica monocitaria come test di valutazione di farmaci per la fibrosi cistica - fase di validazione



Carlo Laudanna

15

### Carlo Laudanna

Department of Medicine, Division of General Pathology, University of Verona, Italy  
(FFC#7/2021, concluded)

#### Background and rationale

Monocytes from patients with cystic fibrosis (CF) show an activation defect of the  $\beta 2$ -integrin LFA-1. CF, therefore, is identified with a leukocyte adhesion deficiency disease (LAD-IV). Pharmacological correction of CFTR can correct the integrin activation defect. The recovery of integrin activation in monocytes can potentially be used to monitor CF patients on a therapeutic regimen.

#### Hypothesis and objectives

Correction of CFTR function with specific drugs restores LFA-1 function in CF monocytes *in vitro*. The analysis of LFA-1 activation indicates the recovery of CFTR activity and can be applied to monitor / predict the effectiveness of drugs that correct CFTR.

#### Essential methods

Monocytes isolated from peripheral blood of CF patients, before and during treatment with Kaftrio or Symkevi tested, upon chemoattractant stimulation, for the recovery of the activation of LFA-1, measured with monoclonal antibody specific for low-intermediate affinity, and of adhesion to ICAM-1.

#### Results

We analyzed 35 patients treated with Kaftrio or Symkevi. The results show that in 22 (76%) of 29 patients treated with Kaftrio, and in 5 (83%) of 6 patients treated with Symkevi, the therapy restored LFA-1 activation in monocytes, assessed as increased affinity and adhesion (mean increase = 143% and 55%, respectively). Furthermore, in the presence of recovery of LFA-1 activity, there is an average increase of 26% in respiratory capacity (FEV1) and an average reduction of 59% in the concentration of chlorine in sweat.

#### Conclusions

The data show that Kaftrio and Symkevi can correct LFA-1 activation and adhesion defects in CF monocytes. Notably, considering the identification of cystic fibrosis as a monocyte-selective leukocyte adhesion defect disease (LAD-IV), the data represent the first example of pharmacological correction of a LAD phenotype. Furthermore, in most patients treated with Kaftrio (76%) or Symkevi (83%) there is a correspondence between an increase in integrin function and an improvement in clinical parameters, measured as increase in FEV1 and reduction in the concentration of chlorine in sweat. The data, therefore, suggest that measurement of integrin activation can be used as a novel test to monitor CF patients on a therapeutic regimen.

#### Razionale dello studio

I monociti di pazienti con fibrosi cistica (FC) manifestano un difetto di attivazione della  $\beta 2$  integrina LFA-1. La FC, quindi, si identifica con una malattia da deficit di adesione leucocitaria (LAD-IV). La correzione farmacologica di CFTR può correggere il difetto di attivazione integrinica. Il recupero dell'attivazione integrinica nei monociti può essere potenzialmente usato per monitorare i pazienti CF in regime terapeutico.

#### Ipotesi e obiettivi

La correzione della funzione di CFTR con specifici farmaci ripristina *in vitro* la funzione di LFA-1 in monociti FC. L'analisi dell'attivazione di LFA-1 può indicare il recupero dell'attività di CFTR e può essere applicata per monitorare/predire l'efficacia dei farmaci che correggono CFTR.

#### Metodi

Monociti isolati da sangue periferico di pazienti con FC, prima e durante trattamento con il Kaftrio o il Symkevi, sono stati testati, dopo stimolo da fattore chemiotattico, per il recupero dello stato d'attivazione di LFA-1, misurato con anticorpo monoclonale specifico per bassa-intermedia affinità, e dell'adesione a ICAM-1.

#### Risultati

Abbiamo analizzato 35 pazienti trattati con il Kaftrio o il Symkevi. I risultati mostrano che in 22 (76%) pazienti su 29 trattati con il Kaftrio e in 5 (83%) pazienti su 6 trattati con il Symkevi, la terapia ha ripristinato l'attivazione di LFA-1 nei monociti, valutata come aumento di affinità e adesione (aumento medio = 143% e 55%, rispettivamente). Inoltre, in presenza di recupero dell'attività di LFA-1, si osserva aumento medio del 26% di capacità respiratoria (FEV1) e riduzione media del 59% della concentrazione di cloro nel sudore.

#### Conclusioni

I dati mostrano che il Kaftrio e il Symkevi possono correggere i deficit di attivazione di LFA-1 e di adesione nei monociti C. Da notare che, alla luce della identificazione della fibrosi cistica come malattia da difetto di adesione dei leucociti selettiva per monociti (LAD-IV), i dati rappresentano il primo esempio di correzione farmacologica di un fenotipo LAD. Inoltre, nella maggioranza dei pazienti trattati con il Kaftrio (76%) o con il Symkevi (83%) si evidenzia una corrispondenza tra aumento della funzionalità integrinica e miglioramento dei parametri clinici, misurati come incremento di FEV1 e riduzione della concentrazione di cloro nel sudore. I dati, quindi, suggeriscono che la misurazione dello stato di attivazione integrinica può essere usata come nuovo test per monitorare i pazienti con FC in regime terapeutico.



Giovanni Morana

**Giovanni Morana**

Department of Radiology, Ca' Foncello Hospital, Treviso, Italy

(FFC#26/2019, concluded)

**Background and rationale**

*Chest magnetic resonance (MR) has been investigated over the last two decades as a radiation free alternative for chest computed tomography (CT), the gold standard for chest imaging. In fact, novel MR sequences are sufficiently robust to depict lung structure and to monitor structural abnormalities. Moreover, MR sequences based on water diffusion can detect lung inflammation, a feature that is usually investigated with positron emission tomography (PET). In addition, advanced post processing techniques, namely the Fourier Decomposition (FD), allow to calculate perfusion and ventilation maps without intravenous or gaseous contrast agents.*

**Hypothesis and objectives**

*FD could provide new outcomes measures to monitor Cystic Fibrosis Lung Disease (CFLD). However, before introducing FD in CFLD clinical practice, we need to validate this technique against standard as CT and with perfusion MR techniques (CEMR). The final goal of this validation plan is to develop an MR protocol that provides information about ventilation, inflammation, perfusion and structure (VIPS-MR) in a single examination of 30 minutes to monitor CFLD.*

**Essential methods**

*This prospective cross-sectional study involves 74 patients with CF, 7 of them with respiratory tract exacerbations (RTE). All of them will undergo both CT and MR scan on the same day; moreover, the second group will repeat the MR scan after medical treatment. All the scans will be anonymized and scored in random order. We will then compare the scores on ventilation maps obtained with FD with those on end expiratory CT, and the scores on perfusion maps obtained with FD with those on CEMR.*

**Results**

*Our preliminary results show that the image quality is good to excellent for the group of RTE patients; we evaluated the ability of MR sequence to depict bronchi, vessel, fissures, and presence/absence of artifacts. Moreover, by comparing different structural sequences, we got the same result as regards extension of pathology (i.e. bronchiectasis, mucus plugs, atelectasis).*

**Conclusions**

*We will extend this analysis to the whole group of patients. Moreover, we will perform FD analysis and compare the areas of impaired ventilation and perfusion on the maps with, respectively, areas of air trapping on end expiratory CT and low perfused areas on CE-MR. The validation of FD could be the first step for a patient and user-friendly protocol that allows monitoring of the VIPS features of the lung in patients with CFLD.*

**Razionale dello studio**

Negli ultimi vent'anni, la risonanza magnetica (RM) al torace si è dimostrata essere un'alternativa priva di radiazioni ionizzanti alla tomografia computerizzata (TC), che è il gold standard per l'imaging del torace. Infatti, le sequenze RM sono sufficientemente robuste da permettere di valutare il parenchima polmonare e di valutare le anomalie strutturali. Inoltre, sequenze RM che si basano sulla diffusione dell'acqua permettono di studiare l'infiammazione, un reperto che viene solitamente investigato con la tomografia a emissione di protoni (PET). Infine, tecniche avanzate di post processing, come la *Fourier Decomposition* (FD), permettono di calcolare mappe di perfusione e ventilazione senza l'uso di mezzi di contrasto endovenosi o gassosi.

**Ipotesi e obiettivi**

La FD può fornire nuovi risultati per valutare l'evoluzione della fibrosi cistica (FC). Tuttavia, prima di introdurre la FD nella pratica clinica, è necessario valutare questa tecnica confrontandola con gli standard dati dalla TC e dalla RM con mezzo di contrasto (CERM). Il nostro obiettivo è sviluppare una piattaforma RM che permetta di valutare ventilazione, infiammazione, perfusione e struttura (VIPS) del polmone in un unico esame della durata di 30 minuti per monitorare la FC.

**Metodi**

Questo studio trasversale ha incluso 74 pazienti, 7 dei quali con esacerbazioni polmonari (RTE). Tutti i pazienti sono stati sottoposti all'esame TC e RM nello stesso giorno: inoltre, il secondo gruppo ha ripetuto la RM dopo il trattamento medico delle RTE. Tutte le immagini sono state anonimizzate e verranno valutate in ordine casuale. I punteggi dati alle mappe di ventilazione ottenute con FD verranno confrontati con quelli dati alle TC a fine espirio, i punteggi sulle mappe di perfusione ottenute con FD verranno confrontati con quelli dati alla CERM.

**Risultati**

I nostri risultati preliminari mostrano qualità d'immagine da buona a eccellente per il gruppo dei pazienti con RTE; in particolare, è stata valutata l'abilità delle sequenze RM di rappresentare bronchi, vasi, scissure, e la presenza/assenza di artefatti. Inoltre, confrontando differenti sequenze anatomiche, abbiamo ottenuto gli stessi risultati per quanto riguarda l'estensione della malattia (bronchiectasie, tappi di muco, atelettasie).

**Conclusioni**

Estenderemo l'analisi finora fatta all'intero gruppo di pazienti coinvolti nello studio. Inoltre, completeremo l'analisi FD e confronteremo le aree di ventilazione e perfusione compromessa nelle mappe con, rispettivamente, le aree di intrappolamento aereo nella TC a fine espirazione e le aree ipoperfuse in CERM. La validazione della FD potrebbe essere il primo passo per la creazione di un protocollo per lo studio VIPS in pazienti con FC, che sia facilmente gestibile sia per i pazienti che per gli operatori.



**Vito Terlizzi<sup>1</sup>, Laura Elisabetta Claut<sup>2</sup>, Antonella Tosco<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Cystic Fibrosis Center, Department of Pediatric Medicine, Anna Meyer Children's University, Florence, Italy - <sup>2</sup> Cystic Fibrosis Regional Reference Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy  
<sup>3</sup> Pediatric Unit, Department of Translational Medical Sciences, Cystic Fibrosis Regional Reference Center, University of Naples Federico II, Italy (FFC#24/2020, ongoing)

**Background and rationale**

A high frequency of CFSPID infants has been recently reported in the Italian population. However, clinical data and outcomes after a longer follow-up are missing.

**Hypothesis and objectives**

(i) Continue data collection in CFSPID subjects or progressed to CFTR Related disorder (CFTR-RD) or CF, enrolled in the completed FFC#30/2018 project; (ii) Evaluate the clinical characteristics and outcomes of CFSPID after a longer follow-up.

**Essential methods**

The monitor went to the clinical centers involved in the project (Florence, Naples, Milan, Brescia, Ancona), to collect clinical data, up to December 2021. In particular, the trend of the sweat test, the percentage of definitive diagnoses and the development of complications were evaluated.

**Preliminary results**

311 subjects born from January 2011 to December 2019 were enrolled (286 CFSPID, 7 CFTR-RD, 18 CF). Eighty-four subjects (27%) were lost to follow-up, presenting a mean follow-up of 1.8 years (1 month - 72 years); among them 43 CFSPID subjects were excluded, since the observation period was less than 18 months. Finally, 268 subjects were included in the study (243 CFSPID, 7 CFTR-RD, 18 FC). At the end of observation period, 30 (11.1%) CFSPID received a definitive diagnosis (10 CF, 10 healthy carriers, one healthy subject) or a CFTR-RD label (9 subjects), so that a total of 28 CF (10.4%) and 16 CFTR-RD (6%) was reported. After a mean follow-up period of 4.9 years (range: 1.5 - 10.5), 213 (79.5%, mean age at the end of the observation period: 5.1 years, range: 1.6- 10.6) still resulted in CFSPID. The 9 subjects labeled as CFTR-RD (3.7%, mean age at the end of observation period: 7.2 years, range: 3.1-9.3) had a mono-organ involvement (bronchiectasis, sinusitis, pancreatitis, dehydration). The 10 CFSPID who progressed to a CF diagnosis (4.1%; mean age at end of observation period: 4.8 years, range: 1.2-10.3; age at CF diagnosis: 4.8 years, range: 1.2-10.3) had at least one pathological sweat test in 7 cases and related CF symptoms in 3 cases. About the 7 CFTR-RD, 2 evolved in CF due to multiorgan symptoms (5.8 and 71 years). Spirometry was available in 50 CFSPID, 3 CFTR-RD and 14 CF, showing a mean Forced Expiratory Volume in the 1st second (FEV1) value in the normal range (> 100%).

**Conclusions**

Our data confirm that a minority of CFSPID subjects progressed to disease after a longer follow-up, rarely in the presence of symptoms and with a normal lung function in school age. A large percentage of subjects are lost to follow-up.

**Razionale dello studio**

Ottenere informazioni sul quadro clinico e sulla gestione di bambini CFSPID dopo un prolungato follow-up.

**Ipotesi e obiettivi**

(i) Proseguire la raccolta dati nei soggetti CFSPID, nati dal 01.01.2011 al 31.08.2018, o con successiva diagnosi di patologia CFTR correlata (CFTR-RD) o fibrosi cistica (FFC#30/2018); (ii) Valutare le caratteristiche cliniche e l'evoluzione dopo un prolungato follow-up.

**Metodi**

Il monitor si è recato nei centri di cura coinvolti nel progetto (Firenze, Napoli, Milano, Brescia, Ancona) al fine di raccogliere i dati clinici. Sono state valutate in particolare l'andamento del test del sudore (TS), la percentuale di diagnosi definitive e lo sviluppo di complicanze al 31.12.2021.

**Risultati preliminari**

Nello studio sono stati reclutati 311 soggetti: 286 CFSPID, 7 CFTR-RD e 18 FC. Ottantaquattro soggetti (27%) risultavano persi al follow-up, presentando un periodo di osservazione medio di 1,8 anni (1 mese - 72 anni); tra essi, 43 CFSPID venivano esclusi dallo studio, essendo il periodo di osservazione inferiore ai 18 mesi. Venivano pertanto inclusi nello studio 268 soggetti (243 CFSPID, 7 CFTR-RD, 18 FC). Al termine dell'osservazione, 30 (11,1%) CFSPID ricevevano una diagnosi definitiva (10 FC, 10 portatori sani, un soggetto sano) o una etichetta di CFTR-RD (9 soggetti), così che risultavano in totale 28 FC (10,4%) e 16 CFTR-RD (6%). Dopo un periodo medio di follow-up di 4,9 anni (range: 1,5 - 10,5), 213 (79,5%, età media al termine del periodo di osservazione: 5,1 anni, range: 1,6-10,6) risultavano ancora CFSPID. I 9 CFTR-RD (3,7%, età media al termine dell'osservazione: 7,2 anni, range: 3,1-9,3) presentavano un interessamento mono-organo (bronchiectasie, sinusite, pancreatite o disidratazione). I 10 CFSPID che hanno ricevuto diagnosi di FC (4,1%; età media al termine dell'osservazione: 4,8 anni, range: 1,2-10,3; età alla diagnosi di FC: 4,8 anni, range: 1,2-10,3) presentavano TS patologico in 7 casi e sintomi FC correlati in 3 casi. Tra i 7 CFTR-RD, 2 evolvevano in FC per sintomi multiorgano (5,8 e 71 anni). La spirometria era disponibile in 50 CFSPID, 3 CFTR-RD e 14 FC, evidenziando valori medi di FEV1 nel range della norma (> 100%).

**Conclusioni**

I nostri dati confermano che una minoranza di soggetti CFSPID evolve in malattia dopo un prolungato follow-up, raramente in presenza di sintomi e conservando una normale funzione polmonare in età scolare. Una cospicua percentuale di soggetti risulta persa al follow-up.

## 1 in 30 and You Don't Know It. A platform for a better comprehension of the cystic fibrosis carrier test

Castellani (top left) with Mario Negri research group

18



### Carlo Castellani

Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy

(1 in 30 and You Don't Know It, ongoing)

### Cinzia Colombo, Rita Banzi, Chiara Gerardi, Eleonora Allocati, Paola Mosconi, Emanuela Foglia, Lucrezia Ferrario, Francesca Romano

Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Milan, Italy

*Cystic fibrosis (CF) carrier screening aims to detect carrier adults to permit informed reproductive choices. Screening programs are active in Israel and Australia; UK, the Netherlands and Italy run pilot programs. The Italian National Health Service (NHS) does not offer a screening program to the general population.*

*To define the impacts of offering the CF carrier screening to the general prenatal and pre-conceptional population, the general population, assuming the Italian NHS perspective, compared to the current situation, where such procedure is offered only to high-risk individuals to give birth to a CF child.*

*A Health Technology Assessment was conducted, based on the EUnetHTA Core model dimensions: CF epidemiological aspects, and current offer of carrier testing; tests' characteristics; efficacy and safety indicators; economic and organizational dimensions; ethical, social, and legal aspects. Different data sources were used: (i) a systematic literature review to define efficacy and safety; (ii) health-economics tools useful for the clinical pathway economic evaluation, the budget impact analysis, and for the definition of the organizational and accessibility impacts; (iii) qualitative approach through questionnaires and interviews, exploring perspectives of healthcare professionals, persons with CF, families and general population.*

*The systematic review included 71 articles – three reviews, 11 comparative cohort studies, 29 single-arm cohort studies, and six model studies (median publication date 1998). Heterogeneity, methodological weaknesses, and limited transferability of results affect our ability to draw conclusions on the effectiveness of CF carrier screening. The economic analysis hypothesizes to offer the CF carrier screening to women between 18 and 50 years, considering a prenatal and a pre-conceptional phase. Despite the economic and organizational sustainability need, a return on investment up to six years from the screening's introduction emerged. The healthcare professionals (N=24) declared a higher acceptability of the screening. Persons with CF (N=9), parents (N=6) and persons from the general population (N=7) were mainly in favor, with greater perceived social and ethical impacts.*

*The final HTA results will be discussed with a multidisciplinary group and disseminated to different stakeholders.*

Lo screening del portatore sano di fibrosi cistica (FC) mira a identificare i portatori delle mutazioni causanti FC per poter fare scelte riproduttive informate. In alcuni paesi, non in Italia, sono attivi programmi di screening per la popolazione generale.

Questo progetto di valutazione sanitaria (Health Technology Assessment, HTA) mira a definire l'impatto dell'offerta di screening del portatore sano di FC alla popolazione generale prenatale e pre-concezionale, confrontandolo con l'attuale situazione di offerta alla popolazione con familiarità a maggior rischio di essere portatore.

L'HTA è stato condotto seguendo il modello EUnetHTA, che include diverse dimensioni: epidemiologia della CF, offerta attuale, caratteristiche del test, efficacia e sicurezza, aspetti economici, organizzativi, etici, sociali e legali. Sono state usate diverse fonti dati: (i) revisione sistematica della letteratura per efficacia e sicurezza; (ii) strumenti di economia sanitaria, budget impact per impatto economico, organizzativo, accessibilità; (iii) approcci qualitativi (interviste e questionari) a professionisti sanitari, persone con FC e familiari, popolazioni generale.

La revisione sistematica ha incluso 71 articoli–tre revisioni, 11 studi di coorte comparativi, 29 a braccio singolo, sei modelli (mediana di pubblicazione 1998). L'eterogeneità, problematiche metodologiche, limitata trasferibilità dei risultati non permettono conclusioni definitive sull'efficacia dello screening. L'analisi economica ha ipotizzato l'offerta del test a donne tra 18 e 50 anni in fase pre-concezionale e prenatale. Malgrado un iniziale sforzo in termini economici e organizzativi, il rientro sull'investimento sarebbe garantito dopo sei anni dall'introduzione dello screening. I professionisti sanitari (N=24) riportano una buona accettabilità del test. Persone con FC (N=9), genitori (N=6) e popolazione generale (N=7) sono tendenzialmente favorevoli, percependo un importante impatto etico e sociale

I risultati finali dell'HTA saranno discussi con il gruppo multidisciplinare del progetto e disseminati a diversi gruppi portatori di interesse.

Health technology assessment of the cystic fibrosis carrier screening

Health technology assessment dello screening del portatore sano di fibrosi cistica

A

Background and rationale

Hypothesis and objectives

Essential methods

Preliminary results

Conclusions

Razionale dello studio

Ipotesi e obiettivi

Metodi

Risultati

Conclusioni



From the left, Chiara Di Lucente, Francesca Memini, Giulia Candiani

## B

### Giulia Candiani, Chiara Di Lucente, Francesca Memini

Zadig Communication Agency, Milan, Italy

#### Background and rationale

*Introducing carrier testing for cystic fibrosis (CF) means promoting a conscious choice of parenting. This study aims to investigate the main issues, limits and needs of communication related to carrier testing in the general population, as well as the impact and satisfaction of a website and a communication campaign users.*

#### Hypothesis and objectives

*A website built according to health decision support aids can be a particularly useful tool for communication between health practitioners and patients, increasing CF and carrier testing awareness even among those who do not have known cases in their families.*

#### Essential methods

*The contents, the narrative format and the textual and visual languages of the website have been defined through the analysis of the scientific literature, as well as a continuous dialogue with the Scientific Direction of Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (FFC Ricerca). To assess the impact and satisfaction of the users, 14 semi-structured interviews, a chat conversation (10 participants) and a mini-focus group (sample 3) on a sample of people of childbearing age were carried out, prior to the launch of the website. In addition, to prove that the campaign message was aligned with the institutional communication assets, a workshop was held with FFC Ricerca staff.*

#### Preliminary results

*A qualitative analysis of the interviews identified the main themes and sub-themes (sources of reliable information, people's attitude towards decisions, decision-making criteria, features of medical information). All participants found it useful to receive information on both carrier testing and the potential decisions, respecting individual motivations, depending on the result, and they appreciated the main features of the website. From these results we elaborated 4 personas which represented the ideal types of target users who will lead the communication campaign: the informed young woman, the fatalistic mother, the conscientious future father, the mother of a child with CF without cases in the family.*

#### Conclusions

*The website has been adapted to better respond to user preferences, and a launch campaign based on the 4 personas has been set up. The interviewees' preferences and the workshop with FFC Ricerca staff revealed the need to deepen the knowledge of the target group of practitioners, particularly of gynaecologists, in order to broaden the information campaign and to consider a suitable training proposal.*

#### Razionale dello studio

Far conoscere il test che identifica i portatori sani di fibrosi cistica (FC) significa permettere una scelta di genitorialità consapevole. Il presente studio vuole indagare i principali temi, limiti ed esigenze relative alla comunicazione del test del portatore sano alla popolazione generale, oltre che l'impatto e il gradimento degli utenti di un sito e di una campagna di comunicazione.

#### Ipotesi e obiettivi

Un sito internet ispirato agli strumenti di supporto alle decisioni di salute può essere uno strumento particolarmente utile nella comunicazione tra medico e paziente, con lo scopo di aumentare l'awareness della malattia e del test del portatore anche tra chi non ha casi noti in famiglia.

#### Metodi

I contenuti, il format narrativo e lo stile dei linguaggi testuali e visivi del sito sono stati definiti attraverso l'analisi della letteratura scientifica e uno scambio ripetuto con la Direzione scientifica di FFC Ricerca. Per valutare l'impatto e il gradimento dell'utente, prima del lancio del sito, sono state svolte 14 interviste semistrutturate, una conversazione via chat (10 partecipanti) e un mini-focus group (campione 3), con un campione di convenienza di persone in età fertile.

Inoltre è stato svolto un workshop con il personale di Fondazione per verificare che il messaggio della campagna fosse allineato con gli asset della comunicazione istituzionale.

#### Risultati preliminari

Attraverso un'analisi qualitativa delle interviste, sono stati sintetizzati i principali temi e sottotemi (fonti di informazione fidata, atteggiamento di fronte alle decisioni, criteri decisionali, caratteristiche dell'informazione medica).

Tutte le tipologie di utenti hanno ritenuto utile ricevere informazioni sul test e sulle scelte possibili a seconda del risultato, rispettando le motivazioni individuali e hanno apprezzato le caratteristiche del sito. Dai risultati sono state elaborate 4 personas, idealtipi di utenti target, che guideranno la declinazione della campagna: la giovane donna informata, la madre fatalista, il futuro padre coscienzioso, la madre di bambino con FC senza casi in famiglia.

#### Conclusioni

Il sito internet è stato riadattato per rispondere meglio alle preferenze degli utenti ed è stata impostata una campagna di lancio sulla base delle personas.

Dalle preferenze degli intervistati e dal workshop con il personale di Fondazione è emersa l'esigenza di approfondire la conoscenza del target dei medici, in particolare ginecologi, per estendere la campagna informativa e valutare una proposta formativa adeguata.

Oxidative stress and autophagy in cystic fibrosis: novel biochemical characterizations and drug discovery approaches

Stress ossidativo e autofagia in fibrosi cistica: nuovi approcci biochimici e di individuazione di farmaci



On the left, Giorgio Cozza (in the middle) with his collaborators. On the right, Federica Rossin (2nd from the left) with her collaborators

19

**Ilaria Artusi<sup>1</sup>, Michela Rubin<sup>1</sup>, Angela Menna<sup>1</sup>, Andrea Venerando<sup>2</sup>, Valentina Bosello Travain<sup>1</sup>, Carlo Abbate<sup>3</sup>, Valeria Raia<sup>4</sup>, Mauro Piacentini<sup>3</sup>, Federica Rossin<sup>3</sup>, Giorgio Cozza<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Molecular Medicine, University of Padua, Italy - <sup>2</sup> Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Italy - <sup>3</sup> Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy - <sup>4</sup> Department of Translational medical sciences, University of Naples Federico II, Regional Cystic Fibrosis Care Unit, Italy (FFC#4/2021, ongoing)

### Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is a life-shortening genetic disorder, caused by mutations of the ion channel CFTR. The most common F508del mutant is unable to traffic to and reside at the plasma membrane (PM). Current therapy (Kaftrio) is addressed to an extremely limited number of CFTR mutations including F508del, consequently the search for new therapeutic proposals in CF is still urgent. Our alternative approach aims at targeting the derailed CF intracellular environment, through a combination of drugs able to affect specific molecular targets linked to oxidative stress and autophagy.

### Hypothesis and objectives

We aim to (i) refine new targets as a novel therapeutic strategy in CF by exploiting a network of *in silico* and experimental approaches; (ii) validate the efficacy of novel drug candidates in pre-clinical CF models. Our goal is to investigate the oxidative and autophagic imbalance in CF in order to identify a pharmacological strategy capable of reinstate the normal condition and recover the mutated CFTR.

### Essential methods

We used: (i) *in silico* approaches to identify novel chemical entities able to interact with new targets; (ii) *in vitro* and *in cell* methodologies to validate the best candidates from (i); (iii) *in vivo* validation into appropriate mouse models.

### Preliminary results

We have preliminarily identified: (i) molecules able to target specific radicals involved in the pro-oxidative state of CF models; (ii) compounds able to enhance Nrf2 activity and increase glutathione intracellular level; (iii) modulators of cGAS-cGAMP-STING pathway, able to downregulate TBK1-mediated p62 phosphorylation and consequently CFTR degradation. Most of the identified molecules are effective in rescuing F508del-CFTR at the PM of CFBE41o- cells.

### Conclusions

These preliminary and encouraging results reveal that: (i) the three actors of our research are part of the same show and consequently the combination of the identified active molecules represents a pathway to be pursued; (ii) being our strategy not directed against the mutated CFTR, it has the potential to be translated to other mutations where no effective therapies are actually available; (iii) at the same time our proposal can be considered complementary to the therapeutic approach currently in clinical use, potentially enhancing its effects.

### Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica a prognosi infausta, causata da mutazioni del canale del cloro CFTR. Il mutante più comune F508del non è in grado di transitare e risiedere sulla membrana plasmatica (MP). L'attuale terapia (Kaftrio) è indirizzata a un numero estremamente limitato di mutazioni a carico del CFTR tra cui F508del, di conseguenza è ancora urgente la ricerca di nuove proposte terapeutiche nella FC. Il nostro approccio alternativo mira a prendere in considerazione l'ambiente intracellulare difettoso in modelli FC, attraverso una combinazione di farmaci in grado di influenzare specifici bersagli molecolari legati allo stress ossidativo e all'autofagia.

### Ipotesi e obiettivi

Ci proponiamo di (i) individuare nuovi target cellulari come nuovi bersagli terapeutici in FC, sfruttando una rete di approcci sperimentali e *in silico*; (ii) validare l'efficacia di nuovi potenziali farmaci nei modelli preclinici di FC. Il nostro principale obiettivo è studiare lo squilibrio ossidativo e autofagico nella FC al fine di identificare una strategia farmacologica in grado di ripristinare la condizione normale e recuperare il CFTR mutato.

### Metodi

Abbiamo usato: (i) approcci *in silico* per identificare nuove entità chimiche in grado di interagire con i nuovi target identificati; (ii) metodologie *in vitro* e in cellula per validare i migliori candidati da (i); (iii) validazione *in vivo* in modelli di topo appropriati.

### Risultati preliminari

Abbiamo preliminarmente identificato: (i) molecole in grado di mirare a specifici radicali dell'ossigeno coinvolti nello stato pro-ossidativo dei modelli FC; (ii) composti in grado di potenziare l'attività di Nrf2 e aumentare il livello intracellulare di glutazione; (iii) modulatori della via cGAS-cGAMP-STING, in grado di diminuire la fosforilazione di p62 mediata da TBK1 e di conseguenza la degradazione del CFTR. Le molecole identificate sono risultate efficaci nel recuperare CFTR con F508del in MP di cellule CFBE41o-.

### Conclusioni

Questi risultati preliminari rivelano che: (i) i target cellulari individuati sono in qualche modo collegati e, di conseguenza, la combinazione delle molecole più promettenti rappresenta un percorso da perseguire; (ii) essendo la nostra strategia non diretta contro la CFTR mutata, ha il potenziale per essere trasferita ad altre mutazioni contro le quali non sono disponibili terapie efficaci; (iii) allo stesso tempo la nostra proposta può essere considerata anche complementare all'approccio terapeutico attualmente in uso clinico, dato che potrebbe potenziarne l'efficacia.

Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis

Effetto di stimoli infiammatori sul trasporto ionico epiteliale in fibrosi cistica



Luis J. Galietta (in the middle) with his collaborators

20

**Daniela Guidone, Martina Buccirosi, Anna Borrelli, Arianna Venturini, Michele Genovese, Mario Renda, Luis J. V. Galietta**

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

(FFC#9/2022, new)

### Background and rationale

*Inflammation is a hallmark of cystic fibrosis (CF) lung disease. The loss of CFTR function impairs innate defense mechanisms, thus paving the way to bacterial colonization and development of a persistent inflammatory state. Present correctors and potentiators efficiently rescue mutant CFTR function but bacterial infection remains. This situation is worse with patients carrying undruggable mutations who cannot benefit from CFTR modulators.*

### Hypothesis and objectives

*We hypothesize that inflammation, by altering ion transport properties, further disrupts mucociliary clearance. Our objective is to assess how inflammatory stimuli affect epithelial ion transport systems, with a special focus on ENaC and ATP12A, whose role in sodium absorption and proton secretion may have detrimental effects on airway surface properties.*

### Essential methods

*Differentiated bronchial epithelia generated on porous membranes (Snapwell and Transwell inserts) are studied with multiple functional and molecular methods: (i) short-circuit current recordings; (ii) pH-sensitive fluorescent probes; (iii) fluorescence recovery after photobleaching (FRAP); (iv) bulk and single-cell RNAseq.*

### Preliminary results

*Inflammatory stimuli significantly modify the epithelial transcriptome with marked changes in airway surface properties. In particular, stimuli associated with bacterial infection and neutrophil recruitment cause enhanced activity of ATP12A and hyperviscosity of apical epithelial surface. Experiments are in progress to assess the role of CFTR and of alternative ion channels and transporters.*

### Conclusions

*Our study will identify targets and mechanisms whose pharmacological modulation could contrast the negative effects of inflammatory conditions in the airways of CF patients. This approach will be useful as an adjuvant for patients that are treated with CFTR modulators and will be essential for the other CF patients who carry undruggable mutations.*

### Razionale dello studio

Il difetto di base nella fibrosi cistica (FC) è la perdita di funzione della proteina CFTR, che causa disidratazione della superficie delle vie aeree. Questa condizione favorisce l'infezione batterica. Nonostante l'efficacia dei modulatori farmacologici di CFTR, correttori e potenziatori, molti pazienti mostrano persistenza delle infezioni batteriche, che rappresentano quindi uno stimolo continuo di infiammazione. Tale situazione è ancora più marcata nei pazienti che portano mutazioni insensibili a correttori e potenziatori.

### Ipotesi e obiettivi

La nostra ipotesi è che l'infiammazione abbia effetti negativi sulle proprietà della superficie delle vie aeree. In effetti, i nostri risultati preliminari supportano questa ipotesi, suggerendo che l'infiammazione sia alla base di un circolo vizioso che peggiora le conseguenze della perdita di funzione di CFTR, generando uno stato disidratato e iperviscoso. Il nostro obiettivo è svelare i meccanismi attraverso i quali l'infiammazione altera i processi epiteliali con la conseguente identificazione di bersagli utili per un trattamento farmacologico.

### Metodi

Usiamo cellule epiteliali bronchiali di pazienti con FC e di soggetti di controllo per la generazione *in vitro* di epiteli altamente differenziati, in grado di riprodurre le proprietà del tessuto *in vivo*. Su questi epiteli effettuiamo esperimenti per misurare l'attività di CFTR e di altre proteine coinvolte nel trasporto ionico (ENaC, ATP12A), nonché per valutare le proprietà (pH, viscosità) della superficie degli epiteli.

### Risultati preliminari

Gli esperimenti finora effettuati confermano la capacità di stimoli infiammatori di modificare in maniera sostanziale gli epiteli, sia a livello molecolare che funzionale. In particolare, stimoli associati a infezioni batteriche provocano un aumento di attività di ATP12A e rendono la superficie degli epiteli molto più densa e disidratata. Sono in corso esperimenti per valutare il ruolo di CFTR e di altri trasportatori ionici.

### Conclusioni

I nostri risultati saranno importanti per l'identificazione di bersagli alternativi la cui modulazione farmacologica potrebbe correggere gli effetti negativi dell'infiammazione sulle proprietà della superficie degli epiteli. Questo approccio potrebbe essere particolarmente importante per i pazienti con FC con mutazioni insensibili a correttori e potenziatori.



Paolo Scudieri (in the middle) with his collaborators. Fabiana Ciciriello

**Giulia Gorrieri<sup>1</sup>, F Guida<sup>1</sup>, Iliaria Musante<sup>1</sup>, Federico Alghisi<sup>2</sup>, Carlo Viscomi<sup>2</sup>, Nicoleta Popa N, Serena Tamburro<sup>1</sup>, Alessandro Fiocchi<sup>2</sup>, Fabiana Ciciriello<sup>2</sup>, Paolo Scudieri<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> DINOEMI, University of Genoa, Italy - <sup>2</sup> UOC Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy - <sup>3</sup> UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy (FFC#11/2021, ongoing)

**Background and rationale**

Correction of cystic fibrosis (CF) abnormalities may be obtained by restoring the function of CFTR with mutation-specific treatments. A potentially alternative approach is to modulate the activity of other targets, such as TMEM16A, SLC26A9, SLC26A4, and/or ATP12A, in order to stimulate CFTR-independent anion secretion or inhibit acidification. This approach could be essential for CF patients expressing undruggable CFTR mutants but could also be useful as an adjuvant therapy supporting the effect of CFTR rescue maneuvers.

**Hypothesis and objectives**

Despite the increasing interest towards the above-mentioned alternative targets, their precise function and expression in the airways is largely unclear and sometimes controversial. For example, it is not clear if the function of TMEM16A or SLC26A4 needs to be inhibited or activated to improve mucociliary transport in CF. Also, despite its role as a modifier gene in CF lung disease, the contribution to epithelial homeostasis of SLC26A9 is largely unknown.

Our specific aims are: (i) to study the expression of alternative targets in CF and non-CF airways; (ii) to investigate the role of alternative targets in normal and CF airways; (ii) to develop tools and assays for therapeutic development.

**Essential methods**

We are evaluating the expression and function of selected alternative targets in ex vivo samples and advanced in vitro models of the epithelia lining large and small airways by means of spatial biology and imaging approaches.

**Preliminary results**

We have selected and validated different antibodies and probes specific for TMEM16A, SLC26A9, SLC26A4, and ATP12A. By means of immunofluorescence and RNAScope techniques, carried out on tissue microarrays of the airways, nasal cells collected by nasal brushings, and different in vitro models, we found ATP12A and SLC26A4 as the most expressed targets, particularly under inflammatory conditions (IL-4, IL-17&TNF $\alpha$ , bacterial components) and often co-expressed in club and mucus-producing cells. Lower and restricted expression was, instead, observed for TMEM16A and SLC26A9, with the latter showing an intriguing localization in pulmonary neuroendocrine cells.

**Conclusions**

We expect to select the best alternative targets based on their expression and function in the airways, and to develop tools and cell-based assays for future projects aimed at searching novel candidate therapies to compensate for CFTR deficiency.

**Razionale dello studio**

La fibrosi cistica (FC) è una grave malattia genetica causata da mutazioni nel gene CFTR. Il trattamento di questa patologia si può basare su farmaci che agiscono direttamente sulla proteina mutata, con lo scopo di ripristinarne la corretta funzione. Un approccio alternativo si potrebbe basare sulla modulazione di bersagli diversi dalla proteina CFTR mutata, con lo scopo di aumentare la secrezione anionica o inibire l'eccessiva acidificazione che si osserva nelle vie aeree dei pazienti con FC.

**Ipotesi e obiettivi**

Nonostante l'elevato interesse nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche rivolte a tutti i pazienti con FC, il ruolo preciso di potenziali bersagli alternativi è tuttora poco conosciuto e talvolta controverso. Per esempio, SLC26A9 è stato identificato come "gene modificatore" della patologia polmonare FC, ma la sua espressione nelle vie aeree è risultata molto bassa (quasi assente) in studi recenti. Inoltre, non è chiaro se la funzione di alcuni di questi bersagli alternativi debba essere bloccata o potenziata per compensare l'assenza di CFTR. Pertanto, l'obiettivo principale di questo progetto è lo studio dell'espressione e della funzione nelle vie aeree dei bersagli alternativi, in modo da poter sviluppare degli approcci terapeutici mirati.

**Metodi**

Il progetto prevede l'uso di diversi tipi di campioni, nativi e modelli *in vitro*, rappresentativi delle diverse regioni delle vie aeree, e l'applicazione di metodiche di imaging per studi di espressione e funzione.

**Risultati preliminari**

Abbiamo selezionato e validato diversi metodi per valutare precisamente l'espressione di TME-M16A, SLC26A9, SLC26A4 e ATP12A nelle diverse regioni delle vie aeree native e in diversi modelli *in vitro*. ATP12A e SLC26A4 sono risultati i più espressi, soprattutto in condizioni infiammatorie e spesso hanno mostrato co-espressione in cellule secernenti muco. TMEM16A e SLC26A9 risultano, invece, meno espressi, con il secondo che mostra una peculiare localizzazione limitata alle cellule polmonari neuroendocrine.

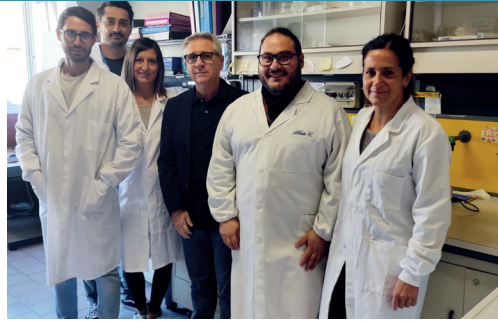
**Conclusioni**

Il nostro progetto potrà definire quali sono i migliori bersagli alternativi, la cui modulazione possa avere effetti benefici sulla patologia polmonare FC. Inoltre, verranno sviluppati modelli e saggi utili all'identificazione, in progetti futuri, di nuovi approcci terapeutici basati su bersagli diversi da CFTR, che potranno quindi essere potenzialmente utili per tutti i pazienti con FC.



Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis

Usare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica



Mauro Piacentini (in the middle) with his collaborators

### Mauro Piacentini<sup>1</sup>, Valeria Raia<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy - <sup>2</sup> Regional Pediatric Cystic Fibrosis Center, Department of Translational Medical Sciences, Section of Pediatrics, University of Naples Federico II, Italy  
(FFC#15/2020, concluded; FFC#8/2022, new)

#### Background and rationale

Bacterial infections play a pivotal role in infectious disease, such as cystic fibrosis (CF). Innate immunity is the first line of defense to fight microbial pathogens and the STING signaling 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). 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 in CF. We also found that TG2 could regulate the STING pathway, highlighting the implication of the enzyme in the host response to bacteria.

#### Hypothesis and objectives

The goal of this project was to dissect out the role of STING signaling in CF to find new possible targets to develop host-directed therapies. We aimed to elucidate the TG2-dependent regulation of STING pathway in CF mouse models infected with *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), correlating the infection outcome levels with alterations in STING signaling.

#### Essential methods

F508del mouse models have been employed to perform infections either *ex vivo* on bone marrow derived macrophages (BMDM) or *in vivo* on mice. STING and TG2 regulators have also been administered to modulate the STING signaling.

#### Preliminary results

We found that the STING pathway is inadequately activated in F508del condition and the use of direct STING agonists, such as 2', 3' cGAMP, is able to restore the immune response against bacterial colonization. Indeed, upon the treatment with the STING agonist in both BMDM and lung tissues, from F508del mice infected with Pa, we found a reduction of CFUs consequent to IFN- $\beta$  enhanced production. We also confirmed these results in primary PBMCs obtained from F508del patients. Our work indicates that the STING pathway integrity is crucial in the CF response against pathogens and that can be restored by the treatment with 2', 3' cGAMP.

#### Conclusions

The correct functioning of the STING pathway is fundamental in counteracting bacterial infections, especially of Pa. Therefore, the restoration of the pathway in CF could be exploited as a possible target for the treatment of the disease.

#### Appendix Project FFC#8/2022

We aim to extend the analysis of STING pathway in CF patients and verify if the alterations, observed for the F508del model, could be also associated with other CFTR mutations. Moreover, we want to use STING agonists on human CF samples to corroborate our findings on the mouse model.

#### Razionale dello studio

Le infezioni batteriche svolgono un ruolo fondamentale nelle malattie infettive, come la fibrosi cistica (FC). L'immunità innata è la prima linea di difesa per combattere i patogeni e la via di segnalazione di STING innesca la risposta immunitaria alle infezioni. STING si attiva in caso di infezione batterica e svolge un ruolo importante nell'induzione dell'interferone di tipo I (IFN1). Abbiamo recentemente dimostrato che l'inibizione genetica e farmacologica della Transglutaminasi 2 (TG2), un enzima multifunzionale che catalizza le modificazioni post-traduzionali delle proteine, si traduce in una maggiore risposta antimicrobica nella FC. Abbiamo inoltre scoperto che la TG2 potrebbe regolare la via di segnalazione di STING, evidenziando l'implicazione dell'enzima nella risposta dell'ospite ai batteri.

#### Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo di questo progetto era analizzare il ruolo della via di STING nella FC per trovare nuovi possibili bersagli per lo sviluppo di terapie specifiche. Inoltre, chiarire come la TG2 regolasse STING in modelli di topo FC infettati con *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), correlando i livelli dell'infezione con le alterazioni nella segnalazione di STING.

#### Metodi

Modelli di topo F508del sono stati impiegati per eseguire infezioni *ex vivo* sui macrofagi derivati dal midollo osseo (BMDM) o *in vivo* sui topi. Sono stati inoltre somministrati regolatori di STING e della TG2.

#### Risultati preliminari

Abbiamo scoperto che la via di STING non è attiva nella condizione F508del e l'uso di agonisti diretti di STING, come il 2', 3' cGAMP, è in grado di ripristinare la risposta immunitaria contro la colonizzazione batterica. Infatti, il trattamento con l'agonista, sia nei BMDM che nei tessuti polmonari da topi F508del infettati con Pa, determina una riduzione delle CFU (numero di cellule batteriche) conseguente all'aumento della produzione di IFN- $\beta$ . Abbiamo confermato questi risultati anche in PBMC primari ottenuti da pazienti F508del. Il nostro lavoro indica che l'integrità di STING è cruciale nella risposta della FC contro i patogeni e che può essere ripristinata dal trattamento con il 2', 3' cGAMP.

#### Conclusioni

Il corretto funzionamento della via di STING è fondamentale per contrastare le infezioni batteriche, in particolare Pa. Pertanto, il ripristino di STING nella FC potrebbe essere sfruttato come possibile obiettivo per il trattamento della malattia.

#### Appendice Progetto FFC#8/2022

Ci proponiamo di estendere l'analisi della via di STING nei pazienti con FC e verificare se le alterazioni, osservate per il modello F508del, possono essere associate anche ad altre mutazioni di CFTR. Inoltre, vogliamo usare agonisti di STING su campioni di FC umani per corroborare i nostri risultati sul modello di topo.

# Anti-inflammatory approaches in cystic fibrosis

Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis

Inibire il meccanismo di attivazione piastrinica come strategia per spegnere l'infiammazione polmonare in fibrosi cistica



Domenico Mattoscio (in the middle) with his collaborators

23

## Domenico Mattoscio

Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science, University "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Chieti, Italy

(FFC#11/2022, new)

### Background and rationale

This research aims to identify innovative strategies to contain the inflammation-based pathology in cystic fibrosis (CF). This is paramount since, despite advancement in treatments, excessive inflammation and failure in resolution are the primary cause of morbidity and death in CF.

Platelets (PLT) sustain chronic inflammation and dampen resolution in CF, indicating that innovative approaches to revert the PLT-based pathology are of interest. Accruing evidence signifies that pro-resolving lipid mediators (SPM) could modulate PLT activities.

### Hypothesis and objectives

The overarching hypothesis of the proposed research is that reduction of the PLT-mediated inflammation by SPM could be beneficial in CF. To address this, two specific aims will be pursued: 1) to characterize how pro-resolving mediators dampen PLT activation; 2) to understand how PLT modulation alters inflammation and immunity. In Aim 1, using chronically infected CFTR KO mice, we will establish how selected SPM modulate PLT to restore a balanced lung inflammation and immune response.

In Aim 2, exploiting mice with PLT-specific CFTR deletion and blood cells from CF volunteers, we will dissect how CF PLT drive altered inflammation and immunity.

### Essential methods

Mouse models of CF chronically infected with *P. aeruginosa*, primary cells from CF volunteers, microbiology techniques, multicolor flow cytometry, immunohistochemistry, multiplex cytokine assays, lipidomic, and single-cell RNA sequencing will be used to evaluate infection, inflammation, resolution and immune response.

### Preliminary results

PLT activation correlates with lung inflammation in CFTR KO mice challenged with acute *P. aeruginosa* infection. Among SPM, resolvin (Rv) D4 and E1 showed protective effects decreasing (i) PLT activation (ii) bacterial load (iii) total leukocytes (iv) PMN number (v) NETs production by PMN in vivo.

### Conclusions

This research will investigate innovative strategies to contain the inflammation-based pathology, since it will target an underappreciated cell in CF. The proposed project will also provide a full characterization of PLT contribution in CF, thus setting the basis for additional studies aimed to restrain the PLT-derived inflammation.

### Razionale dello studio

Nonostante i progressi nei trattamenti, la mancata risoluzione dell'infiammazione polmonare ha effetti dannosi sulla vita delle persone con fibrosi cistica (FC).

Le piastrine (PLT), disfunzionali e iper-attivate in FC, contribuiscono all'infiammazione polmonare e rallentano i meccanismi della sua risoluzione. Per questo, strategie innovative anti-PLT potrebbero essere utili per contrastare l'infiammazione e il danno polmonare in FC. Risultati recenti indicano che i mediatori lipidici pro-risolutivi (SPM) modulano le attività delle PLT.

### Ipotesi e obiettivi

L'ipotesi di ricerca è che la riduzione dell'infiammazione sostenuta dalle PLT da parte di SPM potrebbe essere benefica nella FC. Verranno perseguiti due obiettivi specifici: 1) caratterizzare come mediatori pro-risolutivi spengono l'attivazione delle PLT; 2) comprendere come la modulazione delle PLT altera l'infiammazione e l'immunità. Nell'obiettivo 1, usando topi CFTR KO cronicamente infettati, stabiliremo come selezionati SPM possano modulare le PLT per ripristinare una corretta infiammazione polmonare e una risposta immunitaria benefica. Nell'obiettivo 2, sfruttando topi con delezione specifica di CFTR sulle PLT e cellule del sangue di volontari CF, analizzeremo come le PLT FC determinano alterazioni dell'infiammazione e dell'immunità.

### Metodi

Saranno usati modelli di topi FC cronicamente infettati da *P. aeruginosa*, cellule primarie da volontari di FC, tecniche di microbiologia, citometria a flusso, immunoistochimica, analisi di citochine, lipidomica e sequenziamento dell'RNA a singola cellula per valutare l'infezione, l'infiammazione, la risoluzione e la risposta immunitaria.

### Risultati preliminari

L'attivazione delle PLT è correlata all'infiammazione polmonare nei topi CFTR KO infettati da *P. aeruginosa*. Tra gli SPM, le resolvine (Rv) D4 ed E1 hanno mostrato effetti protettivi tra i quali diminuzione di (i) attivazione PLT (ii) carica batterica (ii) leucociti totali (iv) numero di PMN (v) produzione di NET da parte di PMN nei polmoni

### Conclusioni

Questa ricerca indagherà strategie innovative per contenere l'infiammazione polmonare, poiché è focalizzata su una cellula chiave ma poco studiata nella FC. Inoltre, forniremo una caratterizzazione completa del contributo delle piastrine nella FC, ponendo così le basi per ulteriori strategie terapeutiche volte a contenere l'infiammazione derivante dall'iperreattività delle PLT.

Nanotechnology-based Resolvin D1 as proresolving therapy in cystic fibrosis: preclinical studies for the delivery of innovative formulations to the clinic

Terapie pro-risolutive per la fibrosi cistica mediante resolvina D1 e nanotecnologie: studi preclinici per la consegna alla clinica di formulazioni innovative



Antonio Recchiuti (in the middle) with his collaborators, Matteo Mucci (on the left) and Giulia Ferri (on the right)

24

**Antonio Recchiuti<sup>1</sup>, Alessandra Aloisi<sup>2</sup>, Valeria Capurro<sup>3</sup>, Stefano Pantano<sup>4</sup>, Rabindra Tirouvanziam<sup>5</sup>, Marcus Mall<sup>6</sup>, Alessandra Bragonzi<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> University "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Chieti, Italy - <sup>2</sup> Institute for Microelectronics and Microsystems - National Research Council, Lecce, Italy - <sup>3</sup> IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>4</sup> CRFC, San Liberratore Hospital, Atri, Italy - <sup>5</sup> Emory University, Atlanta, GA, USA - <sup>6</sup> Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany - <sup>7</sup> CFaCORE, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy (**FFC#20/2021, concluded**)

### Background and rationale

The ambitious goal of this project is to develop nanotechnology-based formulations of 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.

### Hypothesis and objectives

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, 3 specific aims are proposed in this multidisciplinary and multipronged project: (i) construction of sSNP-RvD1; (ii) Testing sSNP-RvD1 in vivo; (iii) Testing sSNP-RvD1 in human cell systems.

### 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

SNP are tolerated well in vivo and in vitro and can be loaded with RvD1 retaining stability, drug-release property, and bioactivity under mild storage conditions.

SNP-RvD1 reduces excessive inflammation due to *P. aeruginosa* infection or mucus obstruction in vivo. SNP enhanced bacterial clearance by CF leukocytes and blunted PMN pathological phenotypes in vitro.

### Conclusions

Completion of these aims gave proof of concept that innovative formulation for the pharmacological delivery of RvD1 stable and easy to handle. Nanoformulations can improve RvD1 therapeutic effects and can be adapted to different administration routes. Optimized SNP-RvD1 can be further evaluated for pharmacokinetics and activity prior to the request of human studies.

This project is relevant to the FFC Ricerca mission (Priority #4) 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 including those that do not benefit from CFTR modulator therapies

### Razionale dello studio

La mancata risoluzione dell'inflammatione polmonare, scatenata da infezioni oppure dall'accumulo di muco nelle vie aeree, ha gravi effetti sulla vita delle persone con fibrosi cistica (FC). Il nostro corpo normalmente produce molecole chimiche in grado di velocizzare la risoluzione dell'inflammatione 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 e obiettivi

Per venire incontro a questa esigenza, in questo progetto di ricerca verranno prodotte formulazioni innovative di RvD1, che verranno testate 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'inflammatione, l'accumulo di muco, il danno polmonare e l'infezione nella FC.

### Metodi

Per testare questa ipotesi e raggiungere questo obiettivo ambizioso, verranno prodotti e caratterizzati nanofarmaci chiamati sSNP-RvD1. La tossicità, le proprietà farmacologiche e l'efficacia nel ridurre l'inflammatione, l'accumulo di muco e il grado di infezione verranno testate.

### Risultati

Gli esperimenti in corso dimostrano che i nanofarmaci SNP-RvD1 fin qui ottenuti mantengono l'attività biologica di RvD1 e sono potenti nell'attivare la risoluzione dell'inflammatione 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.

Il 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, specialmente per coloro che non possono beneficiare della terapia con modulatori di CFTR attualmente approvati.



Ilaria Lampronti (2nd from the right) with her collaborators

### Ilaria Lampronti

Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Italy (FFC#10/2022, new)

#### Background and rationale

Starting from different new TMA (4,6, 4'-Trimethylangelicin) synthetic derivatives, we were able to identify GY971a, molecule with interesting biological activity that will be developed as possible anti-inflammatory drug for Cystic fibrosis (CF).

#### Hypothesis and objectives

Our proposal is aimed to progress toward pre-clinical validation of GY971a, as potential anti-inflammatory agent. This derivative will be evaluated in primary HBE cells derived from CF patients (epithelia obtained from the FFC Ricerca Servizio Colture Primarie) and in murine models of CF and chronic inflammation (treatments and analysis in collaboration with the FFC Ricerca CFaCore).

#### Essential methods

The studies will be conducted *ex vivo* and *in vivo*: (i) innovative synthetic strategies will be used in order to obtain a large amount of GY971a; (ii) primary HBE cells derived from CF patients will be used to study the anti-inflammatory activity of GY971a; (iii) murine model of *P. aeruginosa* chronic airway infection including CF mice will be used to test the efficacy with different treatment schedules (early or late after infection)

#### Preliminary results

Through preliminary experiments, we identified several new TMA derivatives able to inhibit the NF-kB/DNA complex. The selected active molecules were then analyzed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects. It was demonstrated that GY971a was the best derivative, able to decrease the IL-8 gene expression in CF IB3-1 cells and, at the same time, without pro-apoptotic, mutagenic and phototoxic effects, facilitating our decision to test the efficacy *in vivo* by using a mouse model of acute *P. aeruginosa* lung infection. The anti-inflammatory effect of GY971a was confirmed *in vivo*: this derivative was able to deeply decrease total inflammatory cells, including neutrophils and macrophages, and to modulate the expression of cytokines/chemokines involved in inflammation.

#### Conclusions

We expect to progress our research and to confirm that GY971a possesses anti-inflammatory activity in HBE primary cells, a useful model because it directly derived from tissues of CF patients, and in murine models too. Our hope is to contribute to developing a new anti-inflammatory agent at the preclinical level, since, although there are now promising new corrector drugs, unfortunately these are not available to all CF patients, therefore inflammation could be challenged with the use of innovative drugs.

#### Razionale dello studio

Partendo dalla progettazione di nuovi analoghi sintetici della TMA (4,6,4'-Trimetilangelicina), siamo riusciti a identificare GY971a, molecola con interessante attività biologica che verrà sviluppata come potenziale agente antinfiammatorio per la fibrosi cistica (FC).

#### Ipotesi e obiettivi

Il nostro obiettivo consiste nel convalidare a livello preclinico il nuovo derivato GY971a, come potenziale agente antinfiammatorio. Questo analogo della TMA sarà valutato in cellule primarie bronco-epiteliali derivate da pazienti con FC (epiteli forniti dal Servizio Colture Primarie di FFC Ricerca) e in modelli di topo FC e di infiammazione cronica (trattamenti e analisi in collaborazione con FFC Ricerca CFaCore).

#### Metodi

Gli studi saranno condotti con esperimenti *ex vivo* e *in vivo*: (i) il derivato GY971a sarà sintetizzato sfruttando metodi chimici innovativi; (ii) verranno usate cellule bronco-epiteliali primarie derivate da pazienti affetti da FC per studiare l'attività antinfiammatoria; (iii) per testare l'efficacia di GY971a sarà usato un modello di topo di infezione cronica da *P. aeruginosa* delle vie aeree, e topi FC.

#### Risultati preliminari

Attraverso esperimenti preliminari, abbiamo identificato nuovi derivati della TMA in grado di inibire il complesso NF-kB/DNA. Le molecole attive selezionate sono state quindi analizzate per valutarne l'effetto antinfiammatorio. Il derivato GY971a ha dimostrato possedere le migliori caratteristiche: è in grado di diminuire l'espressione del gene IL-8 in cellule fibrocistiche IB3-1, senza effetti pro-apoptotici, mutageni e fototossici, ed è efficace anche *in vivo*, in un modello di topo di infezione polmonare acuta; questo derivato è stato in grado, infatti, di ridurre in modo rilevante il numero di cellule infiammatorie totali, tra cui neutrofilo e macrofagi, e di modulare l'espressione di citochine/chemochine coinvolte nell'infiammazione.

#### Conclusioni

Il nostro compito sarà approfondire la ricerca iniziata e confermare che GY971a possiede attività antinfiammatoria anche in cellule primarie bronco-epiteliali ottenute da tessuti di pazienti e in modelli di topo FC e di infiammazione cronica. La nostra speranza è poter contribuire allo sviluppo di un nuovo agente antinfiammatorio, dal momento che, anche se oggi esistono nuovi promettenti farmaci correttori, sfortunatamente questi non sono usabili da tutti i pazienti, quindi l'infiammazione potrebbe essere contrastata con l'uso di farmaci innovativi.

Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis

L'inibizione selettiva dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6) quale nuova strategia per combattere l'infiammazione e il rimodellamento fibrotico nella fibrosi cistica



Vincenzo Summa and Lucia Altucci

26

**Simona Barone<sup>1</sup>, Emilia Cassese<sup>1</sup>, Nunzio Del Gaudio<sup>2</sup>, Álvaro Javier Feliz Morel<sup>3</sup>, Alice Rossi<sup>4</sup>, Alessandra Bragonzi<sup>4</sup>, Gessica Filocamo<sup>3</sup>, Lucia Altucci<sup>2</sup>, Margherita Brindisi<sup>1</sup>, Vincenzo Summa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy - <sup>2</sup>Department of Precision Medicine, University of Campania "Luigi Vanvitelli", Naples, Italy - <sup>3</sup>Exiris, s.r.l., Castel Romano, Italy - <sup>4</sup>CFaCORE, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy (FFC#20/2020, concluded)

### Background and rationale

Patients with cystic fibrosis (CF) very often develop chronic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) being very difficult to treat. The chronic infection catalyzes insurgence of inflammation, uncontrolled tissue rearrangement and fibrosis, with deadly consequences. The current anti-inflammatory treatments are restricted only to symptomatic control of CF-associated airway inflammation, therefore novel and effective therapeutic options to eliminate such events are urgently needed.

### Hypothesis and objectives

The identification of novel therapeutic options to mitigate the inflammation process in CF is the objective of the project. Histone deacetylase 6 (HDAC6) enzyme has been related to crucial patho-mechanisms associated with inflammation and fibrosis. HDAC6 is therefore an exciting new target to be explored for 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.

### Essential methods

In this project we performed: (i) Comparison of known selective HDAC6 inhibitors (HDAC6i) through experimental evaluation of potency, selectivity and pharmacokinetic parameters; (ii) Design, synthesis, optimization and biological assessment of novel selective HDAC6i; (iii) Demonstration of the *in vivo* efficacy on inflammation and infection in an animal model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. Collaboration with the CFaCore (Cystic Fibrosis Animal Core Facility) has been of key importance to validate the *in vivo* efficacy of HDAC6i.

### Results

In this project we provided the first *in vivo* POC of the efficacy of HDAC6 selective inhibition on both the inflammatory and infection associated with CF phenotype using a known inhibitor. In parallel, we have developed a series of novel inhibitors endowed with high HDAC6 selectivity, assessed on both isolated protein and cell-based assays, and favorable pharmacokinetic profile.

### Conclusions

Our results pave the way to establish a novel therapeutic option for inflammation in CF to be potentially used in conjunction with correctors of the genetic defect. Our results on biodistribution also support the role of selective HDAC6i for chronic use through aerosol administration.

### Razionale dello studio

I pazienti con fibrosi cistica (FC) hanno la tendenza a sviluppare infezioni croniche causate da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). L'infezione cronica catalizza l'insorgenza di infiammazioni, riarrangiamenti tissutali incontrollati e fibrosi, con conseguenze mortali. Gli attuali trattamenti antinfiammatori si limitano solo al controllo sintomatico dell'infiammazione delle vie aeree associata a FC, pertanto sono urgentemente necessarie nuove opzioni terapeutiche.

### Ipotesi e obiettivi

L'identificazione di una nuova opzione terapeutica per mitigare il processo infiammatorio nella FC è l'obiettivo che il progetto si propone. L'enzima istone deacetilasi 6 (HDAC6) è stato correlato a meccanismi patologici essenziali associati all'infiammazione e alla fibrosi. In particolare, l'inibizione della sua funzione attraverso piccole molecole con elevata potenza e selettività rappresenta una promettente strategia per combattere il processo infiammatorio associato a FC.

### Metodi

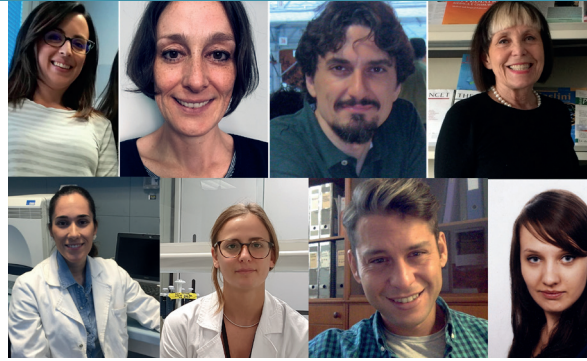
In questo progetto abbiamo effettuato: (i) confronto tra inibitori noti selettivi per HDAC6 (HDAC6i) attraverso la valutazione sperimentale di potenza, selettività e solubilità; (ii) progettazione, sintesi, ottimizzazione e valutazione biologica di nuovi HDAC6i selettivi; (iii) dimostrazione dell'efficacia *in vivo* su processo infiammatorio e infezione in un modello animale di infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. La collaborazione con il CFaCore (Cystic Fibrosis Animal Core Facility) è stata di fondamentale importanza per convalidare l'efficacia *in vivo* di HDAC6i.

### Risultati

In questo progetto abbiamo fornito la prima *proof of concept in vivo* dell'efficacia dell'inibizione selettiva dell'HDAC6 sia sul fenotipo infiammatorio che su quello infettivo associati a FC. Parallelamente, abbiamo sviluppato una serie di nuovi inibitori dotati di un'elevata selettività verso HDAC6 e proprietà farmacocinetiche ottimizzate.

### Conclusioni

I nostri risultati offrono ottime prospettive per fornire una nuova opzione terapeutica per l'infiammazione associata a FC da usare potenzialmente in co-somministrazione con i modulatori del canale attualmente disponibili. Inoltre, i nostri risultati sulla biodistribuzione supportano anche un uso cronico di HDAC6i selettivo attraverso la somministrazione via aerosol.



Clockwise, from top middle: Stefano Giovagnoli, Luigina Romani, Giorgia Renga, Matteo Puccetti, Claudia Stincardini, Paulina Wojtylo, Marilena Pariano, Aurelie Schoubben

**Matteo Puccetti<sup>1</sup>, Marilena Pariano<sup>2</sup>, Claudia Stincardini<sup>2</sup>, Giorgia Renga<sup>2</sup>, Paulina Wojtylo<sup>1</sup>, Aurelie Schoubben<sup>1</sup>, Luigina Romani<sup>2</sup>, Stefano Giovagnoli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Italy - <sup>2</sup> Department of Experimental Medicine, University of Perugia, Italy (FFC#17/2020, concluded)

**Background and rationale**

Although lung disease in cystic fibrosis (CF) is primarily an infectious disorder, the associated inflammation is pathogenic and ineffective at clearing pathogens in CF and this condition could be successfully rescued by anakinra (Kineret) through inhibition of the NLRP3/IL-1 inflammatory pathway.

**Hypothesis and objectives**

A phase 2a study to evaluate safety and efficacy of Kineret in patients with CF is ongoing (EudraCT Number: 2016-004786-80). To solve the current anakinra daily subcutaneous injection unfavorable features for application to CF patients, this project aimed at developing highly translational and compliant oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in CF.

**Essential methods**

Inhalation and oral formulations with enteric properties were optimized using lysozyme and albumin as model proteins to reduce process development costs. The formulations produced were then employed to produce dry inhalable and oral anakinra powders which were comparatively tested with Kineret and anakinra standard as follows: (i) *in vitro* on THP-1 cells for activity preservation after preparation and storage and (ii) *in vivo* in C57BL/6 and CfrF508del mice infected with *A. fumigatus* or *P. aeruginosa* for pharmacokinetics, dosages and parameters of infection and inflammation.

**Results**

Both the inhalable and oral forms of anakinra were developed. The results obtained with the inhaled formulation have been the subject of a patent application. Very promising results have been obtained in terms of quality, activity retention and *in vivo* efficacy and safety in CF pathology models. The data suggest that pulmonary administration of anakinra may result in superior efficacy compared to current systemic treatment. Similarly, the oral formulation was found to be stable, with excellent enteric properties and very promising *in vivo* efficacy.

**Conclusions**

The obtained inhalation and oral products show promising characteristics suggesting a remarkable potential for anakinra delivery in CF via both the pulmonary and oral routes. Ongoing *in vivo* studies suggest *in vivo* efficacy of the oral formulation.

**Razionale dello studio**

L'eccessiva infiammazione contribuisce a infezioni respiratorie e patologia in soggetti con fibrosi cistica (FC). Perciò, terapie antinfiammatorie potrebbero portare a un sostanziale miglioramento della patologia e della qualità di vita dei pazienti con FC. Anakinra (nome commerciale Kineret) è un farmaco potenzialmente utile in tal senso, già in uso clinico, che però mostra caratteristiche sfavorevoli a un impiego nella FC. Perciò è necessario individuare nuove piattaforme di veicolazione che permettano un impiego di anakinra nella FC.

**Ipotesi e obiettivi**

Uno studio clinico è stato recentemente intrapreso per valutare la sicurezza e l'efficacia di Kineret su pazienti con FC. Questo progetto mira quindi a favorire il *repurposing* di anakinra nella FC attraverso opportune piattaforme di veicolazione. Tale obiettivo sarà perseguito sviluppando formulazioni orali e polmonari di anakinra e valutandone l'efficacia *in vitro* e *in vivo*.

**Metodi**

Formulazioni inalatorie e orali con proprietà enteriche sono state elaborate usando lisozima e albumina come proteine modello per ridurre i costi di sviluppo del processo. Tale studio ha permesso di produrre polveri secche di anakinra inalabile e orale che sono state testate *in vitro* su cellule THP-1 per verificarne l'attività dopo preparazione e stoccaggio. Inoltre, è stata valutata l'efficacia *in vivo* in topi C57BL/6 e CfrF508del infettati con *Aspergillus fumigatus* o *Pseudomonas aeruginosa* rispetto a Kineret e una proteina standard. Sono stati monitorati crescita fungina, istopatologia, espressione genica di citochine infiammatorie, neutropenia, farmacocinetica e dosaggio.

**Risultati**

I risultati ottenuti per la formulazione inalatoria sono stati oggetto di una domanda di brevetto. La formulazione polmonare è risultata molto promettente in termini di qualità e stabilità, efficacia *in vitro* e *in vivo* superiore rispetto al trattamento sistemico. Allo stesso modo, la formulazione orale è risultata stabile, con ottime proprietà enteriche e una efficacia *in vivo* sorprendente, a giudicare dai dati preliminari ottenuti.

**Conclusioni**

I prodotti inalatorio e orale ottenuti mostrano caratteristiche promettenti suggerendo un notevole potenziale di anakinra in FC somministrata per via polmonare e orale. Dati preliminari *in vivo* suggeriscono un'efficacia anche della forma orale. Ulteriori studi sono in corso per definire farmacocinetica e attività terapeutica della formulazione orale di anakinra.

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

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



Giovanni Bertoni (top right) and collaborators

28

## Giovanni Bertoni

Department of Biosciences, University of Milan, Italy  
(FFC#14/2021, concluded)

### Background and rationale

The increase in resistance to antibiotics, together with the delay in discovering new antibacterials, is drastically limiting our ability to fight pathogenic bacteria. The development of compounds with anti-virulence effects and molecules capable of re-sensitizing resistant strains to antibiotics is an emerging approach that can produce drugs with high specificity and narrow spectra, attractive features for targeted therapies in cystic fibrosis against bacterial pathogens.

### Hypothesis and objectives

In this perspective, bacterial small RNAs represent an unexploited category of therapeutic targets. We showed that the small RNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in the regulation of several functions linked to lung pathogenesis and antibiotic resistance. Interestingly, 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 a murine model. Moreover, the deletion of *ErsA* induces sensitization to ceftazidime, cefepime, and meropenem in a multidrug-resistant clinical strain. The main aim of this project was to develop and test anti-*ErsA* Peptide Nucleic Acids (PNAs) able to bind to *ErsA*, block its regulatory function, and induce the phenotypes that we observed in the *ersA* knock-out mutants.

### Essential methods

PNAs annealing to *ErsA* was tested (i) *in vitro* by microscale thermophoresis; (ii) *in vivo*, by measuring in *P. aeruginosa* reporter strains the PNA-mediated interfering of the *ErsA* regulation of target genes; and (iii) by testing the re-sensitization to antibiotics induced by PNAs in clinical multi-drug resistance *P. aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.

### Results

We showed that the anti-*ErsA* PNAs can interfere with *ErsA* regulatory function, although the inhibitory effects depend on the target tested. Furthermore, we provided evidence of the ability of anti-*ErsA* PNAs to re-sensitize a resistant strain to antibiotics.

### Conclusions

Overall, our results strongly suggest the potential of targeting *ErsA* as a novel strategy to contrast *P. aeruginosa* and the use of anti-*ErsA* PNAs to contrast *P. aeruginosa* resistance by re-sensitization to antibiotics.

### Razionale dello studio

L'aumento della resistenza agli antibiotici, insieme al ritardo nella scoperta di nuovi antibatterici, sta limitando drasticamente la nostra capacità di combattere i batteri patogeni. Lo sviluppo di composti con effetti anti-virulenza e molecole in grado di sensibilizzare ceppi resistenti agli antibiotici è un approccio emergente in grado di produrre farmaci con elevata specificità e spettri ristretti, caratteristiche interessanti per terapie mirate nella fibrosi cistica contro i patogeni batterici.

### Ipotesi e obiettivi

In questa prospettiva, i piccoli RNA batterici rappresentano una categoria non sfruttata di bersagli terapeutici. Abbiamo mostrato che il piccolo RNA *ErsA* di *Pseudomonas aeruginosa* è coinvolto nella regolazione di diverse funzioni legate alla patogenesi polmonare e alla resistenza agli antibiotici. Abbiamo scoperto che un ceppo mutante di *P. aeruginosa* in cui *ErsA* è stato eliminato non riesce a formare un biofilm maturo ed è significativamente meno virulento in seguito all'infezione sia di cellule epiteliali bronchiali che di un modello di topo. Inoltre, la delezione di *ErsA* induce sensibilizzazione a ceftazidime, cefepime e meropenem in un ceppo clinico multiresistente. L'obiettivo principale di questo progetto era sviluppare e testare acidi nucleici peptidici (PNA) anti-*ErsA* in grado di legarsi a *ErsA*, bloccarne la funzione regolatoria e indurre i fenotipi che abbiamo osservato nei mutanti di *ErsA*.

### Metodi

Il legame dei PNA a *ErsA* è stato testato: (i) *in vitro* mediante la tecnologia del *microscale thermophoresis*; (ii) *in vivo*, misurando in ceppi reporter di *P. aeruginosa* l'interferenza mediata da PNA della regolazione di *ErsA* dei geni bersaglio; e (iii) testando la risensibilizzazione agli antibiotici indotta dai PNA in isolati clinici multiresistenti di *P. aeruginosa*.

### Risultati

Abbiamo mostrato che i PNA anti-*ErsA* possono interferire con la funzione regolatoria di *ErsA*, sebbene gli effetti inibitori dipendano dal target saggiato. Inoltre, abbiamo fornito evidenze della capacità dei PNA anti-*ErsA* di sensibilizzare un ceppo resistente agli antibiotici.

### Conclusioni

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono fortemente il potenziale di usare *ErsA* come target in una nuova strategia per combattere *P. aeruginosa* e l'uso di PNA anti-*ErsA* per contrastare la resistenza di *P. aeruginosa* mediante risensibilizzazione agli antibiotici.

**Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *Mycobacterium abscessus* iron acquisition pathways**

Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica



At the top, Laurent Robert Chiarelli (2nd from the left) and Sonia Covaceuszach (2nd from the right) with collaborators. At the bottom, Fiorella Meneghetti (2nd from the left) and collaborators.

**Matteo Mori<sup>2</sup>, Giovanni Stelitano<sup>1</sup>, Matteo Tomaiuolo<sup>3</sup>, Alberto Tresoldi<sup>2</sup>, Giuseppe Mangiardi<sup>3</sup>, Alberto Cassetta<sup>3</sup>, Marina Camera<sup>2</sup>, Stefania Villa<sup>2</sup>, Sonia Covaceuszach<sup>3</sup>, Fiorella Meneghetti<sup>2</sup>, Laurent Robert Chiarelli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Italy - <sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Italy - <sup>3</sup> Institute of Crystallography, CNR, Trieste, Italy (FFC#5/2022, new)

**Background and rationale**

The resistance of the most relevant nontuberculous mycobacteria (NTM), *M. abscessus* (*Mab*), against conventional therapies is globally rising, especially among cystic fibrosis (CF) patients. Therefore, new strategies are urgently needed. Iron acquisition is an interesting target because it is critical for pathogen growth and virulence. To get this essential cofactor, mycobacteria produce iron chelators, whose biosynthesis was widely investigated in *M. tuberculosis* (*Mtb*), leading to inhibitors with bacteriostatic activity.

**Hypothesis and objectives**

The aim of the project is the identification of new, safe compounds targeting iron uptake in *Mab*. To this purpose we will focus on the first enzyme in the siderophore biosynthetic pathway, the salicylate synthase (*SaS*) that was successfully studied to identify antitubercular agents.

**Essential methods**

A combined experimental/theoretical approach will be employed to identify new *Mab SaS* inhibitors, by fragment-based and ligand-based drug design. Considering the structural conservation of *SaS* active site in mycobacteria, we will perform a virtual screening using a homology model. Parallelly, we will build a fragment library and test it by computational and biochemical assays. We will perform crystallization trials to obtain complexes with the most promising fragments to define their mode of interaction. Based on the outcomes of these studies, a collection of optimized compounds will be designed, synthesized, and screened. Inhibitors active in the low micromolar range will be assayed for their antimicrobial activity and toxicity against human cells.

**Preliminary results**

The recombinant *Mab SaS* have been already produced and used to screen a library of *Mtb SaS* furan-based inhibitors, developed by our groups. Several non-toxic compounds displayed encouraging activity, supporting the possibility to develop specific inhibitors.

**Conclusions**

The results deriving from these complementary approaches will lead to the selection of *Mab SaS* inhibitors, potentially active against NTM infections. Our panel of validated drug candidates will provide a basis for the development of innovative therapeutic treatments against resistant *Mab* infections in CF patients.

**Razionale dello studio**

Fra i micobatteri non tubercolari (MNT) *M. abscessus* (*Mab*) si sta diffondendo in modo preoccupante, soprattutto tra i pazienti con fibrosi cistica (FC), a causa della diffusione di ceppi resistenti contro le terapie convenzionali. È pertanto urgente individuare nuove strategie. L'approvvigionamento del ferro è un bersaglio interessante perché fondamentale per la crescita e la virulenza dei patogeni. Per ottenere questo cofattore essenziale, i micobatteri producono molecole in grado di chelare il ferro, la cui biosintesi è stata ampiamente studiata in *M. tuberculosis* (*Mtb*), portando allo sviluppo di inibitori.

**Ipotesi e obiettivi**

L'obiettivo del progetto è di identificare nuovi composti capaci di inibire il processo di assorbimento del ferro in *Mab*. A tale scopo verrà preso in considerazione il primo enzima della via biosintetica dei siderofori, la salicilato sintasi (*SaS*), che è già stato studiato con successo per identificare agenti antitubercolari.

**Metodi**

Per identificare nuovi inibitori della *SaS* di *Mab*, verrà impiegato un approccio combinato sperimentale/teorico, attraverso la progettazione di farmaci basati su frammenti e su ligandi. Data l'omologia strutturale del sito attivo delle *SaS* nei micobatteri, verrà usato un modello per eseguire uno screening virtuale. In parallelo, verrà costruita una libreria di frammenti, che sarà testata mediante saggi biochimici e biofisici. Inoltre, verranno condotte prove di cristallizzazione, al fine di ottenere la struttura dell'enzima complessata con i frammenti più promettenti, per definirne la modalità di interazione. I risultati di questi studi consentiranno lo sviluppo di composti ottimizzati, attivi a concentrazioni basso micromolari, che saranno testati per la loro attività antimicrobica e la loro tossicità contro cellule umane.

**Risultati preliminari**

La *SaS* di *Mab* è già stata prodotta e usata per lo screening di una libreria di inibitori furanici della *SaS* di *Mtb*, sviluppata dal nostro gruppo. Diversi composti hanno mostrato una buona attività, supportando la possibilità di sviluppare inibitori specifici.

**Conclusioni**

I risultati derivanti da questi approcci complementari porteranno alla selezione di inibitori della *SaS* di *Mab*, potenzialmente attivi contro le infezioni da MNT. Il nostro pannello di candidati farmaci potrà fornire una base per lo sviluppo di trattamenti terapeutici innovativi contro le infezioni da *Mab* resistente nei pazienti con FC.



Tackling phage resistance to increase the robustness of phage therapy for curing *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis

Affrontare la fago-resistenza per aumentare la solidità della terapia fagica nella cura delle infezioni batteriche in pazienti con fibrosi cistica (PhaCyf)



Federica Briani (2nd from the left, large image) and her collaborators

30

**Francesca Forti<sup>1</sup>, Claudia Bertoli<sup>1</sup>, Sara Gilardi<sup>1</sup>, Marco Cafora<sup>2</sup>, Anna Pistocchi<sup>2</sup>, Federica Briani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biosciences, University of Milan, Italy - <sup>2</sup> Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy  
**(FFC#15/2021, concluded)**

### Background and rationale

*Patients with Cystic Fibrosis (CF) are highly susceptible to lung infections caused by different bacteria, among which Pseudomonas aeruginosa (Pa). Phage therapy, namely exploiting phages (bacteria-specific viruses) to kill infecting bacteria, represents a promising strategy for curing bacterial infections refractory to antibiotics in these patients. We assembled a collection of phages able to kill Pa clinical strains isolated from patients with CF and developed a four-phage cocktail (CK4) able to treat Pa infections in animal models among which a CFTR-loss-of-function (LOF) zebrafish. However, the success of phage therapy may be endangered by the appearance of mutant bacteria resistant to phages.*

### Hypothesis and objectives

*The objectives of the project were to identify (i) the bacterial functions responsible for phage resistance and to understand how the mutations causing phage resistance impact fitness and virulence; (ii) new phages able to kill phage-resistant Pa strains.*

### Essential methods

*We isolated Pa PAO1 mutant derivatives resistant to CK4. We mapped the mutations and showed that they were responsible for phage-resistance. Phages of our collection and new phages found in Italian rivers were screened to identify those able to grow on phage resistant mutants.*

### Results

*Our results show that the lipopolysaccharide (LPS) component of the outer membrane is involved in the adsorption of all CK4 phages. Indeed, a single mutation interfering with LPS biosynthesis can confer resistance to the CK4. Some resistant mutants had decreased fitness in vitro and decreased virulence in the zebrafish CFTR+ model, but not in the cfr-LOF one. We identified some phages able to grow on phage-resistant mutants. Preliminary evidence suggests that they may use the pilus as a receptor. Heterogeneity of LPS and lack of pili may explain phage-resistance shown by some Pa clinical strains.*

### Conclusions

*Overall, our results indicate that phage therapy would benefit from a personalized approach, in which phages to be administered to the patient would be chosen based on their ability to kill the specific infecting strain(s). This requires the generation of a large bank of heterogeneous phages exploiting different receptors. Phage-resistant mutants isolated or constructed in the frame of this project will be useful tools to assemble such collection.*

### Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica (FC) sono altamente suscettibili alle infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). La terapia fagica, cioè l'uso dei fagi (virus specifici dei batteri) per uccidere i batteri, rappresenta una strategia promettente per curare le infezioni refrattarie agli antibiotici. Abbiamo assemblato una collezione di fagi attivi contro ceppi clinici di Pa isolati da pazienti con FC e sviluppato un cocktail di quattro fagi (CK4) in grado di curare le infezioni da Pa in modelli animali, tra cui un modello di zebrafish FC. Tuttavia, il successo della terapia fagica può essere messo in pericolo dalla comparsa di batteri mutanti resistenti ai fagi.

### Ipotesi e obiettivi

Gli obiettivi del progetto FFC#15/2021 erano identificare (i) le funzioni batteriche responsabili della resistenza ai fagi e analizzarne il ruolo nella fitness e nella virulenza; (ii) isolare nuovi fagi in grado di uccidere ceppi di Pa resistenti a CK4.

### Metodi

Abbiamo isolato mutanti resistenti a CK4 derivati da Pa PAO1. Abbiamo mappato le mutazioni dimostrando che erano responsabili della fago-resistenza. I fagi della nostra collezione e nuovi fagi isolati da fiumi italiani sono stati analizzati per identificare quelli in grado di crescere su mutanti resistenti ai fagi.

### Risultati

I nostri risultati indicano che il lipopolisaccaride (LPS) della membrana esterna è coinvolto nell'assorbimento di tutti i fagi di CK4. Infatti, una mutazione che interferisce con la biosintesi di LPS conferisce resistenza al CK4. Alcuni mutanti fago-resistenti hanno una fitness e una virulenza ridotta solo in embrioni di zebrafish wild-type, non nel modello FC. Abbiamo identificato alcuni fagi in grado di crescere su mutanti resistenti ai fagi che probabilmente usano il pilo come recettore. L'eterogeneità dell'LPS e la mancanza di pili possono spiegare la resistenza ai fagi mostrata da alcuni ceppi clinici di Pa.

### Conclusioni

Nel complesso, i nostri risultati indicano che la terapia fagica richiede un approccio personalizzato, in cui i fagi da somministrare al paziente sono scelti in base alla loro capacità di uccidere lo specifico ceppo infettante. Ciò richiede la generazione di una grande banca di fagi eterogenei che usino diversi recettori. I ceppi fago-resistenti isolati o costruiti nell'ambito di questo progetto saranno utili strumenti per assemblare tale collezione.

Background and rationale

Hypothesis and objectives

Essential methods

Preliminary results

Conclusions

Razionale dello studio

Ipotesi e obiettivi

Metodi

Risultati preliminari

Conclusioni



In the large image, Fiorentina Ascenzioni (in the middle), Bruno Botta (1st on the left) and collaborators. On the left, Mattia Mori. At the top, Stefano Salmaso

Fiorentina Ascenzioni<sup>1</sup>, Bruno Botta<sup>2</sup>, Mattia Mori<sup>3</sup>, Stefano Salmaso<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular and Cellular Biology, Sapienza University of Rome, Italy - <sup>2</sup> Department of Chemistry and Technology of Drugs, Sapienza University of Rome, Italy - <sup>3</sup> Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy - <sup>4</sup> Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Italy (FFC#12/2021, ongoing)

Resistance to colistin, a last-resort antibiotic for the Gram-negative bacteria, is mediated by modifications of the *lipidA* of the bacterial outer membrane. In *Pseudomonas aeruginosa* the *ArnT* transferase is a key enzyme for colistin resistance. Thus, inhibition of *ArnT* activity is expected to reduce colistin resistance.

We have previously identified a potential inhibitor of *ArnT*, named BBN149, from which the ent-beyerane scaffold was identified as a privileged platform for further development of *ArnT* inhibitors. Based on this, we aim at the simplification of the ent-beyerane complex structure into drug-like synthetic molecules with improved biological activity.

A model of *ArnT* from *P. aeruginosa* was generated and used to predict the binding mode of small molecules within the catalytic site and to produce a library of ent-beyerane diterpens. A small focused library of abietane-type diterpenoid derivatives was produced by combining the abietane scaffold with the functional groups identified by *in silico* modeling. Compounds activity was determined by conventional microbiological methods. Design and assembly of liposomal formulations by thin lipid film hydration technique.

A library of 21284 compounds was generated *in silico*, from which the top-ranking 1000 compounds were selected for further analysis of binding modes. From this, 41 compounds with a higher score than the reference BBN149, were suggested for organic synthesis. Among them, the abietane-type diterpenoids were selected for the synthesis of a small focused library. The colistin adjuvant activity of ten selected compounds was determined and the structure-activity relationship is under evaluation for additional cycles of design-synthesis-bioassay.

Liposomes were assembled using the isostevic acid as a prototype of ent-beyerane derivatives. Liposomes loaded with colistin in the aqueous core and isostevic acid in the lipid bilayer were produced and their biologic activity is under investigation. Additionally, inhalable dosage forms are under investigation.

The entire procedure for identification and iterative modification of small molecules with potential inhibitory activity of *ArnT* has been set up and applied for the identification of optimized *ArnT* inhibitors. Additionally, nanovehicles for delivery of the *ArnT* inhibitors have been produced and advanced formulations are under investigation.

La resistenza alla colistina, un antibiotico di ultima istanza per i batteri Gram-negativi, è mediata da modificazioni del *lipidA* della membrana esterna dei batteri Gram negativi. In *Pseudomonas aeruginosa* la transferasi *ArnT* è un enzima chiave del meccanismo di resistenza. È pertanto atteso che l'inibizione di *ArnT* riduca la resistenza alla colistina.

In precedenza, abbiamo identificato un potenziale inibitore di *ArnT*, chiamato BBN149, da cui è stata identificata la struttura ent-beyerane come privilegiata per l'ulteriore sviluppo di inibitori di *ArnT*. Nel presente progetto, miriamo alla semplificazione di questa struttura in molecole sintetiche con migliori proprietà farmacologiche e attività biologica.

Un modello di *ArnT* di *P. aeruginosa* è stato generato e usato per prevedere la modalità di legame di piccole molecole all'interno del sito catalitico e applicato per produrre una libreria di molecole. Una piccola libreria di derivati diterpenoidi di tipo acido abietico è stata prodotta combinando la struttura di base con i gruppi funzionali identificati dal modello *in silico*. L'attività dei composti è stata determinata con metodi microbiologici. Infine, formulazioni liposomiali sono state progettate e assemblate con la tecnica di idratazione a film lipidico sottile.

Una libreria di 21284 composti è stata generata *in silico*, da cui sono stati selezionati i primi 1000 composti, ulteriormente esaminati per la modalità di legame. 41 composti, con un punteggio più alto rispetto a BBN149, sono stati proposti per la sintesi. Tra questi, i diterpenoidi di tipo abietano sono stati selezionati e una piccola libreria è stata prodotta. Di questi ne è stata determinata l'attività adiuvante della colistina e la relazione struttura-attività è in corso di valutazione per ulteriori cicli di progettazione-sintesi-test biologici.

Liposomi sono stati assemblati usando l'acido isostevico come prototipo di derivati ent-beyerane. Sono stati prodotti liposomi carichi di colistina al loro interno e acido isostevico nell'involucro lipidico; la loro attività biologica è allo studio. Inoltre, sono allo studio formulazioni inalabili.

Abbiamo a disposizione un processo iterativo di identificazione-sintesi-test-biologici per l'identificazione di piccole molecole con potenziale attività inibitoria dell'*ArnT* e la loro ottimizzazione. Inoltre, sono stati prodotti i primi nanovettori specifici per gli inibitori di *ArnT* e la colistina.

Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application

Valutazione delle interazioni tra i batteriofagi e il sistema immunitario dell'ospite in modelli di fibrosi cistica: un passo verso l'applicazione della terapia fagica



Anna Pistocchi (2nd from the right) and her collaborators

32

Marco Cafora<sup>1</sup>, Francesca Forti<sup>2</sup>, Nicoletta Loberto<sup>1</sup>, Massimo Aureli<sup>1</sup>, Federica Briani<sup>2</sup>, Anna Pistocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Department of Biosciences, University of Milan, Italy (FFC#12/2022, new)

### Background and rationale

The rise of multiple drug-resistant bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), complicates the treatment of patients with cystic fibrosis (CF). Recently, phage therapy has been explored as a potential alternative tool for patients with CF. This therapy has been used for decades in Eastern Europe to treat a variety of infections and thus it is considered generally safe. However, there are aspects that deserve to be further studied to make phage therapy a realistic therapeutic option.

### Hypothesis and objectives

This project aims to investigate some of the still open questions about phage therapy, like what happens when phages get in touch with eukaryotic cells in wild-type (WT) and CF models. We aim to investigate three among the five Ws concerning phages and host immune system: (i) where phages localize when added to zebrafish and human cells; (ii) which phage component(s) activate anti-inflammatory cascades in zebrafish and human cell lines; (iii) why phages elicit the modulation of the host immune system.

### Essential methods

These general objectives will be addressed by: (i) studying the fate of phages after the injection in WT and CF zebrafish embryos and incubation with WT or CF human cell lines specific for airway epithelium or innate immune system; (ii) isolating and purifying proteins from DEV, the most promising among the phages composing a four-phage cocktail (CK4), and test which exerts anti-inflammatory effects in the above-mentioned in vivo and in vitro models, (iii) dissecting the molecular mechanisms through which CK4 modulate host immune system in WT and CF zebrafish embryos recapitulating the human innate immunity.

### Preliminary results

We previously demonstrated that our CK4 is able to treat Pa infections in WT and CF zebrafish embryos. We also demonstrated that phages elicited anti-inflammatory action both in zebrafish and in human cells carrying the F508del-CFTR mutation.

### Conclusions

The discovery of mechanisms involved in phage/host immune system interaction in normal and pathological conditions will be relevant for the CF community. Indeed, clinical trials to assess the safety and tolerability of an inhaled phage cocktail in patients with chronic Pa infections have been started. This proposal aims to clarify unsolved issues of phage therapy that cannot be addressed in patients, with the final goal to make it a reliable and safe therapeutic option.

### Razionale dello studio

L'aumento dei batteri resistenti ai farmaci, tra cui *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), complica il trattamento dei pazienti con fibrosi cistica (FC). Recentemente, la fagoterapia è stata esplorata come potenziale strumento alternativo per questi pazienti. Essa è stata usata per decenni nell'Europa dell'Est per trattare una serie di infezioni ed è quindi considerata generalmente sicura. Tuttavia, ci sono aspetti che meritano di essere approfonditi per rendere la terapia fagica un'opzione terapeutica realistica.

### Ipotesi e obiettivi

Questo progetto mira a indagare alcune delle questioni ancora aperte della terapia fagica, e in primis cosa succede quando i fagi entrano in contatto con le cellule eucariotiche in modelli wild-type (WT) e FC. Ci proponiamo di indagare: (i) dove si localizzano i fagi nelle cellule di zebrafish e umane; (ii) quali componenti dei fagi attivano l'infiammazione; (iii) perché i fagi provocano la modulazione del sistema immunitario dell'ospite.

### Metodi

Questi obiettivi saranno affrontati attraverso (i) lo studio del destino dei fagi dopo l'iniezione in embrioni di zebrafish WT e FC o l'incubazione con linee epiteliali bronchiali umane o cellule del sistema immunitario WT o FC; (ii) isolare e purificare alcune proteine strutturali di DEV, il più promettente tra i fagi che compongono il nostro cocktail (CK4) per testare se e quali esercitano effetti antinfiammatori; (iii) analizzare i meccanismi molecolari attraverso i quali il CK4 modula il sistema immunitario dell'ospite in embrioni di zebrafish WT e FC che ricapitolano l'immunità innata umana.

### Risultati

Abbiamo precedentemente dimostrato che il CK4 è in grado di ridurre le infezioni da Pa in embrioni zebrafish WT e FC. Abbiamo inoltre dimostrato che i fagi esercitano un'azione antinfiammatoria sia nello zebrafish che nelle cellule umane portatrici della mutazione F508del su CFTR.

### Conclusioni

La scoperta dei meccanismi coinvolti nell'interazione tra fagi e sistema immunitario dell'ospite in condizioni normali e patologiche sarà importante per la comunità FC. Infatti, sono stati avviati studi clinici per valutare la sicurezza e la tollerabilità di un cocktail di fagi per via inalatoria in pazienti con infezioni croniche da Pa. Questa proposta mira a chiarire le questioni irrisolte della terapia fagica che non possono essere affrontate nei pazienti, con l'obiettivo finale di renderla un'opzione terapeutica affidabile e sicura.

# New drugs against *Mycobacterium abscessus*

33

New drug combinations against nontuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis

Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da micobatteri non tubercolari nella fibrosi cistica



From the left: Alessio Lanni, Federico Giannoni, Lanfranco Fattorini, Emanuele Borroni

**Alessio Lanni<sup>1</sup>, Emanuele Borroni<sup>2</sup>, Lanfranco Fattorini<sup>1</sup>, Federico Giannoni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy - <sup>2</sup> Emerging Bacterial Pathogens Unit, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy (FFC#17/2021, concluded; FFC#6/2022, new)

## Background and rationale

Nontuberculous mycobacteria (NTM) may cause chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis (CF). *Mycobacterium abscessus abscessus* (Mab) is the most common isolated species. NTM form biofilms within thickened alveolar walls and airways of CF patients. In biofilms oxygen depletion occurs, and hypoxia restricts NTM growth from replicating aerobic (A) to non-replicating hypoxic (H) stages, containing drug-tolerant persisters.

## Hypothesis and objectives

To combat NTM infections, we need to find new combinations killing both A and H cells, containing current drugs and at least one drug active against anaerobic bacilli.

## Essential methods

Mab was exposed to drug combinations under A and H (Wayne model) conditions and killing activity was evaluated by colony forming units in agar and lack of regrowth in liquid medium (MGIT 960) of 1-day-old A cells (A1) and 5-day-old H cells (H5). RNA from A and H Mab cultures was extracted and processed by qRT-PCR.

## Results

We developed A and H culture conditions of Mab strain 10 (MAB-10) and clinical isolate 1 from CF (CI-1). Genes correlated to dormancy in other mycobacterial models, like sigE and HSP, were upregulated in Mab H cultures. We tested the activity of drug combinations designed from 8 drugs with anti-Mab activity and 10 nitro-compounds, the latter active against anaerobic bacteria. Combinations of bedaquiline (BDQ), amikacin (AMK), rifabutin (RFB), metronidazole (MTR) and nimorazole (NMR) (anti-anaerobic drugs), clarithromycin (CLR) and colistin (CLS, anti-persisters drug) were the most promising. Overall, 56 days of treatment of MAB-10 with the nitro-compounds-containing combinations BDQ-AMK-RFB-CLR-NMR and BDQ-AMK-RFB-CLR-MTR-CLS killed A1+H5 cells in 42 and 56 days, respectively. In addition, 105 days of treatment of A1 and H5 cells of strain CI-1 with BDQ-AMK-CLR-MTR-CLS killed A1 cells in 70 days but not H5 cells in 105 days. Presently, we are testing the activity of BDQ-containing combinations including clofazimine (CLF, anti-leprosy drug) and nitro-compounds against A1 and H5 cells of CI-1 and other clinical isolates. Overall, we hypothesize a role of drugs-induced reactive oxygen radicals (CLS, CLF) and reactive nitrogen radicals (nitro-compounds) in persisters killing.

## Conclusions

Mab dormant cells, living in the CF biofilm, are much more difficult to kill than A cells, explaining why Mab-infected CF patients need months of antibiotic therapy.

## Appendix Project FFC#6/2022

Following the results obtained, we aim to obtain new and more effective antibiotics active to combat infections by NTM. The goal is to identify at least one combination capable of killing both A and H Mab cells in less than 1 month, which will then be explored in animal models and possible clinical studies, to shorten anti-Mab therapies in CF.

## Razionale dello studio

I micobatteri non tubercolari (MNT) possono causare infezioni polmonari croniche in pazienti con fibrosi cistica (FC). *Mycobacterium abscessus abscessus* (Mab) è la specie isolata più di frequente. I MNT formano biofilm nelle pareti alveolari ispessite e nelle vie aeree dei pazienti con FC. Nel biofilm l'ossigeno diminuisce e i MNT passano dalla fase aerobia (A) a quella ipossica (H), non replicativa e tollerante ai farmaci.

## Ipotesi e obiettivi

Per combattere i MNT occorre trovare nuove combinazioni di farmaci con almeno uno attivo verso i batteri anaerobi, in modo da uccidere sia le fasi A che H.

## Metodi

Le colture in fase A di 1 giorno (A1) e H di 5 giorni (H5), ottenute nel modello di Wayne, sono state trattate con antibiotici e l'attività battericida valutata mediante conta delle unità formanti colonie in agar e assenza di crescita in terreno liquido (MGIT 960). L'RNA da colture A e H di Mab è stato estratto e processato per qRT-PCR.

## Risultati

Abbiamo messo a punto le condizioni di coltura A e H del ceppo Mab 10 (MAB-10) e dell'isolato clinico 1 da FC (IC-1). Geni correlati con la dormienza in altre specie batteriche, come sigE e HSP, sono attivati in condizioni di ipossia. Abbiamo saggiato l'attività di combinazioni di 8 farmaci con attività anti-Mab e 10 nitro-composti, questi ultimi attivi verso i batteri anaerobi. Le combinazioni di bedaquilina (BDQ), amikacina (AMK), rifabutina (RFB), metronidazolo (MTR) e nimorazolo (NMR) (farmaci anti-anaerobi), claritromicina (CLR) e colistina (CLS, anti-persisters) erano le più promettenti. Infatti, 56 giorni di coltura di MAB-10 con le combinazioni contenenti nitrocomposti BDQ-AMK-RFB-CLR-NMR e BDQ-AMK-RFB-CLR-MTR-CLS uccidevano le cellule A1+H5 in 42 e 56 giorni, rispettivamente, come mostrato dalla mancanza di ricrescita in agar e MGIT. Inoltre, 105 giorni di trattamento di A1 e H5 di IC-1 con BDQ-AMK-CLR-MTR-CLS uccidevano A1 in 70 giorni ma non H5 in 105 giorni.

## Conclusioni

## Appendice Progetto FFC#6/2022

Attualmente stiamo saggiando l'attività di combinazioni contenenti BDQ, clofazimina (CLF, farmaco anti-lebbra) e nitro-composti contro A1 e H5 di IC-1 e altri isolati clinici. È possibile un ruolo dei radicali dell'ossigeno e dell'azoto indotti da farmaci nell'uccisione dei *persisters*.

Le cellule H, che vivono nel biofilm dei pazienti con FC, sono molto più difficili da uccidere delle cellule A, ragione per cui i pazienti affetti da FC con infezione da Mab necessitano di mesi di terapia antibiotica.

Il nuovo progetto mira all'ottenimento di nuovi e più efficaci antibiotici, attivi nel contrastare le infezioni da MNT. Il fine ultimo è identificare almeno una combinazione di antibiotici in grado di uccidere in meno di un mese le cellule di Mab sia A che H. Tale combinazione verrà poi ulteriormente studiata in modelli animali e per possibili studi clinici, in modo da riuscire ad accorciare i tempi delle terapie anti-Mab usate in fibrosi cistica.

## New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other nontuberculous mycobacteria

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



From the left: Maria Rosalia Pasca, Vadim Makarov, Enrico Tortoli, Santiago Ramón-García

34

**Giulia Degiacomi<sup>1</sup>, Laurent R. Chiarelli<sup>1</sup>,  
Giovanni Stelitano<sup>1</sup>, Deborah Recchia<sup>1</sup>,**

**Lara Muñoz Muñoz<sup>2</sup>, Olga Riabova<sup>3</sup>, Nicola Ivan Loré<sup>4</sup>, Natalia Monakhova<sup>3</sup>, Viola Camilla Scoffone<sup>1</sup>, Silvia Buroni<sup>1</sup>, Fabio Saliu<sup>4</sup>, Jose Manuel Ezquerro Aznárez<sup>2</sup>, Anna Griego<sup>5</sup>, Edoardo Scarpa<sup>5</sup>, Loris Rizzello<sup>5</sup>, Daniela Cirillo<sup>4</sup>, Santiago Ramon-Garcia<sup>2</sup>, Enrico Tortoli<sup>4</sup>, Vadim Makarov<sup>3</sup>, Maria Rosalia Pasca<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani"; University of Pavia, Italy - <sup>2</sup> Research and Development Agency of Aragón (ARAID) Foundation/Dep. Microbiology/Fac. - Medicine, University of Zaragoza, Spain - <sup>3</sup> Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia. - <sup>4</sup> Emerging Bacterial Pathogens Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, IRCCS San Raffaele, Milan, Italy - <sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Italy; The National Institute of Molecular Genetics (INGM) - Milan, Italy (FFC#18/2021, concluded)

## Background and rationale

*The incidence of Mycobacterium abscessus (Mab) is increasing among cystic fibrosis (CF) individuals worldwide. Mab drug therapy is long up to 2 years and treatment failure is linked to an accelerated lung function decline.*

## Hypothesis and objectives

*The current drug pipeline is alarmingly sparse, thus new antibiotics with a novel mechanism of action active against this emerging pathogen are needed.*

## Essential methods

*To pursue this aim, we used microbiological, chemical and biochemical procedures.*

## Results

*We screened more than 700 compounds ad hoc synthesized and identified only one, with bactericidal activity against Mab. The molecule is also active against Mab biofilm and suitable for combinatorial therapy since no antagonism was identified among a panel of drugs clinically used for Mab treatment. Furthermore, this compound is active in mice (immunocompetent C57BL/6NCrl) infected with agar-embedded Mab bacteria by intranasal administration, similar to amikacin, control drug. Transcriptomic analysis showed that treatment with this compound inhibits essential metabolic pathways, such as cell division, protein biosynthesis, ATP production and gene transcription. Genes coding FtsZ and FtsQ, which are involved in cell division, were the most downregulated, pointing out to a possible FtsZ inhibition by this molecule. We showed that this compound inhibits the activity of Mab FtsZ, by blocking its polymerization. In support of this finding, Mab treated cells were not able to divide and displayed an elongated phenotype as evident from single cell analysis.*

## Conclusions

*All the results indicate that this compound is a new promising drug candidate against Mab. Some results of this research project cannot be disclosed because a related patent is pending.*

## Razionale dello studio

L'incidenza di *Mycobacterium abscessus* (Mab) è in aumento tra gli individui affetti da fibrosi cistica (FC) in tutto il mondo. La terapia farmacologica con Mab dura fino a 2 anni e il fallimento del trattamento è legato a un declino accelerato della funzione polmonare.

## Ipotesi e obiettivi

L'attuale "pipeline" di farmaci contro Mab è fortemente scarsa, pertanto sono necessari nuovi antibiotici con un nuovo meccanismo d'azione attivo contro questo patogeno emergente.

## Metodi

Per perseguire questo obiettivo, abbiamo usato procedure microbiologiche, chimiche e biochimiche.

## Risultati

Abbiamo esaminato più di 700 composti sintetizzati *ad hoc* e ne abbiamo identificato solo uno, con attività battericida contro Mab. La molecola è attiva contro il biofilm di Mab e può essere usata in combinazione con un pannello di farmaci clinicamente usati per il trattamento, non essendo stato identificato alcun antagonismo. Inoltre, questo composto è attivo nei topi (immunocompetenti C57BL/6NCrl) infettati con Mab mediante somministrazione intranasale, analogamente all'amikacina, farmaco di controllo. L'analisi trascrittomiche ha mostrato che il trattamento con questo composto inibisce vie metaboliche essenziali, come la divisione cellulare, la biosintesi proteica, la produzione di ATP e la trascrizione genica. I geni che codificano FtsZ e FtsQ, coinvolti nella divisione cellulare, sono risultati i più down-regolati, indicando una possibile inibizione di FtsZ da parte di questa molecola. Abbiamo dimostrato che questo composto inibisce l'attività di FtsZ di Mab, bloccandone la polimerizzazione. A conferma di questa scoperta, le cellule trattate con Mab non erano in grado di dividersi e mostravano un fenotipo allungato, come evidente dall'analisi *single cell*.

## Conclusioni

Tutti i risultati indicano che questo composto è un nuovo promettente farmaco candidato contro Mab. Alcuni risultati di questo progetto di ricerca non possono essere resi noti perché sono in corso di brevettazione.



**Noemi Poerio<sup>1</sup>, Tommaso Olimpieri<sup>1</sup>, Nicola I Lorè<sup>2</sup>, Fabiana Ciciriello<sup>3</sup>, Greta Poncecchi<sup>1</sup>, Marco Maria D'Andrea<sup>1</sup>, Federico Alghisi<sup>3</sup>, Daniela Cirillo<sup>2</sup>, Maurizio Fraziano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy - <sup>2</sup> Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>3</sup> Fibrosis Unit, Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy (FFC#13/2022, new)

### Background and rationale

We have generated apoptotic body-like liposomes (ABL) carrying bioactive lipids that enhance antimicrobial response of macrophages irrespective of pathogen's antibiotic resistance. Impaired macrophage functions in cystic fibrosis (CF) patients have a crucial role in the defective bacterial clearance, which persist despite the therapeutic use of cystic fibrosis Transmembrane conductance Regulator channel (CFTR) modulators, such as Kaftrio.

### Hypothesis and objectives

The main aim of this project is to ameliorate the beneficial effects of Kaftrio, that might be hindered by chronic *Mycobacterium abscessus* (Mab) colonization, by a therapeutic strategy based on ABL/modulator and antibiotics, as a combined host and pathogen-directed approach, which may simultaneously target intracellular and extracellular pathogens and CFTR.

### Essential methods

Primary macrophages derived by CF patients or healthy donors (HD), will be treated or not with CFTR inhibitor, *in vitro* infected or not with clinical Mab strains, and finally will be stimulated with selected ABL/Kaftrio combination and/or amikacin (AMK). Treatments will be evaluated in terms of intracellular mycobacterial killing and pro- and anti-inflammatory cytokine production. The efficacy of the combined treatment will be also evaluated in *in vivo* murine model of chronic infection with clinical Mab strain, in wild type and CF mice, in terms of leukocyte recruitment, pulmonary mycobacterial burden, toxicity and optimal dosage.

### Preliminary results

Our preliminary results show that ABL loaded with selected bioactive lipids combined or not with AMK enhance antimycobacterial response, both in human macrophages from HD treated with pharmacological inhibitor of CFTR and from CF patients. Moreover, the combination treatment with liposomes and/or AMK of wild type mice as well as CF mice, resulted in a significant reduction of both pulmonary mycobacterial burden and inflammatory response.

### Results

The goal of this project is the generation of a novel host- and pathogen- directed therapeutic approach to be used in association with CFTR modulators, to enhance Mab clearance in CF patients by simultaneously limiting pathogenic inflammatory response. Thus, this project aims at generating a novel combination therapy consisting of Kaftrio, selected ABLs and antibiotics for the control of pulmonary drug resistant mycobacterial infections in CF patients.

### Razionale dello studio

Abbiamo sviluppato liposomi simili a corpi apoptotici (ABL) caricati con lipidi bioattivi che sono in grado di migliorare l'uccisione intracellulare limitando la risposta infiammatoria nei confronti di batteri multiresistenti. Inoltre, il difetto nella capacità di "clearance" batterica, osservato nei pazienti con fibrosi cistica (FC), persiste nonostante l'uso di modulatori del regolatore della conduttanza transmembrana della FC (CFTR).

### Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo principale di questo progetto è migliorare gli effetti benefici del Kaftrio, che potrebbero essere ostacolati dalle infezioni batteriche croniche causate da *Mycobacterium abscessus* (Mab), attraverso una strategia terapeutica basata su liposomi bioattivi/Kaftrio e antibiotici, come approccio combinato diretto sia all'ospite e che al patogeno.

### Metodi

Macrofagi primari derivati da pazienti affetti da FC o da controlli, saranno infettati *in vitro* con Mab e infine stimolati con la combinazione liposomi/Kaftrio e/o amikacina (AMK). I trattamenti saranno valutati in termini di uccisione intracellulare di Mab e di modulazione della produzione di citochine infiammatorie. L'efficacia del trattamento combinato sarà inoltre valutata *in vivo* in un modello di topo di infezione cronica causata da un ceppo clinico di Mab.

### Risultati preliminari

I nostri risultati preliminari mostrano che i liposomi caricati con selezionati lipidi bioattivi migliorano la risposta antimicobatterica, sia nei macrofagi di donatori sani esposti all'inibitore farmacologico di CFTR sia nei macrofagi di pazienti con FC, migliorando la maturazione fagosomale. Inoltre, il trattamento con liposomi in topi, infettati cronicamente con Mab, ha determinato una riduzione sia dei micobatteri polmonari che della risposta infiammatoria, che è risultata essere ancora più significativa in presenza del trattamento combinato liposomi e AMK.

### Risultati

L'obiettivo di questo progetto è la generazione di un approccio terapeutico diretto sia all'ospite che al patogeno, che possa essere usato in associazione con il Kaftrio per una migliore risoluzione delle infezioni polmonari croniche nei pazienti con FC, limitando al tempo stesso la risposta infiammatoria. Pertanto, questo progetto mira a generare una nuova terapia combinata composta da Kaftrio, liposomi bioattivi e AMK per il controllo delle infezioni polmonari micobatteriche resistenti ai farmaci nei pazienti con FC.

Genomic and phenotypic characterization of *Mycobacterium abscessus* and detection of host biomarkers to define mycobacterial infection in cystic fibrosis

Caratterizzazione dei ceppi batterici di *Mycobacterium abscessus* italiani e identificazione di biomarcatori dell'ospite per definire l'infezione da micobatteri nella fibrosi cistica



Nicola Ivan Loré (on the left) and his collaborators

**Federico Di Marco<sup>1</sup>, Andrea Spitaleri<sup>1</sup>, Andrea Gramegna<sup>2</sup>, Stefano de Pretis<sup>4</sup>, Fabio Saliu<sup>1</sup>, Francesca Nicola<sup>1</sup>, Lisa Cariani<sup>3</sup>, Antonio Teri<sup>3</sup>, Daniela Girelli<sup>4</sup>, Enrico Tortoli<sup>1</sup>, Stefano Aliberti<sup>5</sup>, Francesco Blasi<sup>2</sup>, Daniela Cirillo<sup>1</sup>, Nicola Ivan Loré<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>2</sup>Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>3</sup>Center for Omics Sciences, IRCCS San Raffaele Institute, Milan, Italy - <sup>4</sup>Cystic Fibrosis Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>5</sup>IRCCS Humanitas Research Hospital, Respiratory Unit, Rozzano, Milan, Italy (FFC#23/2020, concluded; FFC#7/2022, new)

### Background and rationale

Among nontuberculous mycobacteria (NTM), the *Mycobacterium abscessus* complex (MA) are recently rising as emerging pathogens in the cystic fibrosis (CF) population. CF patients with occurrence of MA on sputum cultures might display heterogeneous clinical outcomes, ranging from asymptomatic colonization to progressive pulmonary disease (MA-PD). Thus, the development of new reliable biomarkers is among the unmet needs for the clinical management in this population.

### Hypothesis and objectives

We aimed at: (i) identifying pathogenicity of CF MA strains isolated from patients with CF and chronic occurrence of MA at different stage of disease; (ii) determining unique blood immune signatures associated with the risk of MA-PD.

### Essential methods

(i) We collected longitudinal MA strains isolated from patients both at the early phase of chronic colonization and during MA-PD. Phenotypic (rough and smooth phenotype) analysis and bacterial genomic sequencing were performed. Then, we evaluated the pathogenic potential of these CF isolated in vitro exploiting CF pulmonary epithelial cells. The host cytotoxicity, transcriptomic immune response and a panel of eight pro-inflammatory cytokines induced by clinical isolates have been evaluated.

(ii) Moreover, an observational study was set up collecting blood samples from MA infected patients with or without the risk of PD in order to determine blood single cell transcriptomic signatures.

### Results

We observed that rough strains are mainly isolated in patients at risk of MA-PD. Exploiting our in vitro model of CF epithelial-MA interaction, we determined that rough strains show a significantly higher cytotoxicity and higher secretion of IL-8 and IL-6 pro-inflammatory cytokines in comparison to the smooth bacterial isolates. In vitro host transcriptomic immune response confirmed that rough strains sustain a higher pro-inflammatory activity than smooth strains.

In the second aim we collected blood samples from the designed cohort of CF patients at risk of pulmonary disease. By single cells RNA-seq, we identified a potential transcriptomic signature in monocytic clustered cells associated with the risk of MA-PD.

### Conclusions

The identification of novel candidate biomarkers will represent a step forward for a better clinical profiling of CF patients colonized by MA. Overall, these new biomarkers will better explain the heterogeneity of disease progression observed in CF patients colonized by MA.

### Appendix Project FFC#7/2022

The data obtained will be exploited to: (i) define genomic and phenotypic characteristics of MA Italian strains by Whole Genome Sequencing, including antimicrobial resistance; (ii) validate potential transcriptomic signatures associated with the risk of MA-PD collecting additional biological samples from CF patients.

In particular, we will collect MA strains and related data among different CF centers that currently detect MA strains in Italy, and sampling additional blood samples from MA infected patients with or without the risk of PD.

Overall, this project will (i) determine the current distribution of MA Dominating Circulating Clone, belonging to Italian CF patients with different clinical outcomes, and (ii) validate novel biomarkers to improve the decision-making processes associated with NTM infection in CF patients.

### Razionale dello studio

Tra i micobatteri non tubercolari (MNT) il *Mycobacterium abscessus* complex (MA), risulta essere tra i patogeni emergenti nei pazienti con fibrosi cistica (FC) a livello europeo.

I pazienti con positività alla coltura di MA mostrano esiti clinici eterogenei, che vanno dalla colonizzazione al declino della funzionalità polmonare, una condizione nota come *MA Pulmonary Disease* (MA-PD). 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 riguardante il trattamento delle infezioni da MA.

### Ipotesi e obiettivi

Lo scopo del nostro studio sarà quello di: (i) definire il possibile ruolo patogeno di MA isolati da pazienti con FC cronicamente infetti a diversi stadi della malattia; (ii) caratterizzare la risposta infiammatoria sistemica associata alla malattia polmonare da MA.

<b>Metodi</b>	(i) Sono stati collezionati ceppi di MA isolati da pazienti con FC cronicamente infetti a diversi stadi della malattia. Su tutti i ceppi è stata eseguita la caratterizzazione fenotipica (mucoso o rugoso) e il sequenziamento del genoma batterico. I potenziali fattori di virulenza dei ceppi di MA sono stati valutati <i>in vitro</i> usando un modello cellulare epiteliale FC. (ii) Inoltre è stato avviato uno studio osservazionale retrospettivo che consente di raccogliere campioni biologici da pazienti colonizzati da MA con o senza MA-PD per identificare nuovi biomarcatori usando il sequenziamento dell'RNA di singole cellule (analisi che consentono di valutare espressione genica in singole cellule).
<b>Risultati</b>	È stato osservato che i ceppi con fenotipo “rugoso” sono principalmente isolati in pazienti maggiormente a rischio di MA-PD. In termini di virulenza, le cellule epiteliali FC infettate con i ceppi rugosi risultano avere un maggiore rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-8 e IL-6) e una ridotta vitalità rispetto alle cellule trattate con i ceppi definiti “lisci”. Il sequenziamento dell'intero trascrittoma delle cellule FC trattate con i diversi ceppi clinici ha confermato che i ceppi “rugosi” inducono una maggiore attivazione di profili trascrizionali pro-infiammatori rispetto alle cellule trattate con i ceppi “mucosi”. Per il secondo obiettivo, abbiamo disegnato uno studio osservazionale e l'analisi del trascrittoma a singola delle cellule polimorfonucleate del sangue. Abbiamo identificato nuovi candidati biomarcatori associati all'evoluzione del rischio di sviluppo della patologia polmonare da MA.
<b>Conclusioni</b>	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 da MA, con un potenziale approccio traslazionale nei processi decisionali associati all'infezione da NTM.
<b>Appendice</b> <b>Progetto FFC#7/2022</b>	I dati ottenuti saranno sfruttati per: (i) definire le caratteristiche genomiche e fenotipiche dei ceppi di MA italiani mediante <i>Whole Genome Sequencing</i> , inclusa la resistenza antimicrobica; (ii) validare nuovi marcatori biologici utili a definire la progressione della malattia MA-PD. In particolare, raccoglieremo ceppi di MA e dati correlati tra diversi centri di FC che attualmente rilevano ceppi di MA in Italia e preleveremo ulteriori campioni di sangue da pazienti infetti da MA con o senza rischio di MA-PD. L'obiettivo finale è (i) descrivere la distribuzione e le caratteristiche dei cloni italiani MA dominanti e (ii) definire le diverse fasi della malattia polmonare causata da MA con una possibile futura applicazione anche alle infezioni causate da altri NTM.

## SESSION 10

# Therotyping and primary cells models

*Enhancing the prediction of clinical responses to CFTR modulators by in vitro assays using patient-derived tissues under conditions mimicking native status of CF airways*

Ottimizzazione della previsione delle risposte cliniche ai modulatori della CFTR utilizzando le cellule primarie nasali in condizioni che rispecchiano lo stato infiammatorio del paziente con FC



From the left, Onofrio Laselva, Enza Montemitro and Graziano Pesole

37

**Onofrio Laselva<sup>1</sup>,  
Enza Montemitro<sup>2</sup>,  
Graziano Pesole<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Italy - <sup>2</sup> Pediatric Hospital “Bambino Gesù”, Rome, Italy - <sup>3</sup> Department of Biosciences, Biotechnology and Biopharmaceutics, University of Bari, Italy  
(FFC#6/2021, ongoing)

### Background and rationale

*Chronic infection and inflammation are the primary causes of declining lung function in cystic fibrosis (CF) patients. Orkambi, Symkevi and Kaftrio are approved combination therapy for CF patients carrying at least one F508del allele. However, the clinical effect size is variable patient to patient. It has been previously shown that Orkambi-mediated rescue of CFTR is reduced by clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. Therefore, the patient-to-patient variation in Kaftrio response, might be attributed, in part, to differences in types of microbial infections across patients. Moreover, it has been demonstrated the presence of IL-17A high levels in sputum from CF patients, suggesting the role of IL-17 cytokines in the pathophysiology of CF hyperinflammatory lung disease and bacterial infection.*

### Hypothesis and objectives

*In vitro screening of patient-specific responses to CFTR modulators under infection or inflammation in a relevant preclinical model using primary airway epithelial cells could enhance the prediction of clinical response. In the proposed study we aim to infect primary human nasal epithelial (HNE) cells with clinical strains of P. aeruginosa isolated from the sputum of the corresponding CF patient to mimic what happens in vivo. We will also test the effect of IL-17 cytokines on CFTR modulators to restore the mutated CFTR function in HNE cells. These studies will allow us to comprehend better the role of infection and inflammation in the clinical response to CFTR modulators.*



### Essential methods

We analyzed the efficacy of CFTR modulators in HNE cells infected with clinical strain of *P. aeruginosa* or after treatment with IL-17 cytokines on: (i) functional rescue of mutated CFTR by Ussing Chamber and FLIPR assay; (ii) rescue of protein expression by Western blotting. We will investigate the pro-inflammatory cytokines in HNE cells infected with clinical strain of *P. aeruginosa* by Bio-Plex assay and RNA sequencing.

### Preliminary results

We found that Orkambi-mediated rescue of F508del-CFTR is reduced by clinical strains of *P. aeruginosa* and restored by anti-infectives in HBE cells. Interestingly, we found high expression levels of IL-17 cytokines in F508del-CFTR HBE cells infected with the PAO1 strain. Moreover, treatment with IL-17 cytokines reduced Orkambi-mediated rescue of F508del-CFTR in HBE cells.

### Conclusions

Understanding the role of infection and inflammatory response, that mimics the native status of CF airways, on mutated CFTR rescue by CFTR modulators should provide the basis for optimizing the prediction of clinical responses to CFTR modulators.

### Razionale dello studio

L'infezione cronica e l'infiammazione sono le cause primarie del declino della funzionalità polmonare nei pazienti con fibrosi cistica (FC). Orkambi, Symkevi e Kaftrio sono terapie attualmente approvate per le persone con FC portatrici, almeno su un allele, della mutazione F508del. Complessivamente, la risposta clinica a queste terapie è significativa ma è variabile tra i pazienti trattati. È stato dimostrato che il ripristino di CFTR con F508del indotto da Orkambi è ridotto nelle cellule bronchiali epiteliali (HBE) infettate con i ceppi clinici di *P. aeruginosa*. La variabilità può essere dovuta, in parte, alle differenze nei tipi di infezioni microbiche dei pazienti. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di elevati livelli della citochina IL-17A nell'espettorato di pazienti con FC, suggerendo un suo ruolo nella fisiopatologia della FC.

### Ipotesi e obiettivi

L'uso delle cellule primarie nasali (HNE) in condizioni di infezioni o infiammazione, potrebbe migliorare la previsione della risposta clinica ai modulatori della CFTR. Pertanto, ci proponiamo di studiare l'efficacia dei correttori nel ripristino della CFTR mutata in cellule HNE di pazienti con FC in presenza di ceppi clinici di *P. aeruginosa* isolati dai corrispettivi pazienti. Inoltre, determineremo la quantità di citochine rilasciate, così come l'espressione genica, nelle HNE dopo l'infezione con i ceppi clinici di *P. aeruginosa*. Infine, studieremo l'effetto delle citochine IL-17 nella CFTR mutata ripristinata dai modulatori della CFTR.

### Metodi

Abbiamo studiato l'efficacia dei modulatori di CFTR in cellule HNE infettate da ceppi clinici di *P. aeruginosa* isolati da pazienti con FC stessi oppure trattate con le citochine IL-17 mediante: (i) Ussing chamber e FLIPR per i saggi funzionali; (ii) espressione proteica mediante Western blotting. Inoltre, abbiamo studiato il pathway delle citochine pro-infiammatorie in cellule HNE infettate da ceppi clinici di *P. aeruginosa* mediante *Bio-Plex assay* e *RNA sequencing*.

### Risultati preliminari

Abbiamo dimostrato che l'efficacia di Orkambi nel ripristino della CFTR con F508del è ridotta nelle cellule HBE infettate con i ceppi clinici di *P. aeruginosa*. Inoltre, i livelli di espressione genica delle citochine IL-17 aumentano nelle HBE infettate con PAO1. Infine, il trattamento delle HBE con le citochine IL-17 riduce l'efficacia di Orkambi nel ripristino della CFTR con F508del.

### Conclusioni

La comprensione del ruolo dell'infezione e della risposta infiammatoria, che imita lo stato nativo delle vie aeree di pazienti con FC, sul ripristino della CFTR mutata da parte dei farmaci modulatori dovrebbe fornire la base per ottimizzare la previsione delle risposte cliniche ai modulatori di CFTR.

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

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



Paola Melotti (in the middle) with Karina Kleinfelder (on the right)

38

**Paola Melotti<sup>1</sup>, Marcel Bijvelds<sup>2</sup>,  
Giuseppe Castaldo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Cystic Fibrosis Center, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy - <sup>2</sup> Department of Gastroenterology & Hepatology, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands - <sup>3</sup> CEINGE-Advanced Biotechnologies, Naples, Italy (FFC#9/2020, concluded)

### Background and rationale

CFTR modulators have been approved in Italy for therapy of less than 60% of CF Italian patients. For the others, large clinical trials will not be possible since they carry rare CFTR variants. In these cases *in vitro* models are a promising approach based on personalized medicine for predicting patient's response to drugs.

### Hypothesis and objectives

We hypothesize that *in vitro* response of primary patient-derived cells can be predictive of clinical response in individual CF patients. The goal is to evaluate this hypothesis using intestinal organoids and nasal cells.

### Essential methods

FIS and Isc assays (CFTR function), western blotting (CFTR Protein analysis), QPCR (gene expression).

### Results

We analysed a series of rare genotypes providing evidence of response to CFTR modulators in both nasal and intestinal cells with an excellent correlation among models in a limited series of cases where we could assess both cell types from the same donor. In the same cases clinical response was in line with the prediction of *in vitro* tests. We published our data in 5 congresses and one peer-reviewed journal so far. One full paper has been submitted for publication.

<b>Conclusions</b>	<i>Validation of in vitro models as predictive tools for treatment of CF are providing support for therapies targeting rare genotypes and could become a relevant support to clinicians in specific cases.</i>
<b>Razionale dello studio</b>	I modulatori CFTR sono stati approvati in Italia per la terapia di meno del 60% dei pazienti italiani FC. Per gli altri, grandi studi clinici non saranno possibili poiché essi portano rare varianti CFTR. In questi casi i modelli in laboratorio permettono promettenti approcci di medicina personalizzata per prevedere la risposta del paziente ai farmaci.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Si ipotizza che la risposta in laboratorio delle cellule derivate dal paziente possa essere predittiva della risposta clinica nei singoli pazienti con FC. L'obiettivo è verificare questa ipotesi usando organoidi intestinali e cellule nasali.
<b>Metodi</b>	Saggi FIS e Isc (funzione CFTR), western blotting (analisi delle proteine CFTR), QPCR (espressione genica).
<b>Risultati preliminari</b>	Abbiamo analizzato una serie di genotipi rari fornendo prove di risposta ai modulatori di CFTR nelle cellule nasali e intestinali con un'eccellente correlazione tra modelli in una serie limitata di casi in cui abbiamo avuto la possibilità di valutare entrambi tipi cellulari dello stesso donatore. Negli stessi casi la risposta clinica era in linea con la previsione del test <i>in vitro</i> . Abbiamo divulgato i nostri dati in 5 congressi e pubblicato i risultati di uno studio sottoposto a revisione di esperti nel settore. È stato sottomesso un articolo scientifico per pubblicazione.
<b>Conclusioni</b>	La validazione di modelli <i>in vitro</i> come strumenti predittivi per il trattamento della FC sta fornendo supporto per terapie mirate a genotipi rari e potrebbe diventare rilevante supporto per i clinici in casi specifici.

*Therotyping of cystic fibrosis*  
*Therotyping della fibrosi cistica*



Marco Lucarelli, Adriana Eramo (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> from the right) and their collaborators

39

**Marco Lucarelli<sup>1</sup>, Adriana Eramo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Italy - <sup>2</sup> Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy (**FFC#8/2021, ongoing**)

**Background and rationale**

*Mutation-specific precision therapy of cystic fibrosis (CF) is in clinical use. However, its effectiveness on rare variants and genotypes remains to be evaluated. Drug testing in ex vivo patient-specific cellular models (therotyping) can identify responding pathogenic variants of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), allowing the clinical translation of effective drugs to rare genotypes.*

**Hypothesis and objectives**

*Already used CF modulatory therapies could be effective also on rare CFTR genotypes still untested. In addition, the amount of CFTR to be targeted by correctors and potentiators may be enhanced by amplificatory therapies. The main objective of this proposal is the CF therotyping using the "culture reprogramming condition" approach to obtain patient-derived differentiated nasal airway epithelial stem cells (AESC) and nasal organoids. The cellular response to clinically used CFTR modulators, to a new modulator combination, and to a novel amplificatory strategy are tested, mainly on rare genotypes.*

**Essential methods**

*Differentiated nasal AESC and organoids are generated, validated and characterised for CFTR biochemical, genetic and expression defects. The effectiveness of treatments is evaluated by several functional tests.*

**Preliminary results**

*The patient-specific cellular system in use was completely set up by the applicant group, having obtained, till now, 66 long-term cultures, with 47 different genotypes. In particular, during the first year of the present project, 23 long-term cultures, with 17 different genotypes (11 of which rare) have been obtained and characterised. The CFTR response to Kaftrio and to the new modulator combination of 8 patients with rare genotypes, till now unexplored, and of 5 patients with F508del/F508del genotype have been evaluated, at cellular level. Although with quantitative differences, most genotypes tested responded to Kaftrio and to the new modulator combination, while a minority, including a genotype homozygous for a stop codon, did not respond. The F508del/F508del genotype has been also evaluated for the amplificatory therapy, which was able to enhance CFTR and FOXI (a marker of respiratory epithelium differentiation) gene expression.*

**Conclusions**

*By the end of the present project, additional CF patients, with several different genotypes (in particular rare) will be studied at cellular level for their response to Kaftrio, to the new modulator combination and to the innovative amplificatory strategy. Responding genotypes will be disclosed to the scientific community, with the aim of possible Kaftrio treatment of corresponding patients. The therotyping of CF patients, in particular with rare genotypes, is of great translational impact.*

**Razionale dello studio**

La terapia di precisione mutazione-specifica della fibrosi cistica (FC) è già in uso clinico. Tuttavia, la sua efficacia su varianti e genotipi rari rimane da valutare. Test farmacologici in modelli cellulari paziente-specifici (*therotyping*) possono identificare le varianti patogenetiche del gene CFTR (il regolatore della conduttanza transmembrana responsabile della FC) che rispondono ai trattamenti, consentendo il trasferimento delle terapie efficaci alla pratica clinica anche nei genotipi rari.

## **Ipotesi e obiettivi**

Le terapie modulatorie già usate in FC potrebbero essere efficaci anche sui genotipi rari di CFTR ancora inesplorati. Inoltre, la quantità di proteina CFTR che può essere modulata da correttori e potenziatori può essere aumentata dalle cosiddette terapie amplificatorie. L'obiettivo principale di questo progetto è il *theratyping* della FC, usando cellule nasali (cosiddette riprogrammate) paziente-specifiche, per ottenere cellule staminali epiteliali nasali differenziate (AESC) e organoidi nasali. Su queste cellule e organoidi, principalmente in genotipi rari non studiati finora, viene valutata la risposta a modulatori del CFTR già usati in terapia, a una nuova combinazione di modulatori, nonché a una nuova strategia sperimentale amplificatoria.

## **Metodi**

Le cellule AESC differenziate e gli organoidi vengono generati, validati e caratterizzati per i difetti di CFTR, a livello biochimico, genetico e di espressione. L'efficacia dei trattamenti viene valutata mediante diversi test funzionali.

## **Risultati preliminari**

Il sistema cellulare paziente-specifico in uso è stato in precedenza completamente messo a punto e caratterizzato dal nostro gruppo di ricerca, che ha finora ottenuto 66 colture a lungo termine, con 47 diversi genotipi del CFTR. In particolare durante il primo anno di questo progetto, sono state ottenute 23 colture a lungo termine, con 17 diversi genotipi (11 dei quali rari). La risposta del CFTR al Kaftrio e alla nuova combinazione di modulatori è stata valutata, a livello cellulare, per 8 pazienti con genotipi rari, finora non valutati. Sono inoltre stati valutati anche 5 pazienti con genotipo F508del/F508del. Sebbene con differenze quantitative, gran parte dei genotipi studiati ha risposto al Kaftrio e alla nuova combinazione di modulatori, mentre una piccola parte, incluso un genotipo omozigote per un codone di stop, non ha risposto. Il genotipo F508del/F508del è stato anche valutato relativamente alla terapia amplificatoria, che si è mostrata efficace nell'aumentare l'espressione dei geni CFTR e FOX11 (un marcatore del differenziamento dell'epitelio respiratorio).

## **Conclusioni**

La risposta al Kaftrio, alla nuova combinazione di modulatori, nonché all'innovativa terapia amplificatoria verrà studiata, a livello cellulare, per ulteriori pazienti con FC con diversi genotipi (in particolare quelli rari). I genotipi che mostreranno una risposta saranno resi noti alla comunità scientifica, con l'obiettivo di un possibile trattamento con il Kaftrio dei rispettivi pazienti. Il *theratyping* dei pazienti CF, in particolare con genotipi rari, è di grande impatto traslazionale.

*Theratyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs*

Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani: soddisfare i bisogni insoddisfatti



Nicoletta Pedemonte (in the middle) with her collaborators

40

**Valeria Capurro<sup>1</sup>, Emanuela Pesce<sup>1</sup>, Cristina Pastorino<sup>1</sup>, Valeria Tomati<sup>1</sup>, Federico Cresta<sup>2</sup>, Elvira Sondo<sup>1</sup>, Maria Teresa Lena<sup>1</sup>, Tiziano Bandiera<sup>3</sup>, Luis J. V. Galletta<sup>4</sup>, Carlo Castellani<sup>2</sup>, Renata Bocciardi<sup>1,5</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>2</sup> Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>3</sup> D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - <sup>4</sup> Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>5</sup> Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOGMI), University of Genoa, Italy (FFC#10/2021, ongoing)

## **Background and rationale**

*In Italy, 30% of patients with cystic fibrosis (CF) carry CFTR variants not included among those for which modulators have been approved and are thus defined as “orphan mutations”. Some of them have unknown sensitivity to CFTR modulators, while for others their responsiveness has been demonstrated.*

## **Hypothesis and objectives**

*Our study aims at providing each CF patient with the best therapeutic option available by assessing its responsiveness to the different treatments, thus defining its “theratype”. The project, relying on the use of patients’ nasal epithelial cells is focusing on: (i) understanding the molecular mechanism by which orphan mutations cause CFTR loss of function; (ii) defining their responsiveness to CFTR modulators.*

## **Essential methods**

*Epithelial cells, obtained by nasal brushing, are cultured using a well-established protocol. Approved drugs or compounds under development are tested on nasal epithelia by means of electrophysiological techniques. Molecular analysis of CFTR transcripts is performed by standardized molecular biology procedures; functional and biochemical characterizations are also realized both in native and heterologous systems.*

## **Preliminary results**

*In the previous project, we created a network of collaborating CF centers. In the last year, we have recruited additional 96 donors and primary cultures have been established. For 40 of them drug responsiveness has been already completed. We also characterized patients carrying complex alleles: in some cases, the presence of additional variants was unknown. The molecular characterization of CFTR transcripts we performed was crucial to identify the presence of such additional variants impacting the response to CFTR modulators.*

<b>Conclusions</b>	<i>So far, our study has demonstrated that a significant fraction of Italian patients carries mutations that can be rescued by modulators, and thus they might benefit from treatment with these drugs. Effective modulators have been identified for more than 50% of the patients. CFTR rescue varies from 5% to 80% compared to that measured in non-CF nasal cells. The study also highlighted the existence of poorly responsive mutations and the importance of identifying complex alleles that might alter drug efficacy. Most importantly, our work clearly indicates that the impact of variants on CFTR function and drug responsiveness is critically influenced by the cell background highlighting the crucial value of the functional characterization on patient-derived native cells.</i>
<b>Razionale dello studio</b>	Le mutazioni che causano fibrosi cistica (FC) determinano vari tipi di difetti che portano alla perdita di funzione della proteina CFTR. Molti pazienti sono portatori di mutazioni poco o per nulla studiate (definite orfane), la cui responsività ai modulatori rimane da determinare.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Obiettivo di questo progetto è quello di poter fornire a ogni individuo con FC (in particolare quelli con mutazioni rare o poco studiate) un'opportunità di trattamento attraverso lo sviluppo di modelli cellulari derivati dal paziente che permettano di caratterizzare la mutazione e valutare l'efficacia dei modulatori già disponibili. Da questo punto di vista, le colture primarie di cellule nasali derivate da soggetti FC costituiscono una risorsa preziosissima perché permettono di studiare l'attività di CFTR e l'effetto dei modulatori per ogni singolo paziente.
<b>Metodi</b>	Le cellule epiteliali nasali, ottenute con una procedura non invasiva, sono coltivate e differenziate ovvero "istruite" <i>in vitro</i> ad assumere le caratteristiche che hanno all'interno dell'organismo. L'effetto dei modulatori viene quindi saggiato su queste cellule e studiato da diversi punti di vista: elettrofisiologico, molecolare e biochimico. Anche per queste analisi disponiamo di un'ampia batteria di metodi ben collaudati che ci consentono di ottenere il maggior numero di informazioni possibile.
<b>Risultati preliminari</b>	Nel progetto precedente abbiamo creato una rete di centri FC che collaborano allo studio. In questo anno di lavoro abbiamo continuato a raccogliere i campioni di numerose persone con FC e per oltre la metà di loro siamo già riusciti a definire quali possono beneficiare dei trattamenti disponibili. Abbiamo anche identificato alcune mutazioni che non sono trattabili con i modulatori, per i quali stiamo valutando percorsi di ricerca mirati all'ottimizzazione dei modulatori. Abbiamo infine verificato l'importanza di una caratterizzazione molecolare approfondita di ogni persona con FC per evidenziare la presenza di varianti aggiuntive (alleli complessi) che possano alterare la risposta delle mutazioni ai farmaci in uso.
<b>Conclusionsi</b>	Il nostro studio aiuterà nella definizione di un trattamento personalizzato per le persone con FC, comprese quelle con mutazioni rare, poco caratterizzate. Inoltre, con il nostro lavoro stiamo dimostrando l'importanza di poter usare le cellule nasali derivate dalle persone con FC rispetto ad altri tipi di approcci.

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

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



On the left, Francesca Biavasco (2nd from the left) with her collaborators. On the right, the unit of the Cystic Fibrosis Center at the Ancona Hospital

41

**Gianmarco Mangiaterra<sup>1,2</sup>, Barbara Citterio<sup>2</sup>, Natalia Cirlli<sup>3</sup>, Benedetta Fabrizzi<sup>3</sup>, Marica Iommi<sup>4</sup>, Flavia Carle<sup>4</sup>, Carla Vignaroli<sup>1</sup>, Francesca Biavasco<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy - <sup>2</sup> Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy - <sup>3</sup> Cystic Fibrosis Centre, Department of Gastroenterology and Transplantation, United Hospitals, Ancona, Italy - <sup>4</sup> Center of Epidemiology, Biostatistics and Medical Information Technology, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy (FFC#16/2019, concluded)

### Background and rationale

*Pseudomonas aeruginosa* (Pa) cystic fibrosis (CF) lung infections are characterized by recurrent exacerbation, likely due to the development of persistent and Viable But Non-Culturable (VBNC) cells. Antibiotic treatment may contribute to their induction. In this project we have identified the drugs most involved in the Pa VBNC cell induction and developed a species-specific flow cytometry (FC) assay to detect all viable (i.e. including non-culturable) Pa cells, to support the results obtained by the previously developed *ecfX*-qPCR.

### Hypothesis and objectives

In the project extension we tested the ability of the developed FC assay to detect Pa VBNC forms in the sputum samples of antibiotic-treated CF patients, either experiencing or not pulmonary exacerbation, aiming to validate qPCR results and to correlate the presence of VBNC forms with the infection status (intermittent vs chronic) and antibiotic treatment.

### Essential methods

Fifty sputum samples were recovered at the regional CF Centre from 22 patients at the beginning and at the end of an antibiotic treatment; 13 were from patients treated for an exacerbation. Pa counts were performed by qPCR/FC (total viable) and routine cultural assays (culturable). The infection status and antibiotic therapy were registered. The Wilcoxon and McNemar non-parametric tests were used for statistical analysis.

### Results

FC mostly confirmed the Pa counts obtained by qPCR, thus proving its reliability. VBNC cells were found in 28/50 samples from 15 patients, of which 12 chronic and 6 suffering from exacerbation. No significant correlation ( $p > 0.1$ ) between the presence of VBNC and any of the infection status or a specific antibiotic treatment was found; nevertheless, our results highlighted that: (i) treatment with tobramycin,  $\beta$ -lactams and their combinations increased the VBNC cell amount; (ii) no VBNC form was detected in patients treated with colistin alone and (iii) combinations of colistin, tobramycin or meropenem produced culture-negative/qPCR-positive samples.

### Conclusions

The persistence of a PA VBNC subpopulation seems a feature of chronic patients and its increase, related to the treatment with aminoglycosides and  $\beta$ -lactams, is in agreement with the results previously obtained with Pa *in vitro* biofilms. Finally, the qPCR was confirmed as a reliable approach for the routine microbiological diagnosis, able to provide a comprehensive analysis of the bacterial population.

### Razionale dello studio

Le infezioni polmonari ricorrenti da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) sono associate allo sviluppo di forme persistenti, incluse quelle vitali ma non coltivabili (VBNC). Il trattamento antibiotico potrebbe contribuire alla loro induzione. Tramite saggi *in vitro* ne sono stati identificati alcuni potenzialmente coinvolti ed è stato messo a punto un protocollo specie-specifico di citofluorimetria da affiancare alla qPCR per il rilevamento di tutte le forme vitali di Pa.

### Ipotesi e obiettivi

Sono state usate le tecnologie qPCR e citofluorimetria per rilevare le forme VBNC di Pa in campioni clinici di espettorato, con l'intenzione di valutarne l'uso diagnostico e di correlare la presenza di forme VBNC con il trattamento antibiotico, lo stato infettivo (intermittente/cronico) e la presenza di esacerbazione.

### Metodi

Cinquanta campioni di espettorato da 22 pazienti (13 con esacerbazione) afferenti al Centro regionale fibrosi cistica (FC), sono stati testati per la presenza di Pa VBNC prima e dopo il trattamento antibiotico. Le conte di Pa sono state effettuate tramite saggi di routine (cellule coltivabili) e di qPCR/FC (cellule vitali totali). Per l'analisi statistica sono stati usati test non parametrici di Wilcoxon e McNemar.

### Risultati

I saggi di citofluorimetria hanno prodotto risultati comparabili a quelli di qPCR, confermandone l'affidabilità. La presenza di Pa in stato VBNC è stata rilevata in 28 campioni, da 15 pazienti di cui 12 cronici e 6 con esacerbazione. Non è stata rilevata alcuna significativa correlazione ( $p > 0,01$ ) VBNC/dato clinico, a causa anche della scarsità dei campioni analizzati. Tuttavia, i dati ottenuti hanno evidenziato: (i) un aumento delle forme VBNC di Pa in seguito a trattamento con tobramicina,  $\beta$ -lattamici e loro combinazioni; (ii) la loro assenza in seguito all'uso della sola colistina e (iii) la loro presenza, in assenza di forme coltivabili di Pa, in seguito all'uso di combinazioni colistina e tobramicina o meropenem.

### Conclusioni

La persistenza di forme VBNC di Pa sembra rappresentare un tratto tipico delle infezioni croniche, probabilmente favorito dal trattamento con tobramicina e  $\beta$ -lattamici, in accordo con quanto osservato nei biofilm *in vitro*. La qPCR, supportata dalla citofluorimetria, si conferma una tecnica efficace, da affiancare alla diagnostica di routine, per un'analisi microbiologica più accurata della dinamica dell'infezione polmonare da Pa.



<sup>1</sup>Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>2</sup>Cystic Fibrosis Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>3</sup>Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy  
**(FFC#16/2021, ongoing)**

**Background  
and rationale**

*The recently approved CFTR modulator Kaftrio shows great promise. Although it has enormous potential to improve outcomes in individuals with CF, marked variability in the response to treatment was reported in clinical studies.*

**Hypothesis  
and objectives**

*We hypothesized that Kaftrio alters the nature of *P. aeruginosa* infection by directly acting on bacterial off-targets, thus affecting the efficacy of this new CFTR-directed drug. We aim to identify specific bacterial genetic and phenotypic modifications associated with Kaftrio treatment that may affect CFTR expression and/or antibiotic resistance, and in turn modulate the efficacy of this new therapy.*

**Essential  
methods**

*Longitudinal clonally-related isolates of *P. aeruginosa*, collected from CF patients prior to the initiation and after treatment with Kaftrio, are being characterized for relevant phenotypes (mucoidity, motility, pyocyanin and protease production) and tested for susceptibility to antibiotics by minimum inhibitory concentration assay. Next, the impact of clonal isolates at specific stages of treatment on CFTR are being evaluated on bronchial epithelial wt- and F508del-CFTR cells by western blot.*

**Preliminary  
results**

*So far, we analysed 28 *P. aeruginosa* isolates from 6 CF patients. Patient-specific differences in antimicrobial susceptibility were observed during the treatment with Kaftrio, mostly increases in susceptibility. A general reduction in the motility and pyocyanin production of isolates collected during the treatment with Kaftrio were observed in comparison to the clonal isolates collected prior to the initiation of treatment, despite a certain degree of variability among clonal isolates collected at the same timing. The evaluation of Kaftrio impact on the anti-CFTR activity of *P. aeruginosa* and the collection of clinical data related to the response to the drug is ongoing.*

**Conclusions**

*To date, our results indicate patient-specific differences in the antimicrobial susceptibility and phenotypes of *P. aeruginosa* isolates collected before and during treatment with Kaftrio. The correlation analysis with clinical data will indicate whether these differences may underlie the different degrees of response to Kaftrio observed in patients. The overall results of this project could generate recommendations for the use of Kaftrio, also in combination with antibiotic treatment.*

**Razionale  
dello studio**

I trattamenti convenzionali, mirati alla riduzione delle manifestazioni della fibrosi cistica (FC), sono ora supportati da nuovi approcci terapeutici per correggere e potenziare il CFTR. Sebbene queste nuove terapie, come il Kaftrio, abbiano un enorme potenziale di migliorare lo stato di salute nei soggetti con FC, la risposta clinica è marcatamente variabile, suggerendo attività indipendenti da quelle che esercitano sul CFTR.

**Ipotesi  
e obiettivi**

La nostra ipotesi è che Kaftrio alteri la natura dell'infezione da *P. aeruginosa* agendo direttamente sui batteri, influenzando di conseguenza l'efficacia del farmaco. Ci prefiggiamo di definire se e come Kaftrio influisca sulla suscettibilità agli antibiotici e la virulenza di *P. aeruginosa*.

**Metodi**

Ceppi di *P. aeruginosa*, isolati dagli escreti di pazienti con FC prima e dopo il trattamento con il Kaftrio, sono stati testati per la suscettibilità agli antibiotici e caratterizzati per fenotipi rilevanti in FC (come la mucoicità, la motilità, e la secrezione di proteasi e piocianina). Si sta valutando l'effetto di questi ceppi sull'espressione di CFTR in cellule epiteliali bronchiali con CFTR normale o omozigoti per la mutazione F508del.

**Risultati  
preliminari**

Finora, sono stati testati 28 ceppi di *P. aeruginosa* da 6 pazienti con FC. Sono state osservate differenze, specifiche per ogni paziente, nella suscettibilità agli antibiotici dei ceppi isolati durante e prima del trattamento con il Kaftrio. Inoltre, è stata osservata una riduzione generale di fattori di virulenza quali motilità e produzione di piocianina dei ceppi raccolti durante il trattamento con Kaftrio rispetto ai clonali raccolti prima dell'inizio del trattamento, nonostante un certo grado di variabilità anche tra ceppi clonali raccolti allo stesso tempo. È in corso la valutazione dell'impatto del Kaftrio sull'attività anti-CFTR di *P. aeruginosa* e la raccolta di dati relativi alla risposta clinica al Kaftrio.

**Conclusioni**

I nostri risultati indicano differenze specifiche per ogni paziente nella suscettibilità agli antibiotici e nei fenotipi dei ceppi di *P. aeruginosa* raccolti prima e durante il trattamento con il Kaftrio. L'analisi di correlazione con i dati clinici indicherà se queste differenze possono spiegare il diverso grado di risposta al Kaftrio riscontrato nei pazienti. I risultati complessivi di questo progetto potrebbero generare raccomandazioni per l'uso del Kaftrio in ambito clinico.

Study on anti-fungal immunoglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis

Usare gli anticorpi come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la terapia dell'aspergillosi broncopolmonare allergica nei bambini con fibrosi cistica



Teresa Zelante (2nd from the left) with her collaborators

43

### Teresa Zelante

Department of Medicine and Surgery,  
University of Perugia, Italy (FFC#15/2022, new)

#### Background and rationale

Allergic bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA) has been associated with lung disease severity in children with cystic fibrosis (CF). However, the connections between airway inflammation, lung function impairment and protective immunoglobulin (Ig) responses, remain poorly understood.

#### Hypothesis and objectives

By understanding how the cytokine pattern may affect Ig subclasses, in our project IMMUNO-ASPECT, we may identify not only the induction of non-beneficial IgE responses but also how cytokines may induce anti-fungal IgG subclasses with known anti-inflammatory role, also acting as a non-anaphylactic or 'blocking immunoglobulin' against non-beneficial IgE responses. Therefore, our project aims are: (i) to understand the kinetics and determine the titers of the human antibody repertoires (IgG subclasses and IgE) against *Aspergillus* at different stages of ABPA in pediatric patients; (ii) to identify different cytokine patterns, that are known to correlate with Ig enhancement and disease severity and remission; (iii) results will be finally validated in the ABPA mouse model, where we will investigate which is the cytokine pattern able to shape the protective or non-protective antifungal Ig subclasses.

#### Preliminary results

Our preliminary results show that the interaction of IL-17F with IL-17RC on epithelial cells in the upper airways contributed to inflammatory allergy, induction of IgE responses despite providing protection against local colonizers. These data reveal that the IL-17F/IL-17RC axis warrants further investigation as a therapeutic target for treatment of allergic inflammation of the airways.

#### Conclusions

The titers of antigen specific/total IgG subclasses and IgE will be first determined at different stages of ABPA in pediatric patients with CF. Thus, we will identify panel of epitopes that correlate to antifungal protection. In parallel, we will determine the cytokine pattern induced. In CF mouse model, we will enhance the subclasses generation with cytokine pattern identified.

#### Razionale dello studio

L'aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA) rappresenta una patologia nota per incrementare la gravità dello stato di malattia polmonare nei bambini con fibrosi cistica (FC). Tuttavia, le relazioni tra infiammazione delle vie aeree, compromissione della funzione polmonare e risposte protettive e non delle immunoglobuline (Ig) rimangono poco conosciute.

#### Ipotesi e obiettivi

Il progetto IMMUNOASPECT si basa principalmente sul bisogno di favorire una pronta diagnosi di ABPA nel paziente pediatrico con fibrosi cistica, nonché sull'esigenza di comprendere in maniera più dettagliata come la risposta infiammatoria influisca sulla produzione di classi di anticorpi specifici nei confronti del fungo opportunista *Aspergillus fumigatus*, agente eziologico alla base della patogenesi allergica di ABPA.

In particolare i nostri obiettivi sono: (i) comprendere la cinetica e determinare i titoli dei repertori di anticorpi umani (sottoclassi IgG e IgE) specifici verso *Aspergillus* in diversi stadi di ABPA in pazienti pediatrici; (ii) identificare diversi pattern di citochine, e cercare possibili correlazioni tra il potenziamento delle Ig e la gravità o la remissione della malattia; (iii) i risultati saranno infine validati nel modello di topo di ABPA, dove indagheremo quale sia il pattern di citochine in grado di modulare le sottoclassi di Ig antimicotiche protettive o non protettive.

#### Risultati preliminari

Lo studio proposto si basa sull'evidenza che alti livelli della citochina IL-17F sono presenti sia nel modello di topo preclinico di ABPA così come nei pazienti con FC e correlano positivamente con un peggioramento della patologia. Poiché i membri della famiglia delle citochine dell'IL-17 sono in grado di modulare il rilascio di anticorpi anti-*Aspergillus*, in IMMUNOASPECT vorremmo comprendere in dettaglio il ruolo di alcune citochine nell'indurre anticorpi specifici contro *Aspergillus*.

#### Conclusioni

La comprensione della funzione delle diverse sottoclassi di immunoglobuline specifiche nei confronti del fungo, nonché delle citochine che modulano l'espansione di sottotipi di immunoglobuline, può rappresentare un potente strumento per colmare la difficoltà di diagnosi e terapia di ABPA nel paziente pediatrico con fibrosi cistica. L'obiettivo a lungo termine di IMMUNOASPECT è di progredire nello sviluppo e nel perfezionamento di terapie a base di anticorpi monoclonali per il trattamento di malattie infettive respiratorie. Esistono pochi agenti antimicrobici che controllano le malattie fungine, ed è quindi sempre più evidente la necessità di fronteggiare la crescente incidenza di ceppi antimicotici resistenti di *A. fumigatus*, data la natura complessa di questo patogeno che comporta esiti di malattia talvolta infausti.

Exploring the dual targeting of host and microbial sphingosine-1-phosphate lyase as antimicrobial strategy in cystic fibrosis

Targeting combinato della sfingosina-1-fosfato-liasi dell'ospite e del patogeno come strategia antimicrobica nella fibrosi cistica



Clockwise from the top-left: Emidio Camaioni, Stefano Giovagnoli, Luigina Romani, Barbara Cellini, Lara Macchioni, Teresa Zelante, Magdalena Davidescu, Egidia Costanzi, Gioena Pampalone, Claudia Stincardini, Marina Maria Bellet, Marilena Pariano, Claudio Costantini

44

**Claudio Costantini<sup>1</sup>, Gioena Pampalone<sup>1</sup>, Marilena Pariano<sup>1</sup>, Teresa Zelante<sup>1</sup>, Lara Macchioni<sup>1</sup>, Roberta Galarini<sup>2</sup>, Emidio Camaioni<sup>3</sup>, Fabiola Paoletti<sup>2</sup>, F. Catalano<sup>4</sup>, Magdalena Davidescu<sup>1</sup>, Claudia Stincardini<sup>1</sup>, Marina Bellet<sup>1</sup>, Julie Saba<sup>5</sup>, G. Giardina<sup>4</sup>, Stefano Giovagnoli<sup>3</sup>, Luigina Romani<sup>1</sup>, Barbara Cellini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Italy - <sup>2</sup> Centro Sviluppo e Validazione Metodi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati," Perugia, Italy - <sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Italy - <sup>4</sup> Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli"; Sapienza University of Rome, Italy - <sup>5</sup> Department of Pediatrics, University of California San Francisco, USA (FFC#19/2021, concluded)

### Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) patients suffer a lung function decline caused by the defective function of mutated CFTR, a chronic inflammatory state and recurrent bacterial and fungal infections, such as *Aspergillus fumigatus*. Targeting both inflammation and potential pathogens with a single drug would represent an ideal therapeutic strategy to reduce the high treatment burden of patients and requires the identification of a common pathway in the host and the pathogen whose inhibition would result in antimicrobial and anti-inflammatory activities.

### Hypothesis and objectives

The enzyme sphingosine-1-phosphate (SIP) lyase (SPL) catabolizes SIP in hosts and microbes. CF patients show defects in sphingolipid metabolism and administration of an SPL inhibitor to a mouse model of CF ameliorated the inflammatory response. Conversely, high SIP levels may exert toxic effects in fungi. Thus, dual species - host and *Aspergillus* - SPL inhibitors are expected to induce both antimicrobial and anti-inflammatory activities.

### Essential methods

The identification of potential dual species inhibitors was based on (i) *in silico* studies for the selection of putative drugs, (ii) biochemical testing with purified human and *A. fumigatus* SPL for evaluation of inhibitory activity, (iii) *in vitro* studies with cultures of *A. fumigatus* alone or in co-culture with human bronchial epithelial cells (HBE) from CF patients, and (iv) *in vivo* studies with a murine model of CF with aspergillosis for confirmation of efficacy.

### Results

Inhibition of murine SPL with a specific siRNA confirmed the anti-inflammatory potential of SPL inhibition in a murine model of CF with aspergillosis. In addition, treatment of *A. fumigatus* with *D*-erythro-sphingosine, an SIP precursor, exerted a fungistatic effect *in vitro*. 35 potential dual species inhibitors were identified *in silico* by molecular docking and tested with purified human and *A. fumigatus* SPL. 4 compounds were selected based on their ability to inhibit both human and *A. fumigatus* SPL. The crystallographic structure of unbound human SPL and *A. fumigatus* SPL bound to one of the compounds was obtained. The compound was formulated for testing *in vitro* and *in vivo*.

### Conclusions

Identification of an SPL inhibitor capable of restraining fungal growth and increasing antifungal resistance by binding to pathogen and host SPL is a promising therapeutic approach. Hit optimization is currently underway based on the results of *in vitro* and *in vivo* testing.

### Razionale dello studio

I pazienti con fibrosi cistica (FC) soffrono di un deterioramento delle funzioni respiratorie causato dal malfunzionamento di CFTR, dall'infiammazione cronica e da infezioni ricorrenti da batteri e funghi, come *Aspergillus fumigatus*. Per alleviare il carico terapeutico dei pazienti, sarebbe importante sviluppare farmaci in grado di agire sia sul paziente (antinfiammatori) che sui patogeni (anti-microbici).

### Ipotesi e obiettivi

L'enzima sfingosina-1-fosfato liasi (SPL), coinvolto nel metabolismo dei lipidi e presente sia nell'ospite che nei microbi, rappresenta un potenziale bersaglio. Infatti, bloccando questo enzima in un modello di topo di FC si ottiene un miglioramento del quadro infiammatorio. Al contrario, il blocco di questo enzima nel fungo ha un effetto tossico. Quindi, lo sviluppo di farmaci in grado di bloccare l'attività di SPL sia nel fungo che nel paziente risulterebbe nella duplice attività antimicrobica e antinfiammatoria.

### Metodi

Il progetto richiede metodologie diverse che includono: (i) studi informatici per la selezione di potenziali molecole; (ii) studi biochimici per la valutazione della loro capacità di bloccare l'enzima dell'uomo e del fungo; (iii) studi su modelli più complessi per la valutazione della loro capacità di bloccare la crescita del fungo *in vitro* e di proteggere dall'infezione sia cellule epiteliali bronchiali umane derivate da pazienti con FC che un modello di topo di FC.

### Risultati

Studi preliminari hanno supportato le ragioni dello studio in quanto, da un lato, il blocco dell'attività di SPL ha protetto i topi FC dall'infezione con il fungo e, dall'altro, il trattamento con un lipide che mima il blocco di SPL ha causato un arresto della crescita del fungo. Sono stati identificati 35 potenziali candidati da cui ne sono stati selezionati 4 sulla base dei risultati degli studi biochimici. Di uno di questi è stato confermato il legame con SPL del fungo mediante cristallografia e sono attualmente in corso gli studi sui modelli cellulari e animali.

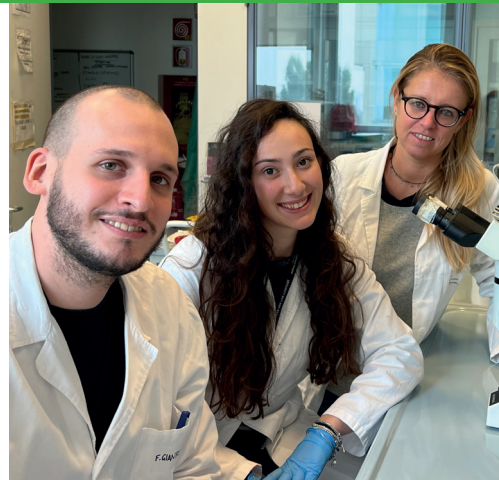


## Conclusioni

I risultati suggeriscono che l'identificazione di un unico farmaco con attività antinfiammatoria e anti-microbica rappresenta un approccio terapeutico promettente. Gli studi in corso forniranno indicazioni sulla efficacia della molecola identificata e sugli opportuni miglioramenti che potranno essere apportati al fine di consentirne l'ulteriore sviluppo verso la realizzazione di un potenziale farmaco per i pazienti con FC.

*Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis models*

Correlare muco-microbiota-genotipo per definire nuovi modelli animali di fibrosi cistica



Alessandra Bragonzi, on the right, and collaborators

45

**Barbara Sipione<sup>1</sup>, Giacomo Rossi<sup>2</sup>, Francesca Sanvito<sup>3</sup>, Alessia Neri<sup>1</sup>, Fabrizio Gianferro<sup>1</sup>, Cristina Cigana<sup>1</sup>, Sofia Tascini<sup>4</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>5</sup>, Alessandra Livraghi<sup>6</sup>, Alessandra Bragonzi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Infection and Cystic Fibrosis Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>2</sup> School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino, Matelica, Italy -

<sup>3</sup> Pathological Anatomy Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>4</sup> Center for Omics Sciences, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>5</sup> UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>6</sup> Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, The University of North Carolina at Chapel Hill, USA  
**(FFC#2/2019, concluded)**

## Background and rationale

*In humans, gene modifiers have been shown to modulate CF lung pathology, but CF animal models that recapitulate the genetic diversity have not been generated. We hypothesized that host genetic background influences CF pathology also in mice.*

## Hypothesis and objectives

*The Collaborative Cross (CC) mice can be leveraged to recapitulate the allelic diversity of the human population. We previously introduced the CFTR-F508del mutation in the CC037 line, selected for its susceptibility to *P. aeruginosa* infection, to generate new CF mice. Here, we aimed to establish whether high allelic diversity impacts the lung phenotype, expression of CFTR and airway ion transport.*

## Essential methods

*The new CFTR-F508del CC037 mice have been explored for phenotypic characterization, whole genome sequence analysis and salivary secretory response in comparison with the existing CFTR-F508del C57BL/6J line.*

## Results

*CFTR-F508del mutation and host genetic background influence survival and body weight. CC037F508del/F508del mice showed more severe lethality and failure to thrive compared to C57BL/6J F508del/F508del, indicating a more dramatic phenotype. The presence of mucus and goblet cells was occasionally observed in the lung of CC037F508del/F508del but with significant variation in the offspring of different breeding pairs. However, CC037F508del/F508del mice exhibit consistent early respiratory inflammatory response with increased neutrophils and infiltrating monocytes, higher cytokine/chemokine profiles (KC, MIP-1 $\alpha$  and IL-17A) compared to wt/wt mice. Myeloperoxidase and neutrophil elastase were also increased supporting neutrophil infiltration and tissue damage in CC037F508del/F508del mice. Pharmacological modulation of salivary secretion was significantly different in CC037 compared to C57BL/6J line for the contribution of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels indicating an influence of host genetic background. Whole genome sequence analysis showed that CC037 strains has the haplotype contributions from six founders (NOD/ShiLtJ, C57BL/6J, A/J129S1/SvImJ, CAST/EiJ, and WSB/EiJ). The CFTR locus was from the NOD/ShiLtJ haplotype and makes this line substantially different from those previously reported in the C57BL/6J background.*

## Conclusions

*These results support the role of host genetics in addition to CFTR mutations as major contributors to CF pathology and underline the need to explore CC lines to generate disease-specific models.*

## Razionale dello studio

Nei pazienti con fibrosi cistica (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. 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.

## Ipotesi e obiettivi

Sfruttando i topi Collaborative Cross (CC) per replicare le variazioni genotipiche/fenotipiche della popolazione umana abbiamo generato un nuovo modello di topo con la mutazione F508del su CFTR. Abbiamo usato questo nuovo modello a confronto con quelli già esistenti per stabilire se il profilo genetico dell'ospite ha un impatto diretto sul fenotipo polmonare, sull'espressione di CFTR e sul trasporto ionico delle vie aeree.

## Metodi

I nuovi topi CFTR-F508del CC037 sono stati caratterizzati fenotipicamente, sequenziati nell'intero genoma e valutati per la risposta secretoria salivare rispetto a modelli di topo già esistenti CFTR-F508del C57BL/6J.

## Risultati

Abbiamo dimostrato che non solo la mutazione CFTR-F508del, ma anche il profilo genetico dell'ospite, possono influenzare la sopravvivenza, il peso e il generale stato di salute. Nonostante la stessa mutazione CFTR-F508del, il profilo genetico CC037 mostra letalità più grave e ridotta crescita rispetto a quello esistente C57BL/6J, indicando un fenotipo più drammatico. Nelle vie aeree, la presenza di muco è stata occasionalmente osservata nel polmone di topi CFTR-F508del CC037 con variazioni significative nella prole di diverse coppie riproduttive. Tuttavia, i topi CFTR-F508del mostrano una risposta infiammatoria respiratoria precoce con aumento dei neutrofili e monociti infiltranti, e profili di citochine/chemochine elevati. Altri parametri inclusa la misurazione di mieloperossidasi e l'elastasi neutrofila indicano l'infiltrazione dei neutrofili e il danno tissutale nei topi CFTR-F508del. La stimolazione farmacologica della secrezione salivare suggerisce che i due profili genetici di tipo, CC037 e C57BL/6J, hanno un contributo simile del CFTR ma diversi per i canali alternativi del cloro. L'analisi della sequenza dell'intero genoma ha mostrato una diversità genetica dei topi CC037 rendendo questa linea sostanzialmente diversa da quelle precedentemente riportate nel profilo genetico C57BL/6J.

## Conclusioni

Questi dati supportano il ruolo chiave del profilo genico dell'ospite in aggiunta alla mutazione CFTR nel determinare la patologia FC. I nuovi modelli di topo FC possono contribuire a studi di base e traslazionali focalizzati sui meccanismi della malattia e sulle cause della variazione fenotipica.

## SESSION 12

# Treatment of pulmonary infection

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

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



Clockwise from the top-left: Natalia Cirilli (2<sup>nd</sup> from the left, group picture), Rosaria Gesuita, Gianmarco Mangiaterra, Silvana Balzani, Luca Tiano, Valentina Tagliabracci, Valentina Schiavoni

46

**Natalia Cirilli<sup>1</sup>, Gianmarco Mangiaterra<sup>2</sup>, Valentina Schiavoni<sup>2</sup>, Valentina Tagliabracci<sup>1</sup>, Rosaria Gesuita<sup>3</sup>, Silvana Balzani<sup>3</sup>, Luca Tiano<sup>2</sup>, Benedetta Fabrizzi<sup>1</sup>, Anastasia D'Antuono<sup>1</sup>, Arianna Peruzzi<sup>1</sup>, Nicholas Cedraro<sup>2</sup>, Flavia Carle<sup>3</sup>, Marco Moretti<sup>4</sup>, Luigi Ferrante<sup>3</sup>, Edlira Skrami<sup>3</sup>, Carla Vignaroli<sup>2</sup>, Francesca Biavasco<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Cystic Fibrosis Centre, Department of Gastroenterology and Transplantation, United Hospitals, Ancona, Italy - <sup>2</sup> Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy - <sup>3</sup> Center of Epidemiology, Biostatistics and Medical Information Technology, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Marche Polytechnic University, Ancona, Italy - <sup>4</sup> Clinical Laboratory United Hospitals, Ancona (FFC#22/2020, ongoing)

## Background and rationale

Chronic lung infections in cystic fibrosis (CF) patients (pts) are characterized by periods of stability interspersed by pulmonary exacerbations. Not all CF patients with a documented chronic lung infection show the same bacteria in the sputum in a long term follow up. Culture-independent community profiling of bacterial strains involved in CF lung disease resulted more reliable than culture-dependent profiling. Recent studies discovered the presence of viable but non culturable (VBNC) forms in the lungs of CF patients.

## Hypothesis and objectives

- (i) To investigate for the presence of VBNC forms in sputum samples of CF patients with chronic lung infection
- (ii) To investigate clinical features of CF patients with chronic lung infection
- (iii) To compare the clinical outcomes and the presence of VBNC forms
- (iv) To estimate the time to reactivation of VBNC forms

## Essential methods

Sputum samples (SS) collected at routine visits (every 2-3 months) from CF patients have been analysed using qPCR to detect *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Achromobacter xylosoxidans* (AX), *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), methicillin sensitive (MSSA) and resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus* VBNC forms.

## Preliminary results

102 pts enrolled: 8 drop outs (1 pt died; 6 pts lost to follow-up; 1 did not produce enough sputum after CFTR modulator therapy). 407 SS from 94 pts exhibited the following trend:

	VBNC + (n)	Sputum culture + (n)
PA	119	142
MSSA	149	162
MRSA	50	20
SM	19	9
AX	21	13

All pathogens were found to be in VBNC status in at least 1 patient. The cultural neg- and qPCR pos+ cases are also of particular interest, indicating the presence of only VBNC forms:

- PA: 19 pts
- MSSA: 17 pts
- MRSA: 19 pts
- AX: 2 pts
- SM: 6 pts

Of interest:

- two pts showed initial negative AX culture with pos+ AX VBNC that shifted to pos+ AX culture after intravenous carbapenems and aminoglycosides that resulted effective against PA and MSSA.

## Conclusions

Although the statistical analysis is still to be completed, these results suggest that forms of VBNC can develop in CF patients with chronic lung infection, survive antibiotic therapy, regain culturability and proliferate, hindering the eradication of the infection. Furthermore, they suggest that antibiotics may promote the transition to VBNC state, capable of recovering cultivability after the end of therapy and confirming the validated qPCR protocol as a sensitive and rapid method alongside culture to improve microbiological monitoring of CF lung disease.

### Razionale dello studio

Le infezioni polmonari croniche nei pazienti con fibrosi cistica (FC) sono caratterizzate da periodi di stabilità intervallati da esacerbazioni polmonari. Non tutti i pazienti con FC con un'infezione polmonare cronica documentata mostrano gli stessi batteri nell'espettorato in un follow-up a lungo termine. Lo studio dei ceppi batterici coinvolti nella malattia polmonare CF con metodi non-colturali è risultato più affidabile rispetto ai metodi colturali. Studi recenti hanno scoperto la presenza di forme vitali ma non coltivabili (VBNC) nei polmoni dei pazienti con FC

### Ipotesi e obiettivi

- (i) Indagare la presenza di forme VBNC in campioni di espettorato di pazienti affetti da FC cronica
- (ii) Indagare le caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da FC cronica in base ai risultati del test per le forme VBNC
- (iii) Analizzare l'associazione tra esiti clinici e risultati del test per le forme VBNC
- (iv) Stimare i tempi di riattivazione delle VBNC

### Metodi

I campioni di sputo di pazienti (paz) arruolati sono stati analizzati con tecniche di biologia molecolare (qPCR) per la presenza di forme VBNC di *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Achromobacter xylosoxidans* (AX), *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), *Staphylococcus aureus* meticillino sensibile (MSSA) e resistente (MRSA).

### Risultati preliminari

102 paz arruolati; 8 drop out (1 paz deceduto, 6 persi al follow-up, 1 paz non ha più prodotto sputo a seguito dell'avvio della terapia con modulatori del CFTR)  
407 campioni di sputo da 94 paz hanno fornito i seguenti risultati:

	VBNC + (n)	Esame colturale + (n)
PA	119	142
MSSA	149	162
MRSA	50	20
SM	19	9
AX	21	13

Tutti i patogeni sono risultati in stato VBNC almeno in un paziente. Di particolare interesse risultano inoltre i casi colturale neg- e qPCR pos+, indicanti la presenza di sole forme VBNC:

- PA: 19 paz
- MSSA: 17 paz
- MRSA: 19 paz
- AX: 2 paz
- SM: 6 paz

Di interesse:

- due pazienti hanno mostrato una coltura AX iniziale negativa con VBNC pos+ AX che è passata a coltura pos+ AX dopo carbapenemi e aminoglicosidi endovenosi che sono risultati efficaci contro PA e MSSA.

### Conclusioni

Nonostante l'analisi statistica sia ancora da completare, questi risultati suggeriscono che le forme di VBNC possono svilupparsi nei pazienti con FC con infezione polmonare cronica, sopravvivere alla terapia antibiotica, riguadagnare la coltivabilità e proliferare, ostacolando l'eradicazione dell'infezione. Inoltre, suggeriscono che gli antibiotici possano favorire il passaggio allo stato VBNC, in grado di recuperare la coltivabilità dopo la fine della terapia e confermare il protocollo qPCR validato come metodo sensibile e rapido accanto alla coltura per migliorare il monitoraggio microbiologico della malattia polmonare FC.

Counteracting inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*-activated lung-infiltrating Th1/17 cells: a novel approach for precision medicine in CF

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

### Background and rationale

Severe and persistent inflammation and *P. aeruginosa* (*Pa*) chronic lung infections are hallmarks of CF disease and represent the main cause of death in CF patients. During infection, *Pa* undergoes a characteristic evolutionary adaptation that, despite leading to the loss of several 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.



Moira Paroni (top left) and collaborators

47

**Gianmarco Conte<sup>1</sup>, Elio Rossi<sup>1</sup>, Irene Dusetti<sup>1</sup>, Alex Costa<sup>1</sup>, Giulio Pavesi<sup>1</sup>, Alessandro Palleschi<sup>3</sup>, Mario Nosotti<sup>3</sup>, Helle Krogh Johansen<sup>2</sup>, Paolo Landini<sup>1</sup>, Moira Paroni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Bioscience, University of Milan, Italy - <sup>2</sup> Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet of Denmark - <sup>3</sup> Thoracic Surgery and Lung Transplantation Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy (FFC#18/2020, concluded)

## Hypothesis and objectives

*So far, anti-inflammatory therapies have mostly proven ineffective, possibly due to their inability to selectively impair the activation of pathogenic components of the immune system. In this respect, the recent identification of a new subset of pathogenic IFN- $\gamma$ /IL-17 co-producing T cells (Th1/17), triggered exclusively in response to clinical pathoadaptive variants of Pa strains, has represented a turning point.*

*In CF lungs, the strong and persistent activation of Th1/17 cells can directly induce epithelial damage by IFN- $\gamma$  production, and also by further increasing neutrophils recruitment through IL-17 secretion, ultimately contributing to the lung injury. However, the interaction mechanisms between Pa and dendritic cells (DCs) that lead to pathogenic Th1/17 cells activation are still largely uncharacterized. Here, we aimed to characterize the role of Th1/17 in CF pathogenesis and the Pa genetic-determinants responsible for pathogenic Th1/17 activation.*

## Essential methods

*We first determined the Th1/17 subsets frequencies in CF and non-CF lung by cytofluorimetric analysis. Pathogenic Th1/17 cells were also characterized both at the functional and gene expression levels. Next, in order to understand which Pa genetic determinants induced the activation of these Th1/17 subsets by interaction with DCs, we analyzed the interplay between clinical Pa strains isolated at different time point during chronic lung infection (early vs late) with human DCs. Clinical Pa strains, able to promote the pathogenic Th1/17 cells activation were characterized through RNA-sequencing.*

## Results

*Among several subsets of IFN- $\gamma$ /IL-17 co-producer T-cells only Th1/17EM cells are significantly and selectively enriched in the lung of CF patients chronically infected with Pa. In particular, the percentage of lung-infiltrating Th1/17EM cells in CF patients chronically infected with Pa were significantly higher than all the other Th1/17 cell subsets. In contrast, the frequency of Th1 cells was significantly decreased in CF lungs compared to non-CF patients, while the frequency of classical lung-infiltrating Th17 cells did not change among analyzed patients, thus confirming a protective function rather than a pathogenic role for these cell subsets. Transcriptomic analysis of lung-infiltrating T cell subsets identified several genes/pathways specifically expressed or upregulated in pathogenic Th1/17 cells isolated from CF lungs.*

*Regarding the interaction between Pa and DCs, we observed that clinical Pa strains persist significantly more than PAO1 and PA14 within DCs inducing higher levels of pro-inflammatory cytokines linked to Th1/17 differentiation. In particular, some clinical adapted Pa strains showed a higher ability to persist within DCs compared to their early clonal isolates, also promoting a further increase of IL-23/IL-1 $\beta$  production. Notably, these Th1/17 cells are more strongly activated by Pa isolates from CF lungs than by laboratory strains, further confirming their potential pathogenic role in CF. Finally, we performed a transcriptomic analysis of clinical Pa strains able to trigger pathogenic Th1/17 cells in order to identify genes/pathways selectively expressed or upregulated in late adapted Pa strains compared to their clonally related early isolates.*

## Conclusions

*The results of this project allowed to elucidate both Th1/17-specific immunological pathways and Pa determinants for their activation, obtaining a list of putative new important bacterial and immunological targets that could be used for the future development of new therapeutic strategies able to prevent the pathogenic inflammation in CF.*

## Razionale dello studio

Le infezioni croniche polmonari causate da *P. aeruginosa* (Pa) insieme alla persistente e severa risposta infiammatoria sono la principale causa di mortalità nei pazienti con fibrosi cistica (FC). Durante la permanenza nel polmone FC Pa va incontro a 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 antinfiammatorie in FC risultano inefficienti e la mancanza di una conoscenza approfondita dei meccanismi molecolari dell'interazione tra Pa e sistema immunitario FC 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 con FC con infezioni croniche di Pa e direttamente coinvolta nel processo di danno polmonare, ha rappresentato un importante punto di svolta.

## Ipotesi e obiettivi

In FC 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. Ciononostante, come i ceppi clinici di Pa interagiscono con le cellule dendritiche (DCs) promuovendo la secrezione di citochine polarizzanti correlate all'attivazione dei linfociti Th1/17 patogenici, non è ancora stato dimostrato. Il principale obiettivo del progetto è quindi quello di definire i fattori di virulenza di Pa responsabili dell'attivazione dei linfociti Th1/17 e il ruolo di questi ultimi nella patogenesi della FC.

## Metodi

Mediante un'analisi immunofenotipica abbiamo quantificato l'infiltrazione delle diverse classi di cellule Th1/17 nel polmone dei pazienti con FC e non-CF. Inoltre, i linfociti Th1/17 patogenici sono stati caratterizzati ulteriormente a livello funzionale e mediante analisi trascrittomiche. Per caratterizzare quali fattori di virulenza Pa fossero coinvolti nell'attivazione delle cellule Th1/17, abbiamo analizzato l'interazione di diversi ceppi clinici clonali di Pa isolati dai polmoni di pazienti con FC a diversi stadi dell'infezione cronica (precoci vs tardivi) con le DCs, sia in termini di persistenza che risposta infiammatoria. I ceppi di Pa in grado di persistere all'interno delle DCs e di indurre la secrezione di specifiche citochine polarizzanti sono stati caratterizzati mediante un'analisi trascrittomiche per identificare i determinanti antigenici coinvolti nell'attivazione dei linfociti Th1/17.

## Risultati

Tra le diverse sottopopolazioni di cellule T che co-producono IFN- $\gamma$ /IL-17 solo i linfociti Th1/17EM risultano significativamente arricchiti nei polmoni dei pazienti con FC con infezione cronica da Pa. Al contrario, la frequenza dei linfociti Th1 risulta significativamente diminuita nei polmoni FC rispetto ai non-FC, mentre la frequenza delle classiche Th17 polmonari non cambia tra i vari gruppi di pazienti analizzati, confermando quindi un ruolo più protettivo per queste cellule nell'immunità della mucosa polmonare. L'analisi trascrittomiche delle Th1/17 infiltranti il polmone ha rivelato diversi geni/pathways selettivamente espressi o upregolati nei linfociti Th1/17EM isolati dai polmoni FC. L'analisi funzionale dell'interazione tra i ceppi clinici di Pa e DCs ha dimostrato che in generale i ceppi clinici di Pa persistono maggiormente all'interno delle DCs rispetto al ceppo di laboratorio PAO1, inducendo inoltre significativi livelli di citochine polarizzanti correlate all'attivazione dei linfociti Th1/17 patogenici. In particolare, alcuni ceppi clinici tardivi mostravano una maggior persistenza all'interno delle DCs, rispetto ai loro clonali precoci, promuovendo un ulteriore aumento nella produzione di citochine pro-infiammatorie polarizzanti correlate all'attivazione dei linfociti Th1/17 patogenici. Inoltre, alcune sottopopolazioni di Th1/17 proliferano significativamente in risposta a ceppi clinici di Pa isolati dopo anni di persistenza nei polmoni FC, ma non in risposta al ceppo di laboratorio PAO1, confermando ulteriormente il loro potenziale ruolo patogenico. Infine, l'analisi trascrittomiche degli isolati clinici di Pa in grado di persistere all'interno delle DCs e promuovere il rilascio di citochine polarizzanti coinvolte nell'attivazione dei linfociti Th1/17 patogenici ha rivelato diversi geni/pathways selettivamente espressi o upregolati rispetto ai loro ceppi clonali precoci.

## Conclusioni

Grazie alla caratterizzazione dei pathway immunologici coinvolti nell'attivazione dei linfociti Th1/17 patogenici in FC, e ai determinanti antigenici di Pa implicati in questi processi, abbiamo individuato nuovi potenziali bersagli che potranno essere usati per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche in grado di prevenire l'infiammazione patogenica agendo a monte sugli stimoli che la innescano.

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

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



Paolo Visca and Raffaella Sorrentino

48

**Paolo Visca<sup>1</sup>, Raffaella Sorrentino<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Science, University of Roma Tre, Rome, Italy - <sup>2</sup> Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, School of Medicine, University of Naples Federico II, Italy (FFC#19/2019, concluded)

## Background and rationale

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-Pa therapies are substantiated by clinical trials showing pharmacokinetics, safety, efficacy and tolerability profiles of intravenously administered Ganite [FDA-approved Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] in CF patients chronically infected by Pa.

## Hypothesis and objectives

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. Pre-clinical study showed a significant increase in Ga(III) at the lung after intratracheal administration compared to the intravenous route<sup>4</sup>. 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 intratracheal administration 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.

## Results

In vitro studies demonstrated that Ga\_Man\_NEM displayed promising anti-Pa activity on a representative collection of 50 Pa CF isolates and enhanced Pa phagocytosis by human macrophages. In vivo studies showed that intratracheal administration of Ga\_Man\_NEM improved Ga(III) persistence in the lungs (the antibacterial therapy target) and reduced accumulation in the kidney (the adverse effect target). Single intratracheal administration of Ga\_Man\_NEM significantly increased the survival of mice challenged with a 70% lethal dose of Pa strains (PAO1, PA14 and LesB58), whereas equi-doses of Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> gave no protection.

## Conclusions

In vitro studies indicate that Ga\_Man\_NEM formulations inhibit Pa growth and promote Pa phagocytosis. In vivo experiments highlighted a promising range of protective efficacy of Ga\_Man\_NEM in murine lethal pneumonia caused by Pa. Our findings hold promise for future clinical application of Ga(III) inhalation therapy in CF patients.

## Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica (FC) incorrono in frequenti infezioni polmonari causate da ceppi di *P. aeruginosa* (Pa) multiresistenti 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 con FC con infezione cronica da Pa hanno dimostrato che la somministrazione intravenosa di Ga(III) risulta efficace e non determina l'insorgenza di effetti collaterali.

## Ipotesi e obiettivi

Nei pazienti con FC la somministrazione di farmaci per via aerosolica è di elezione in quanto comporta una maggiore concentrazione del farmaco nel polmone e ne riduce gli effetti collaterali sistemici. Il nostro progetto prevede uno studio pre-clinico, condotto in modelli di topo, finalizzato a dimostrare l'efficacia di formulazioni inalabili di Ga(III) per contrastare le infezioni polmonari causate da Pa.

## Metodi

La formulazione inalabile di Ga(III) che ha mostrato migliori proprietà aerodinamiche e di rilascio controllato è stata analizzata per le proprietà anti-Pa *in vitro* su una collezione rappresentativa di isolati clinici. Sono in corso studi *in vivo* finalizzati a confrontare la tossicità delle formulazioni di Ga(III) e la loro capacità di proteggere topi da infezioni polmonari da Pa.

## Risultati

L'attività antibatterica della formulazione 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 e aumentano in maniera significativa la fagocitosi di Pa da parte di macrofagi umani. Gli studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione di una formulazione inalabile (denominata Ga\_Man\_NEM) consente un significativo aumento della persistenza del Ga(III) nei polmoni (organi bersaglio della terapia antimicrobica) e una riduzione della presenza di Ga(III) nei reni (organi bersaglio degli effetti tossici). Inoltre, la somministrazione di Ga\_Man\_NEM ha un effetto protettivo sulla sopravvivenza di topi affetti da polmonite indotta da Pa con un effetto marcatamente superiore a Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> attualmente usato in studi clinici.

## Conclusioni

Gli studi *in vitro* dimostrano che le formulazioni inalabili 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 dimostrare l'efficacia e la superiorità della formulazione inalabile Ga\_Man\_NEM rispetto a Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> nelle infezioni polmonari causate da Pa. Questo studio pre-clinico rafforza l'aspettativa di un futuro impiego delle formulazioni inalabili di Ga(III) nel trattamento dell'infezione polmonare da Pa nei pazienti con FC.

*Probiotics: an emerging strategy to fight bacterial pulmonary infections in cystic fibrosis*

Probiotici: una strategia emergente contro le infezioni polmonari in FC



On the left: Giovanna Batoni (2nd from the right). On the right, Arianna Pompilio (in the middle)

49

**Giuseppantonio Maisetta<sup>1</sup>, Arianna Pompilio<sup>2</sup>, Esingül Kaya<sup>1</sup>, Catelli E. <sup>1</sup>, Veronica Lupetti<sup>2</sup>, Emilia Ghelardi<sup>1</sup>, Francesco Celandroni<sup>1</sup>, Diletta Mazzantini<sup>1</sup>, Sabrina Quinti<sup>3</sup>, Matteo Botti <sup>3</sup>, Amalia Negri<sup>3</sup>, Giovanni Di Bonaventura<sup>2</sup>, Semih Esin<sup>1</sup>, Giovanna Batoni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Italy -

<sup>2</sup> Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, G. d'Annunzio University of Chieti-Pescara, Italy -

<sup>3</sup> Support service for cystic fibrosis, Azienda USL Toscana nord-ovest, Livorno, Italy (FFC#13/2021, concluded)

## Background and rationale

*The impact of probiotics on respiratory tract infections has gained growing interest suggesting probiotics supplementation in CF patients as a possible strategy to substitute or complement antibiotic use.*

## Hypothesis and objectives

*We hypothesized that aerosol administration of appropriate probiotic strains may represent an innovative tool for the treatment/prevention of pulmonary infections in CF patients. Several commercial Lactobacillus strains or cell-free supernatants (CFS) thereof were screened for their ability to: (i) grow in experimental conditions resembling CF lung; (ii) inhibit planktonic or biofilm growth of clinical isolates from CF lung; (iii) modulate pathogens' expression of virulence factors; (iv) adhere and inhibit P. aeruginosa adhesion to human lung epithelial cells and exert an anti-inflammatory effect on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC).*

## Essential methods

*Standard microbiological techniques, confocal microscopy, quantitative RT-PCR, and 2D cell culture models were used to accomplish the desired objectives.*

## Results

*Overall, L. rhamnosus and L. plantarum appear promising candidates to survive in the CF lung environment and to compete with P. aeruginosa strains in both planktonic and biofilm mode of growth. L. plantarum showed an interesting ability to interfere with the presence of the extracellular matrix of the biofilm, and to exert a synergistic effect with tobramycin. Acellular supernatants from L. rhamnosus and L. plantarum exhibited a marked antibacterial activity against clinical strains of P. aeruginosa and S. aureus in part, but not exclusively, dependent on their acidity. Although when adjusted at pH 6.0 CFS lost most of their antibacterial potential, they retained antivirulence activity vs P. aeruginosa, largely dependent on Lactobacillus:P. aeruginosa strain combination. L. acidophilus showed the highest adhesive properties to lung epithelial cells and ability to interfere with P. aeruginosa adherence to the same cells by a likely exclusion effect. Lactobacilli strains reduced at different extents the release of pro-inflammatory cytokines PBMC stimulated with P. aeruginosa.*

## Conclusions

*The project identified L. acidophilus, L. rhamnosus and L. plantarum as attractive candidates to address future studies in complex in vitro models and in mice to fully assess their potential for aerosol administration in CF.*

## Razionale dello studio

L'impatto dei probiotici sulle infezioni del tratto respiratorio ha guadagnato un interesse crescente suggerendo l'integrazione di probiotici nei pazienti con fibrosi cistica FC come possibile strategia per sostituire o integrare l'uso di antibiotici.

## Ipotesi e obiettivi

Abbiamo ipotizzato che la somministrazione per aerosol di ceppi selezionati di probiotici possa rappresentare una strategia innovativa per il trattamento/prevenzione delle infezioni polmonari in pazienti con FC. Ceppi commerciali di *Lactobacillus*, o loro supernatanti privi di cellule (CFS) sono stati sottoposti a screening per la loro capacità di: (i) crescere in condizioni sperimentali simili al polmone FC; (ii) inibire la crescita planctonica o del biofilm di isolati clinici da polmone FC; (iii) modulare l'espressione dei fattori di virulenza da parte dei patogeni; (iv) aderire e inibire l'adesione di *P. aeruginosa* a cellule epiteliali polmonari umane ed esercitare un effetto antinfiammatorio su cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC).

## Metodi

Sono state usate tecniche microbiologiche standard, microscopia confocale, RT-PCR quantitativa e modelli di colture cellulari 2D.

## Risultati

*L. rhamnosus* e *L. plantarum* sono risultati candidati promettenti per sopravvivere nell'ambiente polmonare FC-like e per competere con ceppi di *P. aeruginosa* sia in modalità di crescita planctonica che biofilm. *L. plantarum* ha mostrato un'interessante capacità di interferire con la presenza della matrice extracellulare del biofilm e di esercitare un effetto sinergico con la tobramicina. CFS di *L. rhamnosus* e *L. plantarum* hanno mostrato una marcata attività antibatterica contro ceppi clinici di *P. aeruginosa* e *S. aureus* in parte, ma non esclusivamente, dipendente dalla loro acidità. A pH 6 i CSF hanno mantenuto un'attività antivirulenza verso *P. aeruginosa*, dipendente dalla combinazione di ceppi di *Lactobacillus* e *P. aeruginosa* analizzata. *L. acidophilus* ha mostrato le maggiori proprietà adesive alle cellule epiteliali polmonari e capacità di interferire con l'adesione di *P. aeruginosa* alle stesse cellule mediante un probabile effetto di esclusione. I ceppi di lattobacilli hanno ridotto in misura diversa il rilascio di citochine pro-infiammatorie da PBMC umani stimolati con *P. aeruginosa*.

## Conclusioni

Il progetto ha identificato *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum* come candidati interessanti da indirizzare a studi futuri in modelli complessi *in vitro* e nel modello di topo per valutare appieno il loro potenziale clinico nella FC.

Can old and new sweet glycomimetics act as antibacterial and antibiofilm agents in the treatment of CF lung disease infections?

Studio del potenziale antimicrobico di glicomimetici imminosaccaridici nel trattamento di infezioni polmonari da fibrosi cistica



From the left: Annalisa Guaragna, Anna Esposito, Eliana De Gregorio

50

**Annalisa Guaragna<sup>1</sup>,  
Eliana De Gregorio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Chemical, Materials and Production Engineering, University of Naples Federico II, Italy - <sup>2</sup> Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Italy (FFC#13/2020, concluded)

## Background and rationale

Development of novel, safe and effective antibacterial agents is a key goal in cystic fibrosis (CF) drug discovery for ensuring therapeutic benefits to all CF patients. Bacterial infections by *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* complex, and nontuberculous mycobacteria, responsible for the progressive and chronic lung disease, are difficult to treat with available antibiotic therapy. Therefore, the identification of novel agents, chemically different to the conventional drugs, active against CF and multidrug resistant bacteria represent a constant need.

## Hypothesis and objectives

During our previous investigation on the anti-inflammatory potential of iminosugars in CF lung disease, (FFC#22/2015, FFC#23/2018) we observed an intriguing *in vivo* decrease of *P. aeruginosa* bacterial load along with an increase of bacterial clearance in chronically infected mice (FFC#20/2019) treated with *l*-Miglustat, the unnatural enantiomer of the drug *d*-Miglustat. Based on these findings this project has been devoted to synthesize a small library of *l*-Miglustat derivatives, with the aim to explore, by *in vitro* and *in vivo* studies, their potential as antibacterial and antibiofilm agents.

## Essential methods

*l*-Miglustat derivatives have been (i) synthesized with an eco-friendly and scalable procedure; (ii) *in vitro* evaluated as growth inhibitors and antibiofilm agents against a panel of Gram (+) and (-) strains, of *Candida* species and nontuberculous mycobacteria; (iii) tested to assess their safety; (iv) analyzed to explore their ability to correct F508del-CFTR activity; (v) and *in vivo* evaluated on mouse model of acute and chronic lung infection by *P. aeruginosa*.

## Results

Some derivatives showed a very promising antibacterial and antibiofilm activity against most of selected pathogens. The compounds were evaluated as CFTR correctors revealing, in one case, a slight increment in the CFTR activity (i.e. in combination with VX-809). Cytotoxicity assays revealed the safety of all *l*-Miglustat derivatives. After *in vitro* preliminary screening the two most promising *l*-iminosugars, have been *in vivo* evaluated, highlighting a significant antibacterial activity against acute and chronic *P. aeruginosa* infection.

## Conclusions

We identified two promising agents for the treatments of common infections recurring in CF lung disease. Their innovative chemical structure, with new targets and binding sites, compared to those of conventional antibiotics could represent one more weapon in the fight against antibiotic resistance. The results obtained could open the way to a further preclinical evaluation, including ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) studies, to assess the potential of these compounds as novel anti-infective agents in CF lung disease.

### Razionale dello studio

Lo sviluppo di agenti antibatterici nuovi, sicuri ed efficaci è un obiettivo chiave nella scoperta di farmaci utili per tutti i pazienti con FC. Le infezioni batteriche da *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. maltophilia*, *B. cepacia complex* e micobatteri non tubercolari, responsabili della malattia polmonare progressiva e cronica, sono difficili da trattare con la terapia antibiotica disponibile. Pertanto, l'identificazione di nuovi agenti, chimicamente diversi dai farmaci convenzionali rappresenta un'esigenza costante.

### Ipotesi e obiettivi

Precedenti studi volti alla determinazione dell'attività antinfiammatoria di I-Miglustat, l'enantiomero non naturale del farmaco d-Miglustat, (FFC#22/2015, FFC#23/2018) in modelli di topo di infezione cronica da *P. aeruginosa* hanno mostrato un'interessante diminuzione della carica batterica, insieme a un aumento della clearance (FFC#20/2019). Sulla base di questi risultati, questo progetto è stato dedicato alla sintesi di una piccola libreria di derivati di I-Miglustat, con l'obiettivo di esplorare, mediante studi *in vitro* e *in vivo*, il loro potenziale come agenti antibatterici e antibiofilm.

### Metodi

I derivati di I-Miglustat sono stati (i) sintetizzati con una procedura eco-compatibile e scalabile; (ii) valutati *in vitro* come inibitori della crescita e agenti antibiofilm di ceppi Gram positivi e negativi di specie *Candida* e micobatteri non tubercolari; (iii) testati per valutarne la citotossicità; (iv) analizzati per esplorare la loro capacità di correggere l'attività di CFTR con F508del; (v) e valutati *in vivo* su modelli di topo di infezione polmonare acuta e cronica da *P. aeruginosa*.

### Risultati

Alcuni derivati hanno mostrato un'attività antibatterica e antibiofilm molto promettente nei confronti di quasi tutti i patogeni selezionati. I composti sono stati valutati come correttori CFTR rivelando, in un caso, un leggero incremento dell'attività CFTR (solo con VX-809). Tutti i derivati di I-Miglustat non sono risultati citotossici. Dopo uno screening preliminare *in vitro*, i due I-iminozuccheri più promettenti, sono stati valutati *in vivo*, evidenziando una significativa attività antibatterica contro l'infezione acuta e cronica da *P. aeruginosa*.

### Conclusioni

In questo studio, abbiamo identificato due agenti promettenti per il trattamento di infezioni comuni ricorrenti nella malattia polmonare da FC. La loro struttura chimica innovativa, con nuovi bersagli e siti di legame, rispetto a quella degli antibiotici convenzionali potrebbe rappresentare un'arma in più nella lotta alla resistenza agli antibiotici. I risultati ottenuti potrebbero aprire la strada a un'ulteriore valutazione preclinica, compresi gli studi di ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione), per valutare il potenziale di questi composti come nuovi agenti antinfettivi nella malattia polmonare da FC.

## SESSION 13

# Pharmaceutical modulators interaction

Multiomics exploration of the CF primary bronchial epithelium lipidome and its role on CFTR rescue

Esplorazione multiomica del lipidoma dell'epitelio bronchiale primario della FC e del suo ruolo nel recupero di CFTR



Andrea Armirotti with collaborator Nara Liessi

51

### Andrea Armirotti<sup>1</sup>, Elvira Sondo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - <sup>2</sup> UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy (FFC#1/2021, ongoing)

### Background and rationale

The role of lipids in many processes related to CFTR trafficking has been extensively documented. We have carried out a lipidomic investigation on F508del-CFTR CFBE41o- cells treated with a set of CF drugs and we highlighted significant alterations in the sphingolipids metabolism. In another study, with the University of Cambridge we used the same model to assess changes in expression levels and, for the first time, in the subcellular localization of around 5000 proteins of the human bronchial epithelium (BE) treated with VX-809. We discovered an extensive structural reorganization of mitochondria and peroxisomes associated with CFTR rescue and we validated our findings in primary cells.

### Hypothesis and objectives

On this basis, we developed the current project: a multi-omic investigation, focused on F508del-CFTR Vs wild-type primary cells treated with Kaftrio or control. This study will identify changes in the lipidome and proteome of the BE associated with CFTR rescue. The use of BE from subjects carrying compound heterozygous minimal function mutations (MF/MF) will allow us to discriminate between specific effects (related with CFTR rescue) and non-specific effects (related to the drug).

### Essential methods

We obtained and cultured BE cells from 10 subjects homozygous for F508del, 10 non-CF and 4 MF/MF subjects treated with DMSO and Kaftrio (N=5 each), for a total of 240 individual cell cultures. On these samples, four experimental activities will be carried out: (i) a targeted analysis for sphingolipids, (ii) a survey on GM1 metabolism, enabled by the incorporation of 3H-sphingosine, (iii) an untargeted lipidomic profiling and (iv) a proteome-wide expression proteomics experiment.

### Preliminary results

In the first year, we have established the cell cultures from all 24 subjects and we extracted lipids and proteins from all the envisaged 240 samples. We have already analysed all the data for the targeted sphingolipid analysis. Our data confirm our observations on CFBE41o- and highlight new, additional and unexpected alterations. Moreover, we also defined the best experimental conditions for the proteomic profiling and for the GM1 quantification.

### Conclusions

Our study has the ambition to be the most detailed multi-omic investigation of the F508del-CFTR BE undertaken so far: we already have data on changes in the cell chemical space associated with Kaftrio. These results will hopefully lead to the development of new drugs.



## Razionale dello studio

Il ruolo dei lipidi in numerosi processi legati a CFTR è stato ampiamente documentato. In uno studio precedente, abbiamo condotto un'indagine lipidomica su cellule CFBE41o- trattate con farmaci impiegati nella cura della fibrosi cistica (FC) e abbiamo messo in evidenza cambiamenti legati al metabolismo degli sfingolipidi indotti da alcuni di questi farmaci. In un secondo studio, condotto ancora su CFBE41o, in collaborazione con l'Università di Cambridge, abbiamo misurato variazioni nei livelli di espressione e nella localizzazione cellulare di alcune migliaia di proteine in cellule trattate con VX-809. Lo studio ha evidenziato come, a seguito del trattamento con il farmaco, si osserva una significativa riorganizzazione di alcune strutture cellulari.

## Ipotesi e obiettivi

Sulla base dei risultati ottenuti nei precedenti studi è nato il progetto di un'indagine multi-omica su un modello ben più rappresentativo: cellule primarie derivanti direttamente dall'epitelio bronchiale di soggetti FC con F508del. Questo studio consentirà di individuare alterazioni causate dalla malattia, discriminando tra effetti correlati al recupero di CFTR ed effetti legati all'azione del farmaco.

## Metodi

Useremo campioni di epitelio bronchiale derivanti da un totale di 14 soggetti con FC e 10 soggetti senza FC trattati con DMSO e con il Kaftrio, per un totale di 240 colture cellulari. Su questo set di campioni, verranno intraprese una serie di attività sperimentali, volte a rilevare cambiamenti nel profilo lipidico e proteomico di questi soggetti.

## Risultati preliminari

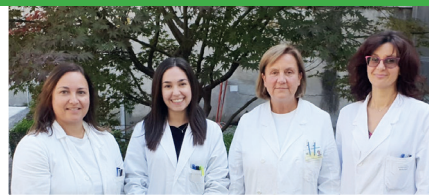
In questo primo anno sono stati raccolti campioni derivanti da tutti e 24 i soggetti e sono stati trattati con il Kaftrio o con il relativo controllo. È stata estratta la componente lipidica e sono stati prodotti i primi set di dati. Dall'analisi sono emerse alterazioni nel contenuto di sfingolipidi che confermano quanto osservato negli esperimenti condotti su cellule CFBE41o-. Inoltre, è stata messa a punto una strategia ben definita per l'indagine proteomica e per la quantificazione di un altro lipide, il GM1, che si è dimostrato avere un ruolo importante nella FC.

## Conclusioni

Lo studio si propone di essere l'indagine multi-omica più dettagliata dell'epitelio bronchiale di soggetti FC intrapresa finora, e mira a mettere in luce meccanismi coinvolti nel recupero di CFTR e possibili effetti off-target del Kaftrio. Questi risultati potranno essere sfruttati, in futuro, per sviluppare nuovi farmaci accessibili a un numero sempre maggiore di pazienti.

### *A lipid-based therapeutic approach to rescue F508del-CFTR and CFTR with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis*

Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con la mutazione F508del e mutazioni orfane e valutazione delle interazioni ospite-patogeno in fibrosi cistica



At the top, from the left, Federica Quiri, Erika Tedesco, Anna Tamanini, Debora Oliosio  
At the bottom, from the left, Laura Mauri, Dorina Dobi, Massimo Aureli, Rosaria Bassi, Nicoletta Loberto

52

**Anna Tamanini<sup>2</sup>, Nicoletta Loberto<sup>1</sup>, Dorina Dobi<sup>1</sup>, Rosaria Bassi<sup>1</sup>, Laura Mauri<sup>1</sup>, Maria Cristina Dechecchi<sup>4</sup>, Debora Oliosio<sup>4</sup>, Erika Tedesco<sup>2</sup>, Giuseppe Lippi<sup>4</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>3</sup>, Giulio Cabrini<sup>4,5</sup>, Massimo Aureli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Section of Molecular Pathology, Department of Pathology and Diagnostics, University Hospital of Verona, Italy - <sup>3</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>4</sup>Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement, Section of Clinical Biochemistry, University of Verona, Italy - <sup>5</sup>Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Italy (FFC#2/2020, concluded; FFC#1/2022, new)



## Background and rationale

The novel combination Kaftrio showed high efficacy in the rescue of F508del-CFTR, but the half-life of the protein is reduced due to the presence of potentiator especially upon the infection with *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Thanks to a previous FFC Ricerca project, an association between the ganglioside GM1 and CFTR has been observed at plasma membrane (PM), suggesting an involvement of GM1 in CFTR stabilization.

## Hypothesis and objectives

The aim of the project was to investigate the role of GM1 or its lyso-derivative LIGA 20 on the effectiveness of Kaftrio on rescuing F508del-CFTR.

## Essential methods

CF bronchial epithelial cells overexpressing F508del-CFTR were fed with different molecular species of GM1 or LIGA20 and treated with Kaftrio. The effects of the treatments were analyzed in terms of sphingolipid (SLs) pattern and as PM level and stability of rescued F508del-CFTR, also in presence of Pa.

## Results

When cells are treated with Kaftrio, the destabilizing effect of VX-770 is limited. Analyzing the SL pattern of treated cells, we found an increased content of gangliosides GM1 and GD1a. These changes are mainly due to a promotion in the activity of the sialyl-transferase and to the inhibition of the sialidase, two key enzymes involved in the ganglioside metabolism.

Exogenous administration of GM1 and LIGA20 ameliorates the effect of Kaftrio in terms of increased levels of the rescued F508del-CFTR at the PM level. By using different molecular species of GM1, we observed that those carrying shorter acyl chains are more effective. Upon infection with Pa, the PM levels of mutated CFTR rescued by Kaftrio are reduced, however this is partially counteracted by the GM1 administration that increases the CFTR stability.

## Conclusions

There are several ongoing clinical trials investigating the therapeutic potential of GM1 in other diseases. Therefore, based on these data, the co-administration of GM1, correctors and potentiators could be considered as an innovative strategy to ameliorate the effectiveness of the modulators on the PM stability of mutated CFTR.

## Appendix Project FFC#1/2022

*The aim of this project is to investigate if exogenous administration of GM1 and cholesterol, both deficient in CF cells, ameliorates the rescue of CFTR with orphan mutations. Further, we intend to study the effect of these lipids on the interaction of P. aeruginosa with the respiratory epithelium. Moreover, inflammatory mediators upon infection of both CF cells and murine models, regardless of the genotype, will be studied.*

### Razionale dello studio

La nuova combinazione Kaftrio ha mostrato un'elevata efficacia nel recupero di CFTR con mutazione F508del, ma l'emivita della proteina risulta ridotta a causa della presenza del potenziatore, soprattutto in presenza di infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Grazie a un precedente progetto FFC Ricerca, è stata osservata un'associazione tra il ganglioside GM1 e CFTR a livello della membrana plasmatica, suggerendo un coinvolgimento di GM1 nella stabilizzazione di CFTR.

### Ipotesi e obiettivi

Lo scopo del progetto è quello di indagare il ruolo di GM1 o del suo liso-derivato LIGA 20 come adiuvanti di Kaftrio nel recupero di CFTR con F508del.

### Metodi

Cellule epiteliali bronchiali overesprimenti CFTR con F508del sono state trattate con diverse specie molecolari di GM1 o LIGA20 e con il Kaftrio. Le cellule trattate sono state analizzate in termini di pattern sfingolipidico e contenuto e stabilità di CFTR a livello della membrana plasmatica, anche in presenza di Pa.

### Risultati

Quando le cellule sono trattate con il Kaftrio, l'effetto destabilizzante di VX-770 è limitato. Analizzando il pattern sfingolipidico delle cellule trattate, abbiamo riscontrato un aumento del contenuto di gangliosidi GM1 e GD1a. Questo è dovuto principalmente a un aumento dell'attività della sialil-transferasi e all'inibizione della sialidasi, due enzimi chiave coinvolti nel metabolismo dei gangliosidi. La somministrazione esogena di GM1 e LIGA20 migliora l'effetto del Kaftrio in termini di aumento dei livelli di CFTR con F508del recuperata a livello della membrana plasmatica. Usando diverse specie molecolari di GM1, abbiamo osservato che quelle con catene aciliche più corte risultano più efficaci. In seguito all'infezione con Pa i livelli di CFTR con F508del recuperata dal Kaftrio si riducono, ma ciò è parzialmente contrastato dalla somministrazione di GM1 che ne aumenta la stabilità.

### Conclusioni

I risultati di questo studio potrebbero rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'associazione di sfingolipidi con correttori e potenziatori per migliorare l'efficacia dei trattamenti nei pazienti con FC, tenendo in considerazione che sia il GM1 che il suo derivato LIGA20 sono già in uso per la cura di altre patologie.

## Appendice Progetto FFC#1/2022

Lo scopo di questo progetto è di indagare se la somministrazione esogena di GM1 e/o colesterolo, entrambi ridotti nelle cellule FC, migliori il recupero della proteina con mutazioni orfane. Inoltre intendiamo studiare l'effetto di questi lipidi sull'interazione di *P. aeruginosa* con l'epitelio respiratorio e sull'attivazione di segnali intracellulari coinvolti nella risposta infiammatoria a seguito dell'infezione, indipendentemente dal genotipo.

*Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del-CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis*

Ottimizzazione di analoghi di MKT-077 come inibitori allosterici di Hsp70 combinati con correttori CFTR F508del: un approccio multi-farmaco per contrastare la fibrosi cistica.



Enrico Millo (in the middle) and his collaborators

53

**Alice Parodi<sup>1</sup>, Emanuela Pesce<sup>2</sup>, Roberto Sabbadini<sup>3</sup>, Cecilia Astigiano<sup>1</sup>, Erfan Asgari<sup>1</sup>, Annalisa Salis<sup>1</sup>, Elena Abbotto<sup>1</sup>, Laura Sturla<sup>1</sup>, Santina Bruzzone<sup>1</sup>, Elena Cichero<sup>3</sup>, Enrico Millo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Experimental Medicine (DIMES), Section of Biochemistry, University of Genoa, Italy -

<sup>2</sup> UOC Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - <sup>3</sup> Department of Pharmacy, Section of Medicinal Chemistry, University of Genoa, Italy (FFC#9/2021, ongoing)

### Background and rationale

*Cystic fibrosis (CF) is a disease caused by mutations in the CFTR gene, encoding a cAMP-regulated chloride channel (CFTR), whose function resulted compromised. Combinations of molecules interacting with other proteins involved in CFTR channel functionality are expected to largely rescue F508del-CFTR activity. The design of compounds targeting the molecular chaperone Hsp70 has been proposed as a strategy to identify drug combinations for the treatment of cystic fibrosis. Hsp70 inhibitors may represent lead compounds for the development of optimized multi-drugs to contrast CF.*

### Hypothesis and objectives

*Combinations of correctors with modulators interacting with molecular chaperones highly related to the CFTR folding and degradation processes, are expected to maximize the therapeutic effect of correctors. The main aim of our project is the rational design of novel MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors with the final goal of identifying new combinations of drugs with improved drug-like properties.*

### Essential methods

*Based on molecular modelling studies and medicinal chemistry strategies, new series of MKT-077 analogues were designed, ranked through in silico screenings and synthesized. The most promising compounds MKT-077 analogues have been evaluated in functional assays on CFBE41o cells expressing F508del-CFTR, in the presence of available CFTR correctors. Next, the mechanism of action as Hsp70 inhibitors of the most effective derivatives has been explored using the human recombinant Hsp70 protein and measuring its ATPase activity.*

### Preliminary results

We synthesized a number of chemical analogues of MKT-077 and evaluated their effects on cells in combination with different correctors. Some of these displayed an increase in efflux by iodide efflux assays when administered with VX8-09 and its analogues. The same molecules were tested by biochemical assays and shown to have an inhibitory effect on the ATPase activity of Hsp70. Our data allow us to consider our compounds as prototypes able to mimic the action of MKT-077 in targeting the Hsp70 protein.

### Conclusions

Several studies have demonstrated that combinations of drugs exhibiting different mechanisms of action are needed to pave the way for more effective therapies. We propose the development of effective Hsp70 inhibitors to be used in combination with correctors. These results will be important for the development of CF therapies.

### Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica causata da mutazioni che compromettono la funzione di CFTR, una proteina necessaria per il trasporto di cloruro nelle cellule epiteliali. La somministrazione di modulatori con diversi meccanismi d'azione, caratterizzati da un effetto additivo e/o sinergico con quello dei correttori classici, è stata dimostrata efficace nel recupero della funzione di CFTR, come dimostrato da saggi su combinazioni tra correttori ed inibitori allosterici di Hsp70.

### Ipotesi e obiettivi

Studi recenti suggeriscono che il recupero efficace della funzionalità del canale CFTR può essere raggiunto con correttori somministrati in presenza d'inibitori allosterici di Hsp70 (per esempio MKT-077). L'obiettivo del nostro progetto è l'identificazione di nuovi inibitori Hsp70 con un ruolo "protettivo" sulla proteina mutata.

### Metodi

L'obiettivo di questo approccio è valutare l'attività funzionale di combinazioni di nuovi inibitori di Hsp70 e correttori di CFTR. Mediante approcci di modellistica molecolare su Hsp70 e di chimica farmaceutica, sono state disegnate nuove serie di analoghi di MKT-077. I più promettenti *in silico* tra questi sono stati sintetizzati e testati su cellule epiteliali bronchiali primarie per valutarne l'efficacia in presenza di VX-809 ed analoghi. Per i composti più efficaci, è stato confermato il meccanismo di azione come inibitori di Hsp70 mediante saggi biochimici.

### Risultati preliminari

A oggi, abbiamo sintetizzato diversi analoghi chimici di MKT-077 e misurato i loro effetti cellulari in combinazione con diversi correttori. Alcuni di questi somministrati con VX-809 e suoi analoghi hanno mostrato un incremento della funzionalità del canale CFTR mediante saggi di efflusso di ioduro. Tali dati ci permettono di considerare alcuni di essi, strutturalmente analoghi a MKT-077, come derivati in grado di mimarne l'azione interagendo con Hsp70, e quindi precursori da ottimizzare.

### Conclusioni

Diversi studi hanno dimostrato come CFTR rappresenti un potenziale bersaglio farmacologico per contrastare la FC. Tuttavia, un approccio combinato e mirato a usare molecole con differenti meccanismi di azione su vari bersagli molecolari è ritenuto efficace nella ricerca di trattamenti terapeutici. Abbiamo identificato inibitori di Hsp70 da associare a correttori tradizionali. Questi risultati saranno importanti per lo sviluppo di terapie per correggere il difetto di base nei pazienti con FC.

### Peptide nucleic acids as a promising CFTR potentiator for the treatment of Cystic fibrosis

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



Felice Amato (in the middle) and his collaborators

54

**Valeria Rachel Vilella<sup>1,2</sup>, Speranza Esposito<sup>2</sup>, Immacolata Zollo<sup>1,2</sup>, Filippo Scialò<sup>2,3</sup>, Federica Zarrilli<sup>1,2</sup>, Monica Gelzo<sup>1,2</sup>, Gustavo Cerna<sup>1,2</sup>, Antonella Miriam Di Lullo<sup>4</sup>, Francesca Ungaro<sup>5</sup>, Giorgia Oliviero<sup>1</sup>, Felice Amato<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Italy - <sup>2</sup> CEINGE-Advanced Biotechnologies, Naples, Italy - <sup>3</sup> Department of Translational Medical Sciences, University of Campania "L. Vanvitelli", Naples, Italy - <sup>4</sup> Department Reproductive Sciences and Dentistry, University of Naples Federico II of Neuroscience, Italy - <sup>5</sup> Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Italy (FFC#1/2020, concluded)

### Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is caused by CFTR protein malfunction. Nowadays, we know that different types of mutations can affect CFTR in many ways since they can influence its production, folding or gating, resulting in various degrees of residual protein activity. The pharmacological treatment available today involves the use of correctors and/or potentiators that can improve CFTR folding or activity. Unfortunately, only patients with specific classes of mutations can benefit from these treatments. Therefore, it is mandatory to pursue the search for new drugs, which alone or in combination with existing ones, can cure/treat all CF patients regardless of the type of mutation.

### Hypothesis and objectives

In addition to the existing therapies, aimed at improving CFTR function by using correctors and/or potentiators, we could develop alternative strategies designed to increase the quantity of CFTR protein. In other words, we would compensate for a reduced activity by increasing the amount of protein present on the membrane. Therefore, we are developing new compounds, amplifiers, that can act on both DNA or RNA molecules, increasing the production of CFTR protein in the cell. Thus, to increase the amount of CFTR protein we will develop: (i) Peptides nucleic acids (PNA), (ii) or analogs (iii) and transcriptional activation system based on the use of modified CRISPR-Cas9. Furthermore, we aim to develop new approaches for the delivery of these molecules in polarized nasal cells obtained from healthy individuals and cystic fibrosis patients.

### Essential methods

Design and synthesis of PNA and /or PNA analogs. Development of biodegradable nanoparticles for their delivery into cellular models. Design and production of plasmids for the expression of CRISPR-Cas9 systems.

### Results

The main results of the study were: (i) the development of nanoparticles to deliver PNA molecules in polarized nasal cells. (ii) increasing of the CFTR expression in CFBE41o- cells using a single plasmid expressing the modified Cas9-VP64 fusion protein, the additional transcriptional coactivators p65 and HSF1 and a guide RNA modified with MS2 RNA aptamers.

### Conclusions

Our results demonstrate that (i) PLGA nanoparticles can reach the nasal epithelium cells by crossing the mucus barrier, one of the main obstacles to aerosol therapy. Therefore, we believe that this type of vehicle can be a valid means for the administration of any PNA-based therapies and can also be used for other types of formulations. (ii) The use of CRISPR activation system represents a promising strategy to increase the expression of CFTR protein as an amplifier approach. Finally, our results have great translational potential for both diagnostic and therapeutic purposes.

### Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) 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 con FC a prescindere dal tipo di mutazione.

### Ipotesi e obiettivi

Oltre a migliorare la forma e la funzione di CFTR 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, chiamati amplificatori, che agendo sul DNA o RNA riescono a far produrre dalle nostre cellule più proteina. L'obiettivo di questo progetto è cercare di aumentare la quantità di proteina CFTR, usando: (i) acidi nucleici peptidici (PNA), (ii) o analoghi, (iii) sistemi di attivazione trascrizionale basati su CRISPR-Cas9. Inoltre, tra gli obiettivi del progetto c'è quello di testare sistemi per veicolare queste molecole all'interno delle cellule, usando un particolare modello cellulare basato su cellule nasali prelevate da soggetti sani e pazienti.

### Metodi

Progettazione e sintesi di PNA e/o analoghi di PNA e loro caricamento in nanoparticelle biodegradabili per la veicolazione in modelli cellulari. Progettazione e produzione di plasmidi per l'espressione di sistemi CRISPR-Cas9

### Risultati

I risultati principali dello studio sono stati: (i) lo sviluppo di nanoparticelle per veicolare molecole di PNA in cellule nasali polarizzate. (ii) aumento dell'espressione di CFTR in cellule CFBE41o- usando un singolo plasmide che esprime la proteina di fusione Cas9-VP64 modificata, i coattivatori trascrizionali aggiuntivi p65 e HSF1 e un RNA guida modificato con aptameri di RNA MS2 per legare regioni specifiche del promotore del gene CFTR.

### Conclusioni

I nostri risultati dimostrano che (i) le nanoparticelle di PLGA possono raggiungere le cellule dell'epitelio nasale attraversando la barriera di muco e il movimento ciliare, principali ostacoli all'aerosol-terapia. Riteniamo pertanto che questo tipo di veicolo possa essere un valido mezzo per la somministrazione di eventuali terapie a base di PNA o per altri tipi di formulazioni. (ii) L'uso del sistema di attivazione CRISPR rappresenta una strategia promettente per aumentare l'espressione della proteina CFTR come approccio amplificatore. Infine, i nostri risultati hanno un grande potenziale traslazionale sia per scopi diagnostici che terapeutici.

*Esculentin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease*

Derivati del peptide esculentina come nuovi agenti terapeutici con attività antimicrobica e potenziatrice di CFTR per il trattamento della patologia polmonare della fibrosi cistica

### Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder due to mutations in the gene encoding the CFTR channel controlling chloride and bicarbonate transport at the apical membrane of epithelia, including those at the airways. The most prevalent mutation is the loss of phenylalanine 508 which severely impairs CFTR trafficking to the cell surface and alters the mechanisms of channel opening. Despite the clinical efficacy of present CFTR modulators in restoring the activity of defective CFTR, there are patients who cannot be treated or show persistent pulmonary infections which remain highly challenging especially in advanced stages of lung disease. In the last years, we identified two antimicrobial peptides (AMPs), Esc peptides, which can accelerate recovery of bronchial epithelium integrity.



Maria Luisa Mangoni (1st from the left) and her collaborators

55

**Maria Luisa Mangoni<sup>1</sup>, Arianna Venturini<sup>2</sup>, Mattia Mori<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Italy - <sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>3</sup>Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy (FFC#4/2022, new)

<b>Hypothesis and objectives</b>	<i>They can reduce lung bacterial burden in C57BL/6 mice with Pseudomonas aeruginosa (the principal pathogen in CF lung) pulmonary infection, upon intratracheal instillation. Very recently we reported on an unprecedented property of AMPs, that is the ability of Esc peptides to act as potentiators of F508del-CFTR.</i>
<b>Essential methods</b>	<i>Based on the hypothesis that Esc peptides hold promise as novel therapeutics, the project aims at (i) studying their effect on the ion currents mediated by other CFTR mutants (including missense G551D or G1349D mutations which impair CFTR channel opening), and the possibility of additive/synergistic effects when combined with other CFTR potentiators; (ii) optimizing their efficacy for the dual (antimicrobial and CFTR potentiator) function and (iii) evaluating the capability of the optimized peptides to preserve antibacterial activity in CF-mimicking lung environment.</i>
<b>Preliminary results</b>	<i>A multidisciplinary approach combining electrophysiological, biochemical, cell biology and computational methods, as well as mouse models for in vivo studies.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>We demonstrated that both Esc peptides are able (i) to increase the CFTR-dependent transepithelial conductance in cell lines expressing F508del, likely by direct interaction with the mutated protein and (ii) to evoke a significant increase of chloride ions current in primary bronchial epithelial cells homozygous for the F508del mutation, by promoting the channel activity. This effect is comparable to that of genistein and closely related to the primary structure of Esc peptides.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>We expect to identify peptides with the ability not only to act as antipseudomonal drugs in CF lung environment but also to rescue the function of CFTR with multiple ion conductance defects. This effect may be enhanced in combination with present CFTR modulators. Overall, our studies will contribute to the development of a novel therapeutic strategy to address pulmonary pathology in CF.</i>

**Razionale dello studio**

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica dovuta a mutazioni nel gene che codifica per la proteina CFTR, un canale anionico che controlla il trasporto di ioni cloruro e bicarbonato sulla membrana degli epitelii, compresi quelli delle vie aeree. La mutazione più diffusa è la perdita di fenilalanina 508 che compromette gravemente la veicolazione di CFTR sulla superficie cellulare ed altera i meccanismi di apertura del canale. Nonostante l'efficacia clinica degli attuali modulatori di CFTR nel ripristinare l'attività della proteina difettosa, ci sono pazienti che non possono essere trattati o che hanno infezioni polmonari persistenti soprattutto negli stadi avanzati della malattia. Negli ultimi anni abbiamo identificato due peptidi antimicrobici (AMP), i peptidi Esc, che sono anche in grado di accelerare il recupero dell'integrità dell'epitelio bronchiale e di ridurre la carica batterica in topi C57BL/6 con infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (quale principale patogeno nel polmone di pazienti con FC), dopo instillazione intratracheale. Recentemente abbiamo scoperto una proprietà senza precedenti degli AMP, ovvero la capacità dei peptidi Esc di agire come potenziatori di F508del.

**Ipotesi e obiettivi**

Essendo i peptidi Esc promettenti candidati per lo sviluppo di nuove terapie, il progetto mira a (i) studiarne l'effetto sulle correnti ioniche mediate da CFTR con altre mutazioni (incluse quelle missenso G551D o G1349D) e valutare possibili effetti additivi/sinergici quando combinati con altri potenziatori di CFTR; (ii) ottimizzare la loro efficacia per la doppia funzione (antimicrobica e potenziatrice di CFTR); (iii) valutare la capacità dei peptidi selezionati di preservare l'attività antibatterica in condizioni che simulano il polmone FC.

**Metodi**

Approccio multidisciplinare con metodi elettrofisiologici, biochimici, di biologia cellulare e computazionali, nonché l'uso di modelli di topo.

**Risultati preliminari**

Abbiamo dimostrato che entrambi i peptidi Esc sono in grado di (i) aumentare la conduttanza transepitheliale dipendente da CFTR in linee cellulari che esprimono F508del in seguito a una diretta interazione con la proteina mutata e (ii) evocare un significativo aumento di corrente di ioni cloruro in cellule bronchiali primarie omozigoti per la stessa mutazione, promuovendo l'attivazione del canale. Questo effetto è paragonabile a quello indotto dal potenziatore genisteina ed è correlato alla struttura primaria dei peptidi Esc.

**Conclusioni**

Ci aspettiamo di identificare peptidi con la capacità non solo di agire come antibiotici nel polmone FC, ma anche di recuperare la funzione di CFTR con diversi difetti di conduttanza. Questo effetto può essere potenziato in combinazione con gli attuali modulatori CFTR. Nel complesso, i nostri studi contribuiranno allo sviluppo di una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia polmonare della FC.

# Appendix 1

Publications from the studies funded by the Italian CF Research Foundation 2012-2022

Pubblicazioni dagli studi finanziati da FFC Ricerca dal 2012 al 2022

## 1. Innovative therapies to correct the basic defect and CFTR genetics

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

*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)*

- 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)

*FFC Project#2/2012 "Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis" Galiotta Luis JV (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Enrico Mollo (Centre of Excellence for Biomedical Research, Università di Genova)*

- Sondo, Elvira et al. "Non-canonical translation start sites in the TMEM16A chloride channel." Biochimica et biophysica acta vol. 1838,1 Pt B (2014): 89-97
- Scudieri, Paolo et al. "Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia." The Journal of physiology vol. 590,23 (2012): 6141-55
- 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
- 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)

*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)*

- Pierandrei S, Truglio G, Ceci F et al. "DNA Methylation Patterns Correlate with the Expression of SCNN1A, SCNN1B, and SC-

NN1G (Epithelial Sodium Channel, ENaC) Genes" Int J Mol Sci. 2021 Apr 4;22(7):3754

- Blaconà G, Raso R, Castellani S et al. "Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) activity in cystic fibrosis cells by epigenetic targeting" Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:257

*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)*

- 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

*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)*

- 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
- 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

*FFC Project#6/2012 "CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpe U1)" Franco Paganini (ICGEB, Trieste)*

- Ubby I, Bussani E, Colonna A et al. "TMEM16A alternative splicing coordination in breast cancer" Molecular Cancer, 2013; 12: 7

*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)*

- Rubino R, Bezzerri 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 subcortical 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
- 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.

**FFC Project#3/2013 “ $\Delta$ F508-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)

- 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 FD2 stimulates F508delcystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in the presence of corrector VX809” *Molecular Medicine Reports* 2017 Dec;16(6):8849-8853

**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)

- Johansson J et al. “Detection of CFTR protein in human Leukocytes by Flow Cytometry” *Cytometry* 2014 Jul;85(7):611-20
- 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

**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)

- 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
- 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

**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)

- 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
- Lentini L, Melfi R, Cancemi P et al. “Caffeine boosts Ataluren’s readthrough activity” *Heliyon* 2019 Jun 21;5(6):e01963

**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)

- Hegde RN. et al. “Unravelling druggable signalling networks that control F508del-CFTR proteostasis” *Elife*, 2015 Dec 23;4

**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, CNR, Genova)

- 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
- Moran O. “The biophysics, biochemistry and physiology of CFTR” *Cell and molecular life sciences* 2017 Jan;74(1):1-2
- Moran O. “The gating of the CFTR channel” *Cell and molecular life sciences* 2017; 74: 85-92

**FFC Project#5/2014 “An RNA based approach based on Ex-SpeU1 for correction of CFTR splicing defects: analysis of efficacy in primary bronchial cells”** Franco Pagani (Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie ICGEB, Trieste)

- 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#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 Traslationale, Università di Brescia, Unità Analisi Interazione Macromolecolare-Sez. di Oncologia Sperimentale e Immunologia), Paola Fossa (Dip. di Farmacia, Genova), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate-Milano)

- 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 strutturalistici 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), Valeria Rachel Vilella (IERFC, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto San Raffaele, Milano)

- 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 Chilin (Dip. di Farmaceutica e Scienze Farmacologiche, Università di Padova)

- Gambari R, Breveglieri G, Salvatori F et al. “Therapy for Cystic Fibrosis Caused by Nonsense Mutations” *Intech Open* 2015, 309-326

**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)

- 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

**FFC Project#26/2014 "Impaired secretory IgA and mucosal immunity in cystic fibrosis: contribution to lung pathology and impaired defence against bacterial infection, and role of CFTR-related epithelial changes in the regulation of the receptor-mediated IgA transcytosis"** Charles Pilette (Université Catholique de Louvain, Brussels), Virginia De Rose (Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino)

- Collin AM, Lecocq M, Noel S et al. "Lung immunoglobulin A immunity dysregulation in cystic fibrosis" *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102974.

**FFC Project#1/2015 "Relationship between mitochondria and F508del-CFTR in Cystic Fibrosis"** Anna Atlante (IBBE Istituto delle Biomembrane e Bioenergetica, CNR Bari)

- Atlante A. et al. "Mitochondria and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dialogue: Some News" *J Bioenerg Biomembr*
- 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, Lassandro 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

**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)

- 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

**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), Lucy Costantino (UOS Lab. di Genetica Medica Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Christian Orrenius (Computational Sciences Chemical Core Technologies Department Nerviano Medical Sciences Srl, Nerviano, Milano)

- 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

**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), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Sezione di Chimica Medica Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche, Università di Genova)

- 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)

- 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
- 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
- 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)

- 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

**FFC Project#1/2016 "New generation trimethylangelicin (TMA) analogues for selective modulation of defective CFTR or inflammation"** Adriana Chilin (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova)

- Lampronti I, Manzione 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
- Vaccarin V, Gabbia D, Franceschinis E et al. "Improved Trimethylangelicin Analogs for Cystic Fibrosis: Design, Synthesis and Preliminary Screening" *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11528.

**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), Roberto Corradini (Dipartimento di Chimica, Università di Parma)

- 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

**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 (Louvain Center for Toxicology and Applied Pharmacology, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique; Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium), 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)

- 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
- Treggiari D, Kleinfelder K, Bertini M et al. "Optical Measurements of Sweat for *in vivo* Quantification of CFTR Function in Individual Sweat Glands" *J Cyst Fibros*. 2021 Sep;20(5):824-827.

**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)

- Hedge RN, Subramanian A, Pothukuchi P et al. "Rare ER protein misfolding-mistrafficking disorders: Therapeutic developments" *Tissue and Cell* 2017 Apr;49(2 Pt A):175-185
- Subramanian A, Capalbo A, Iyengar NR et al. "Auto-regulation of Secretory Flux by Sensing and Responding to the Folded Cargo Protein Load in the Endoplasmic Reticulum" *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1461-1476.e23.

**FFC Project#8/2016 "Identification of the binding sites of CFTR correctors"** Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

- 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)

**FFC Project#10/2016 "Modulation of protein kinase CK2 in the regulation of chaperone machinery leading the F508del-CFTR fate"** Mauro Salvi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova)

- 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)

- Caretti A, Vasso M, Bonezzi FT et al. "Myriocin treatment of CF lung infection and inflammation: complex analyses for enigmatic lipids" *Naunyn 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
- Signorelli P, Pivari F, Barcella M et al. "Myriocin modulates the altered lipid metabolism and storage in cystic fibrosis" *Cell Signal*. 2021 May;81:109928.

**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 "G. Gaslini", Genova)

- Ferrera L, Baroni D, Moran O "Lumacaftor-rescued F508del-CFTR has a modified bicarbonate permeability" *Journal of Cystic Fibrosis* 2019 Feb 6

**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), Zeger Debyser (Lab. for Molecular Virology & Gene Therapy, Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, KU Leuven); Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, CNR, Trento)

- 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 "Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing" *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(11), 3903

**FFC Project#2/2017 "Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue"** Luis JV Galiotta (Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM, Napoli)

- 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), Ivana Pibiri (Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Sez. Biochimica, Università degli Studi di Palermo)

- 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

**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), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Sezione di Chimica Medica Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche, Università di Genova)

- 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
- Liessi N, Pesce E, Salis A et al. "Synthesis and Structure-activity Relationship of Aminoarylthiazole Derivatives as Potential Potentiators of the Chloride Transport Defect in Cystic Fibrosis" *Med Chem*. 2021;17(6):646-657.
- Righetti G, Casale M, Liessi N et al. "Molecular Docking and QSAR Studies as Computational Tools Exploring the Rescue Ability of F508del CFTR Correctors" *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 29;21(21):8084.
- Righetti G, Casale M, Tonelli M et al. "New Insights into the Binding Features of F508del CFTR Potentiators: A Molecular Docking, Pharmacophore Mapping and QSAR Analysis Approach" *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Dec 4;13(12):445.

- Parodi A, Righetti G, Pesce E et al. “Journey on VX-809-based hybrid derivatives towards drug-like F508del-CFTR correctors: from molecular modeling to chemical synthesis and biological assays” *Pharmaceuticals (Basel)* 2022 Feb 23;15(3):274.

*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), Diego di Bernardo (Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università degli Studi di Napoli Federico II)*

- 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
- 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.

*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), Andrea Cavalli (Dip. di Farmacia e Biotecnologie, Università degli Studi di Bologna)*

- 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#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), Antonella Tosco (Dip. di Scienze mediche traslazionali, Università di Napoli Federico II, Centro Regionale Fibrosi Cistica); Eleonora Ferrari (IERFC presso Istituto San Raffaele, Milano)*

- 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#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)*

- 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#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)*

- Braccia C, Tomati V, Caci E et al. “SWATH label-free proteomics for cystic fibrosis research” *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018 Oct 19
- 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
- Liessi N, Pedemonte N, Armirotti A et al. “ArnT inhibitors for Cystic Fibrosis Research” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020 Aug; 21(15): 5439

- Liessi N, Pedemonte N, Armirotti A et al. “Proteomics and Metabolomics for Cystic Fibrosis Research” *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 30;21(15):5439.

*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), Anna Tamanini (Lab. Patol. Molecolare, UOC Laboratorio Analisi, Dip. Patologia e Diagnostica, AOUI Verona )*

- Loberio 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, Loberio N, Olioso 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)*

- 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
- Spanò V, Barreca M, Cilibrasi V et al. “Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein” *Molecules*. 2021 Feb 26;26(5):1275.

*FFC Project#3/2018 “Dissecting the rescue mechanisms mediated by CFTR correctors” Debora Baroni (Ist. Biofisica, CNR, Genova)*

- Brandas C, Ludovico A, Parodi A et al. “NBD2 Is Required for the Rescue of Mutant F508del CFTR by a Thiazole-Based Molecule: A Class II Corrector for the Multi-Drug Therapy of Cystic Fibrosis” *Biomolecules*. 2021 Oct; 11(10): 1417

*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), Vincenzina Lucidi (Ospedale Bambino Gesù, Roma); Hugo de Jonge (Dept. of Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands)*

- Caldrer 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#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)*

- 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, Gambri R, de Cola et al. “Preparation of Anti-miRNAs 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 3'UTR of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) mRNA Enhances CFTR Expression in Calu-3 Cells” *Molecules* 2020 Apr 5;25(7):1677
- Tamanini A, Fabbri E, Jakova T et al. “A Peptide-Nucleic Acid Targeting miR-335-5p Enhances Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ( CFTR) Gene with the Possible Involvement of the CFTR Scaffolding Protein NHERF1” *Biomedicines*. 2021 Jan 26;9(2):117
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. “Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis” *Front Immunol*. 2020 Aug 4;11:1438.
- Papi C, Gasparello J, Zurlo M et al. “Combined Treatment of Bronchial Epithelial Calu-3 Cells with Peptide Nucleic Acids Targeting miR-145-5p and miR-101-3p: Synergistic Enhancement of the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9348.
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. “Overview of CF lung pathophysiology” *Curr Opin Pharmacol*. 2022 Jun;64:102214.

*FFC Project#8/2018 “In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3Kγ-mediated regulation of CFTR” Emilio Hirsch (Università degli Studi di Torino, Dip. Biotecnologia molecolare e Scienze per la Salute, Centro di Biotecnologia Molecolare)*

- 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
- Sala V, Della Sala A, Ghigo A et al. “Roles of phosphatidylinositol 3 kinase gamma (PI3Kγ) in respiratory diseases” *Cell Stress*. 2021 Mar 8;5(4):40-51.

*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)*

- 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
- 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
- Di Rienzo M, Mauro Piacentini M, Fimia GM “A TRIM32-AMBRA1-ULK1 complex initiates the autophagy response in atrophic muscle cells” *Autophagy*. 2019 Sep;15(9):1674-1676
- Di Rienzo M, Romagnoli A, Antonioli M “TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses” *Cell Death Differ*. 2020 Mar;27(3):887-902

*FFC Project#9/2018 “Therapeutic potential of a long-acting lung-specific DNase (DNase2b) for the treatment of CF” Gianfranco Pasut (Università degli Studi di Padova, Dip. Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche), Riccardo Percudani (Università degli Studi di Parma, Dip. Scienze Chimiche, della Vita, e della Sostenibilità ambientale)*

- Delfino D, Mori G, Rivetti C et al. “Actin-Resistant DNase1L2 as a Potential Therapeutics for CF Lung Disease” *Biomolecules*. 2021 Mar 10;11(3):410.
- Mori G, Delfino D, Pibiri P et al. “Origin and significance of the human DNase repertoire” *Sci Rep*. 2022 Jun 20;12(1):10364.

*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)*

- 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

*FFC Project#12/2018 “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 (theratyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches” Adriana Eramo (Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità), Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie Cellulari e Ematologia, La Sapienza, Roma)*

- Sette G, Lo Cicero S, Blaçonà G et al. “Theratyping cystic fibrosis *in vitro* in ALI-culture and organoid models generated from patient-derived nasal epithelial Conditionally Reprogrammed Stem Cells” *Eur Respir J*. 2021 Aug 19;2100908

*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)*

- Caldrelli 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*, submitted

*FFC Project#1/2019 “Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF” Andrea Armirotti (Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)*

- Braccia C, Christopher JA, Crook OM et al. “CFTR Rescue by Lumacaftor (VX-809) Induces an Extensive Reorganization of Mitochondria in the Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium” *Cells* 2022, 11, 1938

*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), Giacomo Rossi (Università di Camerino, Sez. di Patologia Veterinaria)*

- 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

*FFC Project#3/2019 “Harnessing CRISPR/Cas9 technology to revert F508del-CFTR defect” Anna Cereseto (Centro per la Biologia Integrata CIBIO, Università degli Studi di Trento), Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, CNR, Trento)*

- Maule G, Ensíncke M, Bulcaenck M “Rewriting CFTR to cure cystic fibrosis” *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume 182, ISSN 1877-1173

*FFC Project#4/2019 “Restoring defective proteostasis in Cystic Fibrosis: novel strategies for F508del-CFTR repair” Giorgio Cozza (Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. Chimica Biologica)*

- Zanin S, Molinari S, Cozza G et al. “Intracellular protein kinase CK2 inhibition by ferulic acid-based trimodal nanodevice” *Int J Biol Macromol*, 2020 Sep 30;165(Pt A):701-712

*FFC Project#6/2019 “Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue” Luis JV Galiotta (Istituto Telethon di Genetica e Medicina – TIGEM, Pozzuoli, Napoli)*

- 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
- Venturini A, Borrelli A, Musante I et al. “Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11972.
- Galiotta LJV “TMEM16A (ANO1) as a therapeutic target in cystic fibrosis” *Curr Opin Pharmacol.* 2022 Jun;64:102206.

*FFC Project#8/2019 “Antimicrobial peptides from amphibian skin for treatment of lung pathology in cystic fibrosis: advanced in vitro and in vivo functional characterization” Maria Luisa Mangoni (Università La Sapienza Roma, Dip. di Scienze Biochimiche, Lab. di Peptidi Bioattivi)*

- Cappiello F, Carnicelli V, Casciaro B et al. “Antipseudomonal and Immunomodulatory Properties of Esc Peptides: Promising Features for Treatment of Chronic Infectious Diseases and Inflammation” *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 8;22(2):557.
- Ferrera L, Cappiello F, Loffredo MR et al. “Esc peptides as novel potentiators of defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an unprecedented property of antimicrobial peptides” *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021 Dec 31;79(1):67.

*FFC Project#9/2019 “Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNF5 inhibitors” Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto “G. Gaslini”, UOC Genetica Medica, Genova), Andrea Cavalli (Istituto Italiano di Tecnologia, Biologia Computazionale e Chimica, Genova)*

- Pesce E, Pedemonte N, Leoni A et al. “Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives on basic defects underlying cystic fibrosis” *Bioorg Med Chem Lett.* 2020 Nov 1;30(21):127473.
- Capurro V, Tomati V, Sondo E et al. “Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment” *Int J Mol Sci.* 2021 May 17;22(10):5262
- Martina MG, Sannio F, Crespan E et al. “Towards Innovative Antibacterial Correctors for Cystic Fibrosis Targeting the Lung Microbiome with a Multifunctional Effect” *ChemMedChem* 2022, 17, e202200277
- Brusa I, Sondo E, Falchi F et al. “Proteostasis Regulators in Cystic Fibrosis: Current Development and Future Perspectives” *J. Med. Chem.* 2022, 65, 5212–5243
- Sondo E, Cresta F, Pastorino C et al. “The L467F-F508del Complex Allele Hampers Pharmacological Rescue of Mutant CFTR by Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis Patients: The Value of the *Ex vivo* Nasal Epithelial Model to Address Non-Responders to CFTR-Modulating Drugs” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3175.
- Principi E, Sondo E, Bianchi G et al. “Targeting of Ubiquitin E3 Ligase RNF5 as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroectodermal Tumors” *Cancers* 2022, 14, 1802.

*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 Traslazionale Sez. di Oncologia e Immunologia, Università di Brescia), Paola Fossa (Università di Genova, Dip. di Farmacia, Sez. di Chimica del Farmaco e del prodotto cosmetico), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Milano)*

- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20)
- Rusnati M, D’Ursi P, Pedemonte N et al. “Recent Strategic Advances in CFTR Drug Discovery: An Overview” *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 31;21(7):2407.
- Orro A, Uggeri M, Rusnati M et al. “In silico drug repositioning on F508del-CFTR: A proof-of-concept study on the AIFA library” *Eur J Med Chem.* 2021 Mar 5;213:113186.
- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20), 12274

*FFC Project#11/2019 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)*

- Salvi M “Non-Histone Protein Methylation: Molecular Mechanisms and Physiopathological Relevance” *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(7):640-641
- D’Amore C, Borgo G, Salvi M “A mutational approach to dissect the functional role of the putative CFTR “PTM-CODE”” *J Cyst Fibros.* 2021 Sep;20(5):891-894.
- Borgo C, D’Amore C, Sarno S et al. “Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases” *Signal Transduct Ther.* 2021 May 17;6(1):183.
- D’Amore C, Borgo C, Bosello Travain V et al. “KDM2A and KDM3B as Potential Targets for the Rescue of F508del-CFTR” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9612.

*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 Averna (Università di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale), Emilio Marengo (Università del Piemonte Orientale, Dip. di Scienze e Innovazione Tecnologica, Torino)*

- Pedrazzi M, Vercellone S, Barberis E et al. “Identification of Potential Leukocyte Biomarkers Related to Drug Recovery of CFTR: Clinical Applications in Cystic Fibrosis” *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 10;22(8):3928
- Averna M, Melotti P, Sorio C “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” *Cells* 2021, 10, 3380.

*FFC Project#1/2020 “Peptide-nucleic acids as potential CFTR amplifier molecules for cystic fibrosis treatment” Felice Amato (CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Lab. di ricerca in fibrosi cistica)*

- Comegna M, Conte G, Falanga AP et al. “Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles” *Sci Rep.* 2021 Mar 18;11(1):6393.

*FFC Project#6/2020 “Validation of the distribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems” Laura Lentini and Ivana Pibiri (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), University of Palermo, Palermo)*

- Corrao F, Zizzo MG, Tutone M et al. “Nonsense codons suppression. An acute toxicity study of three optimized TRIDs in murine model, safety and tolerability evaluation” *Biomedicine & Pharmacotherapy* in press. October 2022.
- Pibiri I, Melfi R, Tutone M et al. “Targeting nonsense: Optimization of 1,2,4-oxadiazole trids to rescue cftfr expression and functionality in cystic fibrosis cell model systems” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17), pp. 1–18, 6420.
- Tutone M, Pibiri I, Perriera R et al. “Pharmacophore-Based Design of New Chemical Scaffolds as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)” *ACS Medicinal Chemistry Letters Open Access Volume 11, Issue 5, Pages 747 75314 May 2020*

*FFC Project#7/2020 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)*

- Borgo C, D’Amore C, Capurro V et al. “Targeting the E1 ubiquitinactivating enzyme (UBA1) improves elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants” *Cellular and Molecular Life Sciences* (2022) 79:192

**FFC Project#9/2020 “Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators” Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, AOUI Verona)**

- Ciciriello F, Bijvelds JCM, Alghisi F et al. “Therotyping of the Rare CFTR Variants E193K and R334W in Rectal Organoid-Derived Epithelial Monolayers” *J. Pers. Med.* 2022, 12, 632.
- Averna M, Melotti P, Sorio C. “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” *Cells.* 2021 Dec 1;10(12):3380

**FFC Project#11/2020 “Disrupting Pseudomonas aeruginosa Quorum Sensing signalling in cystic fibrosis patients as a new frontier for antibacterial therapy” Paola Brun (Università degli Studi di Padova, Dip. di Medicina Molecolare)**

- Bernabè G, Marzaro G, Di Pietra G et al. “A novel phenolic derivative inhibits AHL-dependent quorum sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*” *Front. Pharmacol.* 13:996871.

**FFC Project#15/2020 “Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis” Mauro Piacentini (Università di Roma Tor Vergata, Dip. di Biologia), Valeria Raia (Università degli Studi di Napoli, Dip. di Scienze Mediche Traslazionali)**

- Occhigrossi L, D’Eletto M, Barlev N et al. “The Multifaceted Role of HSF1 in Pathophysiology: Focus on Its Interplay with TG2” *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 14;22(12):6366
- Occhigrossi L, Rossin R, D’Eletto M et al. “Transglutaminase 2 Regulates Innate Immunity by Modulating the STING/TBK1/IRF3 Axis” *J Immunol.* 2021 May 15;206(10):2420-2429.
- Rossin F, Costa R, Bordi M et al. “Transglutaminase Type 2 regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in vertebrates” *Cell Death Dis.* 2021 Mar 5;12(3):249.
- Alonzi T, Aiello A, Petrone L et al. “Cysteamine with *In vitro* Antiviral Activity and Immunomodulatory Effects Has the Potential to Be a Repurposing Drug Candidate for COVID-19 Therapy” *Cells*, 2022 11:52.
- Alonzi T, Aiello A, Repele F et al. “Cysteamine exerts *in vitro* antiviral activity against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants” *Cell Death Discov.* 8:288.

**FFC Project#14/2020 “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), Vladim Makarov (Federal Research Center, Moscow), Santiago Ramón-García (University of Zaragoza), Enrico Tortoli (Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive HSR, Milano)**

- Degiacomi G, Chiarelli LR, Recchia R et al. “The Antimalarial Mefloquine Shows Activity against *Mycobacterium abscessus*, Inhibiting Mycolic Acid Metabolism” *Int J Mol Sci.* 2021 Aug; 22(16): 8533.
- Egorova A, Jackson M, Gavrilyuk V et al. “Pipeline of anti-*Mycobacterium abscessus* small molecules: Repurposable drugs and promising novel chemical entities” *Med Res Rev.* 2021 Jul;41(4):2350-2387

**FFC Project#9/2021 “Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis” Enrico Millo (Dip. di Medicina Sperimentale DIMES, Università degli Studi di Genova), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Università degli Studi di Genova), Santina Bruzzone (Dip. Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova)**

- Sabbadini R, Pesce E, Parodi A et al. “Probing Allosteric HSP70 Inhibitors by Molecular Modelling Studies to Expedite the Development of Novel Combined F508del CFTR Modulators” *Pharmaceuticals* 2021, 14, 1296.

**FFC Project#10/2021 “Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs” Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova), Renata Boccardi (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova)**

- Pedemonte N “Nasal epithelial cells as a gold-standard predictive model for personalized medicine in cystic fibrosis” *J Physiol.* 2022 Mar;600(6):1285-1286.
- Fossa P et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 14;23(20):12274.
- Sondo E et al. The L467F-F508del Complex Allele Hampers Pharmacological Rescue of Mutant CFTR by Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis Patients: The Value of the Ex Vivo Nasal Epithelial Model to Address Non-Responders to CFTR-Modulating Drugs. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 15;23(6):3175.

**FFC Project#11/2021 “Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect” Paolo Scudieri (Dipartimento di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova), Fabiana Ciciriello (IRCSS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma)**

- Gorrieri G, Zara F, Scudieri P “SLC26A9 as a Potential Modifier and Therapeutic Target in Cystic Fibrosis Lung Disease” *Biomolecules* 2022, 12, 202.

**FFC Project#9/2022 “Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis English version” Luis JV Galieta (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)**

- Guidone D, Buccirosi M, Scudieri P et al. “Airway surface hyper-viscosity and defective mucociliary transport by IL-17/TNF- $\alpha$  are corrected by beta-adrenergic stimulus” *JCI Insight.* 2022

**FFC Project#TFCF “Task Force for Cystic Fibrosis”, Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova), Nicoletta Pedemonte (Lab. Genetica Medica, Istituto G. Gaslini, Genova), Luis JV Galieta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Napoli)**

- 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[4,3b]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

### 3. MICROBIOLOGY

#### Terapie dell’infezione broncopolmonare

**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)**

- Leal T, Bergamini G, Huax 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

**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 “Bambino Gesù”, Roma), Graziana Manno (Dip. di Scienze Pediatriche, Università di Genova)**

- 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)

**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), Mario Varcamonti (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Lab. Microbiologia, Università Federico II, Napoli)

- 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)

- 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)

- Di Lorenzo F. et al. "Persistent cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa* strain RP73 exhibits an under-acylated LPS structure responsible of its low inflammatory activity" *Mol Immunol*. 2014 May 21
- 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
- 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

**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)

- 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

**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)*

- Pierdomenico AM et al. "MicroRNA-181b regulates ALX/FPR2 receptor expression" *J Biol Chem*. 2015 Feb 6;290(6):3592-600

**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), Francesco Imperi (Dip. di Biologia e Biotecnologia, Università "La Sapienza", Roma), Ersilia Fiscarelli (Ospedale e Ist. di ricerca "Bambin Gesù", Lab. Microbiologico fibrosi cistica, Rome)

- 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 azithromycin 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.

**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)

- 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

**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)

- 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
- Ceccherini F. et al. "Antimicrobial activity of levofloxacin-M33 peptide conjugation or combination" *MedChemComm* 2016,7,258

**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)

- 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
- 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

- Loffredo MA, Ghoshb A, Harmouchec N et al “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)

**FFC Project#12/2014 “Inhalable dry powders for chemical-ly-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”)**

- 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

**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)**

- Mardirossian M, Pompilio A, Degasperi 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 Traslationale NTMS Lab. Patologia Generale, Università di Pisa)**

- 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
- Piaggi S, Marchi E, Carnicelli V et al. “Airways glutathione S-transferase omega-1 and its A140D polymorphism are associated with severity of inflammation and respiratory dysfunction in cystic fibrosis” *J Cyst Fibros.* 2021 Feb 11;S1569-1993(21)00033-3.

**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)**

- 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#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)**

- 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

**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)**

- Plebani R, Tripaldi R, Lanuti P et al. “Establishment and long-term culture of human cystic fibrosis endothelial cells” *Laboratory Investigation* 2017 Jul 31
- Totani L, Plebani R, Piccoli A et al “Mechanisms of endothelial cell dysfunction in cystic fibrosis” *Biochimica et Biophysica Acta* 2017 Aug 25

**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 Traslationale, Università di Milano)**

- Aureli M. et al. “Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease” *Chem Phys Lipids* 2016 Aug 31;200:94-103

**FFC Project#10/2015 “A CF, IL-8 transgenic mouse model for the in vivo, long-term monitoring of the antiinflammatory 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)**

- 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.

**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)**

- 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
- 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

**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)**

- 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
- Silvia F, Carrubba R, Santoro S et al. “The Small RNA ErsA Impacts the Anaerobic Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* Through Post-Transcriptional Modulation of the Master Regulator Anr” *Front Microbiol.* 2021 Aug 20
- 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* 2020 Oct 14;5(5):e00909-20

**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)

- 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

**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)

- Brindisi M. et al. "Targeting clinically-relevant metallo- $\beta$ -lactamases: from high-throughput docking to broad-spectrum inhibitors" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*

**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 Spallanzani, Pavia), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia Università degli Studi Federico II, Napoli)

- 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
- 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)
- 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
- 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
- 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

**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), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze Università Bicocca, Milano), Raffaella Sorrentino (Dip. di Farmacia Università Federico II, Napoli)

- 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
- 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)

- 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)

- 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.

**FFC Project#16/2016 "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients"** Daniela Erica Ghisotti (Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano)

- 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

**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)

- 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)

- Lorè NI, Sipione B, He G et al. "Collaborative cross mice yield modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection in human lung disease" *Genome Research*, submitted
- Sipione B, Lorè NI, Rossi G et al. "Phenotypic and genotypic characterisation of a novel mouse model of F508del-CFTR in genetically diverse collaborative cross" 44<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 9–12 June 2021, *J Cystic Fibrosis*, Vol. 20 Supp. 1 (2021)

**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)



- 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
- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiaicca 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

**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)

- 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 5phosphate 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)

- Casciaro B, d'Angelo I, Zhang X et al. "Poly(lactideco-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
- 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
- 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

**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)

- 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
- Gaglione R, Cesaro A, Dell'Olmo E et al. "Cryptides Identified in Human Apolipoprotein B as New Weapons to Fight Antibiotic Resistance in Cystic Fibrosis Disease" Int J Mol Sci. 2020 Mar 17;21(6):2049.

**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)

- Felicietti 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

**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), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca), Raffella Sorrentino (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M et al "Antimicrobial activity of Gallium compounds on ESKAPE pathogens" Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018 Sep 10;8:316

**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), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università degli Studi di Firenze), Nicola Segata (CIBIO, Laboratorio di Metagenomica computazionale, Università di Trento)

- 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.
- Bacci G, Rossi A, Armanini F, et al. "Lung and Gut Microbiota Changes Associated to *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mouse Models of Cystic Fibrosis" Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 12169.

**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)

- 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

**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)

- Cafora M, Defforian 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 Therapy 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)

**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)

- 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)
- Antonelli G "No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis pa-

tients 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
- Bitossi C, Frasca F, Viscido A et al. “SARS-CoV-2 Entry Genes Expression in Relation with Interferon Response in Cystic Fibrosis Patients” Microorganisms, 2021 Jan 3;9(1):93.
- Bitossi C, Viscido A, Prezioso C et al. “High prevalence of Merkel cell polyomavirus is associated with dysregulation in transcript levels of TLR9 and type I IFNs in a large cohort of CF patients from the Italian (Lazio) reference center for cystic fibrosis” Microb Pathog. 2022 Aug;169:105644.

**FFC Project#17/2018 “Drug repurposing for antivirulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*”** Livia Leoni (Università Roma Tre, Dip. Scienze, Lab. Microbiologie dei microrganismi)

- 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 Experimental 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
- Collalto D, Giallonardi G, Fortuna A et al. “In vitro Activity of Antivirulence Drugs Targeting the las or pqs Quorum Sensing Against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Isolates” Front. Microbiol. 2022, 13:845231

**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), Eliodoro Pizzo (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia)

- 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
- Siepi M, Oliva R, Masino A et al. “Environment-Sensitive Fluorescent Labelling of Peptides by Luciferin Analogues” Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 13312.

**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)

- Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR et al. “*Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients” Int J Mol Sci. 2019 Nov 22;20(23):5868.
- Chiarelli LR, Degiacomi G, Egorova A et al. “Nitric oxide-releasing compounds for the treatment of lung infections” Drug Discov Today. 2021 Feb;26(2):542-550.

**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), Alberto Vitali (Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR-ICRM); Michele Iafisco (Istituto di Scienza e Tecnologia dei materiali ceramici ISTECCNR, Faenza), Daniele Catalucci (Istituto di Genetica e Ricerca biomedicale -IRGB, Milano)

- 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
- Bugli F, Martini C, Di Vito M et al. “Antimicrobial peptides for tackling cystic fibrosis related bacterial infections: A review” Microbiological Research 263 (2022) 127152
- Iafisco M, Carella F, Degli Esposti L et al. “Biocompatible antimicrobial colistin loaded calcium phosphate nanoparticles for the counteraction of biofilm formation in cystic fibrosis related infections” J Inorg Biochem. 2022 May;230:111751.

**FFC Project#15/2019 “Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens”** Fiorenza Ascenzi (Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma)

- 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#16/2019 “Fighting *Pseudomonas aeruginosa* persisters in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies”** Francesca Biavasco (Dip. Scienze Ambientali e della Vita, Università Politecnica delle Marche, Ancona)

- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiaicca 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 (Basel). 2020 Jul 10;9(7):399.
- Mangiaterra G, Amiri M, Cedraro N et al. “*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Cystic Fibrosis: The Challenge of Persisters” IntechOpen, *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation, Infections and Treatments, June 9<sup>th</sup> 2021
- Mangiaterra G, Carotti E, Vaiaicca S et al. “Contribution of Drugs Interfering with Protein and Cell Wall Synthesis to the Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: An *In vitro* Model” Int J Mol Sci. 2021 Feb 5;22(4):1628.

**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)

- Veschetti L, Boaretti M, Saitta GM et al. “*Achromobacter* spp. prevalence and adaptation in cystic fibrosis lung infection” Microbiological Research 263 (2022) 127140
- Sandri A, Veschetti L, Saitta GM et al. “*Achromobacter* spp. Adaptation in Cystic Fibrosis Infection and Candidate Biomarkers of Antimicrobial Resistance Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 9265.

**FFC Project#19/2019 “Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery of inhalable formulations to the clinic”** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre), Raffella Sorrentino (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- Visaggio D, Frangipani E, Hijazi S et al. “Variable Susceptibility to Gallium Compounds of Major Cystic Fibrosis Pathogens” ACS Infect Dis. 2022; 8:78-85.
- Mitidieri E, Visaggio D, Frangipani E et al. “Intra-tracheal administration increases gallium availability in lung: implications for antibacterial chemotherapy” Pharmacol Res. 2021; 170:105698

**FFC Project#21/2019 “Preclinical study of a combined hostand pathogen directed approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against *Mycobacterium abscessus* infection”** Maurizio Fraziano (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)

- Nisini R, Oggioni MR, Rossolini GM “Editorial: Exploiting Novel Combined Hostand PathogenDirected Therapies for Combating

Bacterial Multidrug Resistance” *Frontiers in Immunology*, Front Immunol. 2020 Nov 4;11:616486.

- Rinaldi F, Hanieh P, Sennato S et al. “Rifampicin–Liposomes for *Mycobacterium abscessus* Infection Treatment: Intracellular Uptake and Antibacterial Activity Evaluation” *Pharmaceutics*. 2021 Jul 13;13(7):1070.
- Grassi G, Vanini V, De Santis F et al. “PMN-MDSC Frequency Discriminates Active Versus Latent Tuberculosis and Could Play a Role in Counteracting the Immune-Mediated Lung Damage in Active Disease” *Front Immunol*. 2021 Apr 26;12:594376.
- Poerio N, Riva C, Olimpieri T et al. “Combined Host and Pathogen-Directed Therapy for the Control of *Mycobacterium abscessus* Infection” *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0254621.
- Poerio N, Olimpieri T, De Angelis LH et al. “Fighting MDRKlebsiella pneumoniae Infections by a Combined Host and Pathogen-Directed Therapeutic Approach” *Front Immunol*. 2022 Feb 14;13:835417.
- De Santis F, Borrajo Lopez A, Virtuoso S et al. “Phosphatidylcholine Liposomes Down-Modulate CD4 Expression Reducing HIV Entry in Human Type-1 Macrophages” *Front Immunol*. 2022 May 19;13:830788.

**FFC Project#17/2021 “New drug combinations against non-tuberculous mycobacteria infections in cystic fibrosis”** Lanfranco Fattorini (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Malattie infettive, Roma)

- Lanni A, Borroni E, Iacobino A et al “Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions” *Microorganisms*. 2022 Jul 14;10(7):1421

## 4. INFLAMMATION

### Terapie dell’infiammazione polmonare

**FFC Project#14/2012 “Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin 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)

- 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.
- 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
- 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

**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)

- 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

**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)

- 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

**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)

- 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

**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)

- Frioni A. et al. “Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases” *Biomaterials* 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

**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 IRCSS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- 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
- Lorè IN. et al. “IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*” *Sci Rep*. 2016 May 18;6:25937

**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)

- 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)

- 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

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)

- Romano M. et al. “Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation” Eur J Pharmacol. 2015 Aug 5;760:49-63

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)

- 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
- 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

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”)

- Pacello F. et al. “An ERp57-mediated disulphide exchange promotes the interaction between *Burkholderia cenocepacia* and epithelial respiratory cells” Sci Rep. 2016 Feb 16;6:21140

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)

- 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
- Ribeiro CMP, McElvaney NG and Cabrini G “Editorial: Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies” Front. Pharmacol. 12:794854.
- Cabrini G “Innovative therapies for cystic fibrosis: the road from treatment to cure” Molecular Diagnosis & Therapy, 2018 Nov 26
- Rimessi A, Bezzetti 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.

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)

- 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
- Rimessi A, Vitto VAM, Patergnani S et al. “Update on Calcium Signaling in Cystic Fibrosis Lung Disease” Front Pharmacol. 2021 Mar 11;12:581645.

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)

- 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

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)

- 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
- Piliponsky AM, Romani L “The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity” Immunological Reviews 2018 Mar;282(1):188-197
- 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”
- Pariano M, Pieroni S, De Luca A et al. “Anakinra Activates Superoxide Dismutase 2 to Mitigate Inflammasome Activity” Int J Mol Sci. 2021 Jun 18;22(12):6531.
- van de Veerdonk FL, Renga G, Pariano M et al. “Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy” J Clin Invest. 2022 Jan 18;132(2):e144983.
- Pariano M, Costantini C, Santarelli I et al. “Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis” Vaccines 2021, 9, 1311.

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)

- 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

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)

- 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

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 Traslationale Università di Milano)

- 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. “ $\beta$ -Sitosterol Reduces the Expression of Chemotactic Cytokine Genes in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells” *Frontiers in Pharmacology* 2017 May 12;8:236
- 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.

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 Traslationale, Laboratorio di Epatologia Università degli Studi Milano-Bicocca)

- Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V et al “Src kinase inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in  $\Delta$ F508 human cholangiocytes and improves CFTR correctors efficacy” *Hepatology* 2017 Jul 24
- Strazzabosco M, Fiorotto R, Cadamuro M et al. “Pathophysiological implications of innate immunity and autoinflammation in the biliary epithelium” *BBA Molecular Basis of Disease* 2018 Apr;1864(4 Pt B):1374-1379.

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)

- 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 Biotecnologiche Centro di Eccellenza delle Scienze dell’Invecchiamento, Università G. D’Annunzio, Chieti-Pescara)

- 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.

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)

- Sandri A, Lleo MM, Signoretto C et al. “Chemotaxis 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
- Sandri A, Lleo MM, Boschi F et al. “Protease inhibitors elicit anti-inflammatory effects in mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *Clin Exp Immunol.* 2021 Jan;203(1):87-95.

FFC Project#22/2018 “**Preclinical testing in cystic fibrosis of a repurposed molecule targeting HMGB1**” Marco Emilio Bianchi (Divisione Genetica e Biologia Cellulare, Unità dinamica della cromatina, Ospedale San Raffaele, Milano)

- De Leo F, Rossi A, De Marchis F et al. “Pamoic acid is an inhibitor of HMGB1-CXCL12 elicited chemotaxis and reduces inflammation in murine models of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia” *Molecular Medicine* (2022) 28:108

FFC Project#23/2018 “**Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo**” Maria Cristina Dehecchi (Dip. Patologia e Diagnostica, Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona), Annalisa Guaragna (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Scienze Chimiche)

- Esposito A, D’Alonzo D, De Fenza M et al. “Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis” *Int J Mol Sci.* 2020 May 9;21(9):3353

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)

- 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

- Puccetti M, Pariano M, Renga G et al. “Targeted Drug Delivery Technologies Potentiate the Overall Therapeutic Efficacy of an Indole Derivative in a Mouse Cystic Fibrosis Setting” *Cells*. 2021 Jun 25;10(7):1601
- Pariano M, Puccetti M, Stincardini C et al. “Aryl Hydrocarbon Receptor Agonism Antagonizes the Hypoxia-driven Inflammation in Cystic Fibrosis” *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022 Oct 17.

*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)*

- Conte G, Costabile G, Baldassi D et al. “Hybrid Lipid/Polymer Nanoparticles to Tackle the Cystic Fibrosis Mucus Barrier in siRNA Delivery to the Lungs: Does PEGylation Make the Difference?” *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2022, 14, 7565–7578

*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)*

- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. “Genomic characterization of Achromobacter species isolates from chronic and occasional lung infection in cystic fibrosis patients” *Microb Genom*. 2021 Jul;7(7):000606
- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. “Mobilome Analysis of Achromobacter spp. Isolates from Chronic and Occasional Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients” *Microorganisms*. 2021 Jan 8;9(1):130.

*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 Dehecchi (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Laboratorio di Patologia Molecolare-Laboratorio Analisi), Annalisa Guaragna (Università di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche)*

- De Fenza M, D’Alonzo D, Esposito A et al. “Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of Nalkyl-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-Nonyloxypentyl-l-Deoxynojirimycin 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

*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)*

- 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)*

- Cafora M, Brix A, Forti F et al. “Phages as immunomodulators and their promising use as anti-inflammatory agents in a cftr loss-of-function zebrafish model” *J Cyst Fibros*. 2020 Dec 6;S1569-1993(20)30927-9.

- Cafora M, Paoer N, Forti F et al. “Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models” 2022 *Front. Microbiol*. 13:979610.

*FFC Project#20/2020 “Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis” Vincenzo Summa (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Farmacia), Lucia Altucci (Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dip. di Medicina di Precisione)”*

- Barone S, Cassese E, Alfano AI et al. “Chasing a Breath of Fresh Air in Cystic Fibrosis (CF): Therapeutic Potential of Selective HDAC6 Inhibitors to Tackle Multiple Pathways in CF Pathophysiology” Published as part of the *Journal of Medicinal Chemistry* special issue “Epigenetics 2022”; *J Med Chem*. 2022 Feb 24;65(4):3080-3097

*FFC Project#13/2021 “Probiotics: an emerging strategy to fight bacterial pulmonary infections in CF” Giovanna Batoni (Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)*

- Kaya E, Batoni G, Di Luca M et al. “Planktonic and Biofilm-Associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* Elicit Differential Human Peripheral Blood Cell Responses” *Microorganisms*. 2021 Aug 31;9(9):1846.
- Batoni G, Maisetta G, Kaya E et al. “Lung-Directed Bacteriotherapy in Cystic Fibrosis: Could It Be an Option?” *Antibiotics* 2022, 11, 326.

## 5. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH

### Ricerca clinica ed epidemiologica

*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 IRCCS Ca’ Granda, Milano), Mirella Col-lura (Centro FC, Ospedale “G. Di Cristina”, Palermo), Giuseppe Magazzù (Centro FC, Messina), Valeria Raia (Centro FC, Napoli)*

- 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

*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)*

- Battezzati A. et al. “Ageand 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

*FFC Project#22/2013 “Citizens’ jury and decision making on cystic 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)*

- 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

**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)

- 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

**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 IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Clelia Di Serio (CUSSEB-Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano), Stefan Niemann (Molecular Mycobacteriology, Research Center Borstel)

- 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)
- 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.

**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)

- 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 bronchitis: 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)

- 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

**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)

- 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

**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)

- 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 Transgenized Mouse Model for the *In vivo* Long-term Monitoring of Inflammatory Responses” J Vis Exp. 2017 Jul 7;(125)

**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)

- 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

**FFC Project#22/2016 “Environmental and human reservoirs of Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species colonizing the lower airways of cystic fibrosis patients”** Caterina Signorello (Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia, Università di Verona)

- 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

**FFC Project#27/2018 “Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis”** Alessandro Palleschi (Fondazione IRCCS Ca’ Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Pennati F, Salito C, Borzani I et al. “Quantitative Multivolume Proton-Magnetic Resonance Imaging in Lung Transplant Recipients: Comparison With Computed Tomography and Spirometry” Acad Radiol. 2021 Oct;28(10):e297-e305.

**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)

- 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
- Terlizzi V, Padoan R, Claut L et al. “CRMS/CFSPID Subjects Carrying D1152H CFTR Variant: Can the Second Variant Be a Predictor of Disease Development?” Diagnostics (Basel). 2020 Dec 12;10(12):1080.
- Terlizzi V, Claut L, Tosco A et al. “A survey of the prevalence,

management and outcome of infants with an inconclusive diagnosis following newborn bloodspot screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) in six Italian centres” J Cyst Fibros. 2021 Sep;20(5):828-834.

- Terlizzi V, Padoan R “Infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis and acute recurrent pancreatitis: what definition?” J Med Screen. 2021 Jul 13;9691413211031613.
- Botti M, Terlizzi V, Francalanci M et al. “Cystic fibrosis in Tuscany: evolution of newborn screening strategies over time to the present” Ital J Pediatr. 2021 Jan 6;47(1):2.
- Terlizzi V, Claut L, Colombo C et al. “Outcomes of early repeat sweat testing in infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/CF screen-positive, inconclusive diagnosis” Pediatr Pulmonol. 2021 Sep 22.

**FFC Project#24/2019 “Early Derangements of Glucose Tolerance in Cystic Fibrosis: effect of CFTR Modulators”** Alberto Battezzati (Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea, DeFENS, Università di Milano), Carla Colombo (Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Clinica Pediatrica De Marchi, Centro Regionale FC, Milano), Vincenzina Lucidi (Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Roma), Maria Cristina Lucanto (AOU Messina, Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica); Andrea Mari (Istituto di Neuroscienze, CNR, Padova)

- Battezzati A, Foppiani A, Alicandro G et al. “Prepubertal insulin secretory indices are long-term predictors of short adult stature in cystic fibrosis” Endocr Connect. 2022 May 10;11(5):e220056.

**FFC Project#27/2019 “Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation”** Vittorio Scaravilli (Dipartimento Anestesia, Rianimazione ed Emergenza, Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano)

- Scaravilli V, Scansani S, Grasso A et al. “Right Ventricle Dysfunction in Patients With Adult Cystic Fibrosis Enlisted for Lung Transplant” Transplant Proc. Jan-Feb 2021;53(1):260-264
- Scaravilli V, Merrino A, Bichi F et al. “Longitudinal assessment of renal function after lung transplantation for cystic fibrosis: transition from post-operative acute kidney injury to acute kidney disease and chronic kidney failure” Journal of Nephrology (2022) 35:1885–1893

**FFC Project#17/2020 “Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis”** Giovagnoli Stefano (Università degli Studi di Perugia).

- Puccetti M, Costantini C, Ricci M et al. Tackling Immune Pathogenesis of COVID-19 through Molecular Pharmaceutics. Pharmaceutics. 2021 Apr 5;13(4):494

**FFC Project#24/2020 “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), Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Dolce D, Claut L, Colombo C et al. “Different management ap-

proaches and outcome for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) and *Pseudomonas aeruginosa* isolation” Journal of Cystic Fibrosis

- Terlizzi V, Motisi MA, Pellegrino R et al. “Risk factors for severe COVID-19 in people with cystic fibrosis: A systematic review” Front. Pediatr. 10:958658.
- Tosco A, Castaldo A, Colombo C et al. “Clinical outcomes of a large cohort of individuals with the F508del/5T;TG12 CFTR genotype” J Cyst Fibros. 2022; 21:850-855.

## FFC RICERCA FACILITIES

**Cystic Fibrosis animal Core facility (CFaCore)** Alessandra Bragonzi (Istituto di Ricerca San Raffaele, Milano)

- 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)
- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. “Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for *Pseudomonas aeruginosa*” Eur Respir J. 2020 Mar 5;55(3):1802456.

**Cystic Fibrosis Database (CFDB)** Roberto Buzzetti, Donatello Salvatore (Centro FC, Osp. S. Carlo, Potenza), Valeria Raia (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Minicucci (Centro FC, Osp. Gaslini, Genova), Natalia Cirilli (Centro FC, Ospedali Riuniti, Ancona), Daniele Alessio (OnLime, Milano)

- 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 Colture Primarie Elvira Sondo (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “G. Gaslini”, Genova), Luis Galieta (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

**Servizio Colture Primarie** Elvira Sondo (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “G. Gaslini”, Genova), Luis Galieta (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

- 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)
- 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
- Ferrera L, Capurro V, Delpiano L et al. “The Application of Bicarbonate Recovers the Chemical-Physical Properties of Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis Epithelia Models” Biology (Basel). 2021 Mar 29;10(4):278.
- Ludovico A, Moran O and Baroni D “Modulator Combination Improves *In vitro* the Microrheological Properties of the Airway Surface Liquid of Cystic Fibrosis Airway Epithelia” Int. J. Mol.Sci. 2022, 23, 11396.



# Appendix 2

Institutes and Laboratories involved in the 454 projects funded by Italian CF Research Foundation 2002-2022  
*Istituti e Laboratori attivi nei 454 progetti finanziati da FFC Ricerca dal 2002 al 2022*

## 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
- Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università di Parma

### 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
- Istituto di Cristallografia, CNR, 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 Microrganismi, 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 su-

periore 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, GenovaLab. 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
- Dip. Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOEMI), Università degli Studi di 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 Vi-

ta-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. Scienze Farmaceutiche, 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 Ambientata Università di Bari, Bari
- Servizio Fibrosi Cistica-Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria Policlinico Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica e Biotecnologie Molecolari, CNR, Bari
- Istituto per la microelettronica e microsistemi (IMM), CNR, Lecce

## 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

- Dip. 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, 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, Verona
- Dip. di Patologia e Diagnostica Patologia Generale Università degli Studi di Verona, 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, Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Verona, 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 Medecine, 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, Univeristats 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
- Dept. of Physiology, McGill University, Montreal, Quebec, 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
- Department 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 Ricerca Projects (2002-2022)

### ASIA

#### AND MIDDLE EAST

##### HONG KONG

- Dennis Lo Yuk Ming

##### INDIA

- Vikas Gautam
- Amit Misra

##### ISRAEL

- Batsheva Kerem
- Orit Reish
- Hanoch Senderowitz
- Michael Wilschanski

##### IRAN

- Esmail Mortaz

##### JAPAN

- Hiroshi Kubo

##### TURCHIA

- Duygu Gözen

### AUSTRALIA

- Scott Bell
- Margaret Cooley
- Martin Delatycki
- Manohar Garg
- Allan Glanville
- Phil Hansbro
- Ameneh Khatami
- Anthony Kicic
- Tim Kidd
- John Massie
- John Mattick
- (Keith) Chee Ooi
- Sarath Ranganathan
- David Reid
- Louis Rendina
- Geraint Rogers
- Claudia Trappetti
- Tony Velkov
- Shafagh Waters
- Cynthia Withchurch

### CANADA

- Diana Averill-Bates
- Christine Bear
- André Cantin
- Tom Clandinin
- Elizabeth Cowley
- Lori Burrows
- Peter Durie
- Tanja Gonska
- Hartmut Grasmann
- Bob Hancock
- John W. Hanrahan
- 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
- Daniela Rotin
- Andrew Sandford
- Molly Schmid
- Aaron Shawn
- Christopher Sibley
- Pamela Sokol
- David Speert
- Michael G Surette
- Mark J. Turner
- Miguel Valvano
- Valerie Waters
- Michael Wheeler
- Herman Yeger
- Jason C. Young
- Julian Zielensky

### 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
- Brieuc Van Nieuwenhuysse
- François Vermeulen

#### CZECH REPUBLIC

- Jan Krejsek

#### DENMARK

- Thomas Bjarnsholt
- Oana Ciofu
- Niels Høiby
- 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
- Jean-Marc Ghigo
- Emanuelle Girodon
- Vincent Goffin
- Aurélie Goyenville
- Genevieve Hery Arnaud
- Jacky Jaquot
- Eric Kipnis

- Laurent Kremer
- Jean Paul Latgé
- Frederic Laurent
- Rozenn Le Berre
- Fabien Lecaille
- Patricia Lemarchand
- Christine Linard
- Olivier Mignen
- Anne Munck
- Patrizia Paterlini-Brèchot
- Jean-Marc Rolain
- Marie Catherine Romey
- Juliet Royet
- Magali Taulan-Cadars
- Vinciane Saint-Criq
- 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
- Peter Imming
- Jochen G. Mainz
- Frank-Michael Müller
- Markus Pietsch
- Hermann Schillers
- Ursula Seidler
- Markus Sperandio
- Stefan Stamm
- Megan Stanifer
- Gratiana Steinkamp
- Burkhard Tuemmler
- Martin Ulrich
- Christiane Wolz

#### GREECE

- George Makrydimas

#### IRELAND

- Judith Coppinger
- Colum Dunne
- Elena Fernandez Fernandez
- Catherine Greene
- Brian Harvey
- Siobhán McClean
- Irene Oglesby
- Cian O'Leary
- Emer P. Reeves

#### ITALY

- Guido Antonelli
- Tiziano Bandiera
- Giovanna Batoni

- Flavia Bazzoni
- Alessandra Bragonzi
- Carlo Castellani
- Paola Catastini
- Antonio De Flora
- Lucia De Franceschi
- Fabrizio De Ponti
- Marco D'Andrea
- Luis Juan Vicente Galieta
- Silvio Garattini
- Alessandro Grottesi
- Marco Lucarelli
- Giancarlo Mansueto
- Giuseppe Magazzù
- Sara Montagnese
- Oscar Moran
- Nicoletta Pedemonte
- Marco Trabucchi

#### **PORTUGAL**

- Margarida Amaral
- Carlos Farinha
- Jorge Leitão
- Miqueias Lopes-Pacheco
- Raquel Sabino

#### **SPAIN**

- Raquel Barrio
- Jaume Bertranpetit
- Ana Bustamante-Aragones
- Rafael Cantón
- Xavier Estivill
- Gertrudis Horna
- Pedro Mondejar-Lopez
- Guillermo Mtz. de Tejada de Garaizabal
- Francisco Sanchez Madrid
- Roberto Quesada Pato

#### **SWEDEN**

- Gunnar C. Hansson
- LisaI Pählman
- 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
- Piet Cools
- Touw Daan
- Hugo De Jonge
- Peter Klijn
- Lidewij Henneman
- Harry Heijerman
- Erik Hulzebos
- Peter JFM Merkus
- Charlotte Robroeks
- Bob Scholte
- Harm Tiddens
- Bernt Van Der Blink
- Kors van der Ent

#### **U.K. – NORTHERN IRELAND**

- Lucy Allen
- Matthew Avison
- Maria G. Belvisi
- Charlotte Billington
- James Birchall
- Marina Botto
- Steve Brocchini
- Malcolm Broddie
- Alan Brown

- Andrew Bush
- Philip Calder
- Steven Conway
- Alan R. Cowley
- Ruxandra Dafinca
- 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
- Patrick Harrison
- 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
- Nicholas Simmonds
- David Smith
- Liz Sockett
- Kevin Southern
- Maurice Super
- Hui-leng Tan
- Tunney Michael
- Sabeel Valappil
- Ludovic Vallier
- Paola Vergani
- Rebecca Weiser
- John Widdicombe
- Craig Winstanley

#### **HUNGARY**

- Mónika Homa

#### **MEXICO**

- Paul Sujay

#### **SOUTH AMERICA**

##### **BRAZIL**

- Margaret Cristina da Silva Boguszewski
- André Kipnis
- Veralice Meireles Sales de Bruin
- Luiz F Onuchic
- Mauro M. Teixeira

##### **COSTA RICA**

- Arturo Solis

##### **VENEZUELA**

- Juan Bautista De Sanctis

#### **U.S.A.**

##### **ALABAMA**

- Bakhrom K. Berdiev
- David Bedwell
- John Paul Clancy
- Jennifer Guimbellot
- Kim Keeling

- Stefanie Krick
- Sadis Matalon
- Camilla Margaroli
- 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
- Matthew Porteus
- 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
- Stacey Martiniano
- Jerry A. Nick
- Scott Sagel
- Herbert Schweizer
- Jeff Wagener
- Marty Zamora

#### **CONNECTICUT**

- Nadia Ameen
- Emanuela Bruscia
- Marie E. Egan
- Peter Glazer
- Diane Krause
- Joseph L. Kuti
- Curt Scharfe
- Li Tianbo

#### **FLORIDA**

- Alexander Cole
- Alexandra Quittner

#### **GEORGIA**

- Nael A. McCarty
- Scott Grosse
- Rabindra M. Tirouvanziam

#### **ILLINOIS**

- John Christman
- Ann Harris
- Anver Kuliev
- Ajay Rana
- Le Shen
- Ashvani Singh
- 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
- Martin Mense
- 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 Ladas
- Bruce Levy
- Stephen Lory
- Hongmei Mou
- Gerald Pier
- Stefan Ryter
- Gregory Sawicki
- Charles Serhan
- Susan Slaughaupt

**MICHIGAN**

- Lindsay Caverly
- Daniel Klionsky
- John J. LiPuma
- Mary O'Riordan
- Kathleen Stringer

**MINNESOTA**

- Robert C. Huebert
- Mark Kurth
- Antoinette Moran

**MISSOURI**

- Carolyn Cannon
- Thalachallour Mohanakumar

- Stuart Sweet

**NEBRASKA**

- Bradley Britigan
- Channabasavaiah Gurumurthy
- Thalachallour Mohanakumar
- Yaping Tu

**NEW HAMPSHIRE**

- Dean Madden
- George A. O'Toole
- Bruce A. Stanton

**NEW YORK**

- Isabel Aznarez
- Nazzareno Ballatori
- Jue Chen
- Ville Friman
- David Goldfarb
- Cole Haynes
- John Lueck
- Lin L. Mantell
- 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
- Anthony Hickey
- Mehmet Kesimer
- Michael Knowles
- Alessandra Livraghi-Butico
- Marianne Muhlebach
- Carla Ribeiro
- John Riordan
- Gabriel Sherif
- Robert Tarran

**OHIO**

- Amal Amer
- Melvin Berger
- Tracey L. Bonfield
- Robert A. Bonomo
- 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
- Donald VanDevanter
- Haitao Wen
- Daniel Wozniak

**OREGON**

- David C. Dawson
- Bruce L. Geller
- Xuehong Liu

**PENNSYLVANIA**

- Jennifer Bomberger
- Robert Bucki
- Rebekah Marie Dedrick
- Raymond Frizzell
- David Orenstein
- Paul J. Planet
- Keven Mara Robinson
- Ronald Rubenstein
- Douglas Wilson

**SOUTH CAROLINA**

- Patrick Flume

**TENNESSEE**

- John Christman
- Michael Laposata
- Vasily V. Polosukhin

**TEXAS**

- Carolyn Cannon
- Brian R Davis
- Tawanda Gumbo
- Raksha Jain
- Sunhee Lee
- Sergey Shevkoplyas
- Philip Thomas

**UTAH**

- My N. Helms
- 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

## Acknowledgment

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.

# Appendix 4

FFC Ricerca Projects (2020 – 2022) adopted by Supporters

*Progetti FFC Ricerca (2020–2022) adottati da Sostenitori FFC Ricerca*

## PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA. TFCF TASK FORCE FOR CYSTIC FIBROSIS

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

Finanziamento 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 Galiotta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine TIGEM, Napoli)

Finanziamento: € 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. promosso dalla Delegazione FFC di Vittoria Ragusa** (€ 10.000), **Evento “Artisti per un respiro” 4a ed. promosso dalla Delegazione FFC di Catania Mascali** (€ 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” promosso dalla 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), **Sfogli 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” Raccolta fondi promossa dall’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” promosso dalla Delegazione FFC di Como Dongo** (€ 63.200), **Quota parziale Campagna Nazionale FFC 2018** (€ 50.000), **Bike Tour FFC 2018** (€ 50.000), **Numero So-**

**litale 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” promossa dalla 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” promosso dal Gruppo di sostegno FFC di Crevalcore Bologna** (€ 12.000), “In onore di Angelica” (€ 50.000), **Evento “Dai respiro alla ricerca 2019” promosso dalla Delegazione FFC di Palermo** (€ 11.000), **Insieme per Franci** (€ 10.000), **Crédit Agricole** (€ 15.000)

## PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023. 1 SU 30 E NON LO SAI. UNA PIATTAFORMA PER CONOSCERE MEGLIO IL SIGNIFICATO DEL TEST DEL PORTATORE SANO DI FIBROSI CISTICA

Responsabile: **Carlo Castellani** (Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini)

Finanziamento: € 169.826. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 20.000); **Antonio Guadagnin & Figlio Srl** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 41.826)

## PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023. MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo) **Luis Galiotta** (Istituto Telethon di Genetica e Medicina – TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Finanziamento: € 190.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Rotary Club Verona Distretto 2060** (€ 28.000); **Delegazione FFC Ricerca del Lago di Garda** (€ 62.000)

## PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023. EFFETTO-KAFTRIO NELLA MALATTIA AVANZATA. STUDIO DI EFFICACIA E SICUREZZA DI KAFTRIO NELLA VITA REALE DI PERSONE CON FC IN STADIO AVANZATO

Responsabile: **Cesare Braggion** (Direzione Scientifica, Area Ricerca Clinica FFC Ricerca)

Ricercatore principale: **Sonia Volpi** (Centro Regionale Veneto Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)

Finanziamento: € 98.136. Adottato totalmente da: **Fondazione UniCredit** (€ 25.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 73.136)

### ► 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)

Finanziamento: € 85.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 87.000. Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV dedicato a Carmen Peterlana Cainelli** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 92.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 50.000); **Fondazione Corrado e 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 – D3Chimica Farmaceutica)

Finanziamento: € 75.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 43.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa e Siracusa** (€ 21.500); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 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)

Finanziamento: € 90.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 40.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 37.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Lecce** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 87.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Pesaro, Delegazione FFC Ricerca di Rivarolo Canavese e Gruppo di sostegno FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 37.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Firenze** (€ 21.000); **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 50.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 52.000. Adottato totalmente da: **"In ricordo di Franco Miliotti"** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 32.000)

► **FFC#13/2020 - Studio del potenziale antimicrobico di glicomimetici imminosaccaridici nel trattamento di infezioni polmonari da fibrosi cistica**

Responsabile: **Annalisa Guaragna** (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche)

Finanziamento: € 65.000. Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Milano Magenta** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Imola Romagna** (€ 15.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Crotona "Vita in te ci credo"** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Monterotondo Roma** (€ 12.000)

► **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)

Finanziamento: € 57.000.

Adottato totalmente da: **Smartform/Tattooform** (€ 15.000); **Guadagnin srl** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Belluno con i rocciatori di Fonzaso** (€ 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)

Finanziamento: € 85.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valdadige** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Novara** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Casarile Milano** (€ 8.000); **Loifur** (€ 10.000); **"Project Hope Rosa Pastena"** (€ 21.000)

► **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)

Finanziamento: € 55.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 40.000); **Latteria Montello** (€ 15.000)

► **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)

Finanziamento: € 85.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Valle Canonica**

► **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: **Maira Paroni** (Università degli Studi di Milano, Dip. di Bioscienze)

Finanziamento: € 85.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Sassari Castelsardo con Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Siniscola Nuoro**

► **FFC#19/2020 - Terapie prorisolutive per la fibrosi cistica mediante resolvina 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)

Finanziamento: € 55.000

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca 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)

Finanziamento: € 55.000.

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Latina** (€ 16.000), **Quota residua Campagna di Natale FFC Ricerca 2020** (€ 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)  
Finanziamento: € 30.000.  
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca 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)  
Finanziamento: € 70.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 25.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fabriano Ancona** (€ 25.000); **Delegazione FFC Ricerca di Umbertide Città di Castello** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca 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)  
Finanziamento: € 88.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 50.000), **Delegazione FFC Ricerca 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)  
Finanziamento: € 30.000.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme**

► **FFC#1/2021 - Esplorazione multiomica del lipidoma dell'epitelio bronchiale primario della FC e del suo ruolo nel recupero di CFTR**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Istituto Italiano di Tecnologia IIT)  
Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 12.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Prato** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Reggello Firenze** (€ 15.000); **Associazione Corriere a perdifiato** (€ 9.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bergamo Villa d'Alme** (€ 29.000).

► **FFC#2/2021 - Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR**

Responsabile: **Anna Cereseto** (Università di Trento)  
Finanziamento: 103.450 €.

Adottato totalmente da: **Evento "Together for Life" 2021**

► **FFC#3/2021 - Verso lo sviluppo di terapie personalizzate per i pazienti FC con mutazioni di *gating* resistenti**

Responsabile: **Adriana Chilin** (Dip. di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova)  
Finanziamento: 70.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna**

► **FFC#4/2021 - Stress ossidativo e autofagia in fibrosi cistica: nuovi approcci biochimici e di individuazione di farmaci**

Responsabile: **Giorgio Cozza** (Dip. di Medicina Molecolare, Università di Padova)  
Finanziamento: 104.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica**

► **FFC#5/2021 - Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica (*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina CFTR con mutazioni stop**

Responsabile: **Aldo Di Leonardo** (Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche STEBICEF, Università degli Studi di Palermo)  
Finanziamento: 99.500 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani**

► **FFC#6/2021 - Ottimizzazione della previsione delle risposte cliniche ai modulatori della CFTR utilizzando le cellule primarie nasali in condizioni che rispecchiano lo stato infiammatorio del**

**paziente FC**

Responsabile: **Onofrio Laselva** (Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Novara** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Verona** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 20.000); **Loifur** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bologna** (€ 21.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 8.000); **Amici della Ritty** (€ 33.000).

► **FFC#9/2021 - Ottimizzazione di analoghi del MKT-077 come inibitori allosterici della HSP70 combinati con correttori CFTR F508del: un approccio multi-farmaco per contrastare la fibrosi cistica**

Responsabile: **Enrico Millo** (Dip. di Medicina Sperimentale DIMES, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 102.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 102.000)

► **FFC#11/2021 - Studio dei bersagli alternativi per compensare la mancata funzione della proteina-canale CFTR**

Responsabile: **Paolo Scudieri** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Sondrio Tresvivo Ponte "In ricordo di Teresa"** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Magenta** (€ 10.000); **Charity Dinner "Respiri"** (€ 40.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo - Ospedaletti** (€ 11.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lucca** (€ 15.000).

► **FFC#7/2021 - Attivazione integrinica monocitaria come test di valutazione farmacologica in fibrosi cistica ulteriore analisi**

Responsabile: **Carlo Laudanna** (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)

Finanziamento: 69.850 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Nichelino** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 39.850)

► **FFC#8/2021 - *Therotyping* della fibrosi cistica**

Responsabile: **Marco Lucarelli** (Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma)

Finanziamento: 129.800 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Bolzano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Crotone "Vita in te ci credo"** (€ 19.800); **Metropole** (€ 10.000).

► **FFC#10/2021 - Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani: caratterizzazione della risposta ai modulatori di CFTR**

Responsabile: **Nicoletta Pedemonte** (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova)

Finanziamento: 130.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Genova** (€ 57.000); **Gruppo FC Altomilanese** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 30.000)

► **FFC#12/2021 - 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) Finanziamento: 84.040 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 84.040).

► **FFC#13/2021 - Probiotici: una strategia emergente contro le infezioni polmonari in FC**

Responsabile: **Giovanna Batoni** (Dip. di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)

Finanziamento: 35.000 €. Adottato totalmente da: **Un respiro in più Onlus e La mano tesa Onlus**

► **FFC#14/2021 - 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** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 70.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Brindisi Torre** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Prato** (€ 30.000); **Emanuela Cricri e amici della ricerca** (€ 20.000).

► **FFC#15/2021 - Affrontare la fago-resistenza per aumentare la solidità della terapia fagica nella cura delle infezioni batteriche in pazienti con fibrosi cistica (PhaCyf)**

Responsabile: **Federica Briani** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 21.000 €. Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV “In ricordo di Pio Nicolini”**

► **FFC#16/2021 - Valutazione delle proprietà antibatteriche del Kaftrio**

Responsabile: **Cristina Cigana** (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano)

Finanziamento: 104.000 €. Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma Vaticano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa Siracusa** (€ 19.500); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 19.500).

► **FFC#17/2021 - Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da micobatteri non tubercolari nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Lanfranco Fattorini** (Dip. di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma)

Finanziamento: 70.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 55.000).

► **FFC#18/2021 - 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)

Finanziamento: 70.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Rovigo** (€ 8.000); **Latteria Montello** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Belluno** (€ 36.000).

► **FFC#19/2021 - Targeting combinato della sfingosina-1-fosfato-liaisi dell'ospite e del patogeno come strategia antimicrobica nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Barbara Cellini** (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Medicina Sperimentale) Finanziamento: 69.750 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Bologna** (€ 69.750)

► **FFC#20/2021 - Terapie prorisolutive per la fibrosi cistica mediante resolvina 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)

Finanziamento: 68.100 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 30.100).

► **FFC#21/2021 - La salute psichica nei pazienti affetti da fibrosi cistica: il ruolo prognostico del temperamento, della personalità e degli stili di attaccamento**

Responsabile: **Gianluca Serafini** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 65.950 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Firenze** (€ 45.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 12.950)

► **“Gianni Mastella” Starting Grant - GMSG#1/2022 Sviluppo di sistemi di trasporto per la tecnologia CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica**

Responsabile: **Giulia Maule** (Dip. di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata CIBIO, Università di Trento)

Finanziamento: 149.00 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Val d'Alpone** (€ 80.000); **Together for Life** (€ 69.000)

► **FFC#1/2022 - Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con mutazioni orfane di terapia e per contrastare le infezioni batteriche in fibrosi cistica**

Responsabile: **Massimo Aureli** (Università di Milano, Dip. Biotecno-

logie Mediche e Medicina Traslazionale)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Crevalcore** (€ 60.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 70.000)

► **FFC#2/2022 - Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione**

Responsabile: **Fabio Bertozzi** (Istituto Italiano di Tecnologia IIT Genova)

Finanziamento: 63.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Bolzano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 23.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca “Insieme per Giulia Sofia”** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 10.000).

► **FFC#3/2022 - Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3K $\gamma$**

Responsabile: **Emilio Hirsch** (Dip. di Biotecnologia Molecolare e Scienze della Salute, Università di Torino)

Finanziamento: 128.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Messina** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cerea “Il sorriso di Jenny”** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Chivasso** (€ 15.000); **“Un fiore per Valeria” Assemini Cagliari** (€ 12.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Seregno** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Olbia** (€ 21.000); **Delegazione FFC ricerca di Manciano Grosseto e famiglia Catalano** (€ 12.000).

► **FFC#4/2022 - Derivati del peptide esculentina come agenti terapeutici con attività antimicrobica e potenziatrice di CFTR per il trattamento della patologia polmonare della fibrosi cistica**

Responsabile: **Maria Luisa Mangoni** (Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 65.000)

► **FFC#5/2022 - Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica**

Responsabile: **Laurent Robert Chiarelli** (Laboratorio di Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Università di Pavia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo – Ospedaletti** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Grado – Gorizia** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Benevento** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Monterotondo Roma** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Trieste** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sassari Castelsardo** (€ 58.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vigevano** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecce** (€ 8.000).

► **FFC#6/2022 - Ricerca di combinazioni di farmaci capaci di eliminare *Mycobacterium abscessus* nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Federico Giannoni** (ISS, Dip. Malattie Infettive)

Finanziamento: 80.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 70.000).

► **FFC#7/2022 - Identificazione dei tipi di *Mycobacterium abscessus* presenti in Italia e dei biomarcatori dell'ospite per caratterizzare l'infezione da micobatteri in fibrosi cistica**

Responsabile: **Nicola Ivan Lorè** (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Finanziamento: 128.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 25.000); **Ky-mos Srl SB** (€ 9.000); **Antonio Guadagnin & Figlio Srl** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Martinsicuro Teramo** (€ 22.000). Adottabile per 64.000 €

► **FFC#8/2022 - Usare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mauro Piacentini** (Dip. Biologia, Università Roma Tor Vergata)

Finanziamento: 68.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna** (€ 68.500).

► **FFC#9/2022 - L'effetto degli stimoli infiammatori sul trasporto degli ioni nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica**

Responsabile: **Luis J. V. Galletta** (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria, Ragusa e Siracusa** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Masciacca** (€ 65.000).

► **FFC#10/2022 - Verso lo sviluppo del composto GY971a come farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica**

Responsabile: **Iaria Lampronti** (Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)

Finanziamento: 117.750 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pesaro con Delegazione FFC Ricerca di Rivarolo Canavese e Delegazione FFC Ricerca di Parma Fidenza** (€ 87.750)

► **FFC#11/2022 - Inibire il meccanismo di attivazione piastrinica come strategia per spegnere l'infiammazione polmonare in fibrosi cistica**

Responsabile: **Domenico Mattoscio** (Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Univ. Chieti-Pescara)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Cuneo Alba** (€ 130.000).

► **FFC#12/2022 - Valutazione delle interazioni tra i batteriofagi e il sistema immunitario dell'ospite in modelli di fibrosi cistica: un passo verso l'applicazione della terapia fagica**

Responsabile: **Anna Silvia Pistocchi** (Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale Biometra, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 59.400 €

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV "In ricordo del Professor Gianni Mastella"** (€ 59.400)

► **FFC#13/2022 - Una strategia terapeutica combinata di liposomi/Kaftrio/antibiotico per il trattamento di infezioni da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maurizio Fraziano** (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 130.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Saviano** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Padova** (€ 20.000).

Adottabile per 69.000 €.

► **FFC#14/2022 - Sfruttare l'effetto mucolitico di un enzima DNase perfezionato per il trattamento della malattia polmonare nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Riccardo Percudani** (Università di Parma, Dip. Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità ambientale)

Finanziamento: 96.400 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 14.000); **Intesa Sanpaolo** (€ 17.500); **Donazione in memoria** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca Altomilanese - Legnano** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecco Valsassina** (€ 26.900).

► **FFC#15/2022 - Usare gli anticorpi come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la terapia dell'aspergillosi broncopolmonare allergica nei bambini con fibrosi cistica**

Responsabile: **Teresa Zelante** (Dip. di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fermo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fabriano Ancona** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 36.000); **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 60.000).



**Notes**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**Presidenza Matteo Marzotto**  
Segreteria di presidenza: Gabriella Cadoni  
Tel. 045 8123597 - presidenza@fibrosicisticaricerca.it

**Consiglio di Amministrazione**  
Presidente: Matteo Marzotto  
Presidente emerito: Vittoriano Faganelli  
Vicepresidenti: Paolo Faganelli, Michele Romano  
Consiglieri: Riccardo Boatto, Raffaele Boscaini, Cesare Braggion, Callisto Marco Bravi, Sandro Caffi, Francesco Cobello, Michele Gangemi, Giuseppe Lauria Pinter, Giuseppe Magazzù, Laura Minicucci, Patrizia Volpato

**Direzione scientifica**  
Direttore: Carlo Castellani  
Vicedirettore: Nicoletta Pedemonte  
Segreteria scientifica: Federica Lavarini  
Tel. 045 8127037 - federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

**Presidente del Comitato scientifico**  
Paolo Bernardi

**Gestione e promozione attività di ricerca clinica**  
Cesare Braggion  
cesarebraggion.133@gmail.com

**Gestione bandi e progetti di ricerca**  
Ermanno Rizzi  
Tel. 344 0221751 - ermanno.rizzi@fibrosicisticaricerca.it

**Comunicazione scientifica**  
Responsabile: Luisa Alessio  
luisa.alessio@fibrosicisticaricerca.it

**Comitato scientifico**  
Presidente: Paolo Bernardi  
Consulenti: Cesare Braggion, Paola Bruni, Roberto Buzzetti, Giulio Cabrini, Emilio Clementi, Antonella Mencacci, Oscar Moran, Gian Maria Rossolini

**Direzione di gestione**  
Giuseppe Zanferrari  
Tel. 045 8127028 - giuseppe.zanferrari@fibrosicisticaricerca.it

**Amministrazione**  
Responsabile: Gabriella Cadoni  
M. Bergamaschi, F. Morbioli  
Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025  
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it  
michela.bergamaschi@fibrosicisticaricerca.it  
francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it

**Comunicazione**  
Responsabile: Valeria Merighi  
I. Boarato, S. Prando, J. Bombana  
Tel. 045 8123599 - 7026  
valeria.merighi@fibrosicisticaricerca.it  
isabella.boarato@fibrosicisticaricerca.it  
silvia.prando@fibrosicisticaricerca.it  
jara.bombana@fibrosicisticaricerca.it

**Progetti editoriali:** Marina Zanoli  
marina.zanoli@fibrosicisticaricerca.it

**Ufficio stampa:** Patrizia Adami  
Tel. 348 3820355 - press@fibrosicisticaricerca.it

**Raccolta fondi e rapporti con il territorio**  
Responsabile: Fabio Cabianca  
G. Bovi, G. Buemi, D. Cavazza, L. Fratta  
Tel. 045 8123605 - 7032 - 7033 - 7029  
fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it  
giulia.bovi@fibrosicisticaricerca.it  
giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it  
davide.cavazza@fibrosicisticaricerca.it  
laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it

**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica**  
c/o Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata  
Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona  
Tel. 045 8123438 - fondazione.ricercafc@aovr.veneto.it

## 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
Bologna - Crevalcore	380 6570161
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
Codogno e Piacenza	348 1113384
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
Nuoro - Siniscola	320 7953209
Olbia	334 6655844
Oristano - Riola Sardo	342 5133252
Padova - Monselice	042 974085
Palermo e Trapani	338 4124077
Parma	0521 386303
Parma - Fidenza	334 6994359
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
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
Altomilanese - Legnano	346 8515264 <b>NEW</b>
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
Bergamo - Val Seriana	393 1462537
Bolzano	327 9151521
Bolzano - Val Badia	333 6911430
Brescia - Ghedi	333 6743788
Brindisi - Latiano	347 6350915
Cagliari - Isili	388 8925391
Campobasso	346 8744118
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
Imperia - Ospedaletti "Miriam Colombo"	335 5881657 <b>NEW</b>
L'Aquila - Valle Peligna e Marsica	351 91974606
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
Monza Brianza - Vimercate	349 6706611
Napoli - Saviano	339 3185405
Padova - Urbana	347 0814872
Padova - Villa del Conte	333 9304431
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
Sondrio - Tresivio Ponte	366 7338007
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

**fibrosicisticaricerca.it**



**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica**



**fondazioneffcricerca**



**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica**

# Insieme per mettere a muro la fibrosi cistica



## Sostieni la ricerca di una cura per tutti



Sarah Fahr, pallavolista nazionale italiana e Beatrice, 22 anni, persona FC



**Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - Onlus**  
[fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)

**A Natale, scegli i doni  
solidali FFC Ricerca**  
su [fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)

## 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 Ricerca n. **93100600233**

In Italia, le donazioni a favore di Onlus permettono di usufruire di agevolazioni fiscali.

Per approfondire: [fibrosicisticaricerca.it/benefici-fiscali-per-le-donazioni](http://fibrosicisticaricerca.it/benefici-fiscali-per-le-donazioni)



DONARE CON FIDUCIA

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