Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

1997 - 2017
20°
ANNIVERSARIO

XV SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri della ricerca in fibrosi cistica

20 anni di risultati

Verona, 27 Maggio 2017

Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata
Verona

Ad essa riconoscente per la storica collaborazione
La Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

In copertina:
Illustrazione di Saba Ferrari
"Semina e Raccolta",
acquerello su cartoncino, 2017

Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello
Grafica e impaginazione: Federica Negroni
Stampa: aprile 2017, Tipolitografia Artigiana snc - San Giovanni Lupatoto(VR)

Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

1997 - 2017
20°
ANNIVERSARIO

XV SEMINARIO DI PRIMAVERA

A 20 anni dalla nascita di Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica

Un bilancio di nuove conoscenze
per lo sviluppo e l'innovazione delle cure

Verona, San Massimo, Centro Congressi CUM
27 Maggio 2017

Sommario

La Fondazione quando come perchè Pag. 3
Gianni Mastella (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona)

Linee di ricerca FFC e risultati: un bilancio per un rilancio Pag. 7
Giorgio Berton (Università di Verona)

Riflessioni sulla Ricerca Scientifica Pag. 14
Paolo Bernardi (Università di Padova)

Panorama degli studi per terapie del difetto di base della fibrosi cistica Pag. 16
Luis J.V. Galietta [Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA)]

Il progetto Task Force for Cystic Fibrosis: ultima fase e prospettive di seguito Pag. 22
Tiziano Bandiera (Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)

APPENDICE:
Dati essenziali sull'attività scientifica FFC 2002-2017 Pag. 29

La Fondazione quando come perchè

Gianni Mastella
(Direttore Scientifico
Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Nel momento in cui celebriamo i 20 anni di vita di questa Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica ritengo utile riflettere sulla storia e sulle ragioni di questa iniziativa per capirne il senso e verificarne le potenzialità nel contribuire a dare risposte nuove alle attese di tante persone. E comincerò col descrivere il contesto nel quale è maturata.

Lo sfondo storico

Fu descritta per la prima volta da Dorothy Andersen a New York nel 1938 la fibrosi cistica del pancreas (FC): fu uno studio tutto basato su dati di autopsia, perché a quel tempo le cure non avevano spazio e di questa malattia si moriva molto presto. La seconda guerra mondiale creò una lunga pausa su questo problema, come su molti altri problemi di scienza e di salute. In Italia i primi due bambini furono ancora una volta diagnosticati FC al tavolo autoptico: a Padova (Sartori, 1952) e a Verona (Mengoli, 1953). Nel frattempo, il medico italiano Paul Artom Di Santagnese, scoprì il test del sudore (New YorK, 1952), ancor oggi il mezzo più sensibile e specifico per la diagnosi di FC. In Italia, le prime diagnosi in vita vennero fatte presso l'ospedale di Verona 60 anni fa (1957), con la messa a punto del test del sudore e dei test per l'insufficienza pancreatica. I problemi di questa patologia, da noi ancora sconosciuta, furono portati all'attenzione dei pediatri italiani nel congresso della Società Italiana di Pediatria a Genova nel 1966, sulla base del contributo dell'esperienza veronese e padovana (Mengoli, Panizon, Mastella). Presso l'Istituto Gaslini di quella città si era andata nel frattempo avviando pure una significativa attività di cura e ricerca clinica nel campo (Romano).

Assistenza e ricerca

A Verona viene istituito nel 1967 il primo centro italiano, ed uno dei primi europei, per la cura e la ricerca della fibrosi cistica. Furono i contatti coltivati con le poche realtà cliniche e scientifiche che all'epoca si occupavano di FC in Europa e soprattutto negli Stati Uniti a far crescere l'interesse del Centro Veneto per lo sviluppo di conoscenze e di strategie terapeutiche per questa malattia. La metodologia fondante del Centro fu, fin dalle sue origini, quella di coniugare la presa in carico complessiva della persona malata e della sua famiglia, sotto il profilo medico, psicologico e sociale, con l'aggiornamento tecnico e scientifico continuo nonché con iniziative di ricerca. L'idea era che per una malattia, ancor poco conosciuta e sostanzialmente povera di risorse terapeutiche, fosse indispensabile utilizzare in chiave scientifica l'esperienza maturata nell'assistenza al malato. In questo ci seguirono, debbo dire con costante incoraggiamento e collaborazione, i malati e i loro famigliari. I risultati non mancarono e, anno dopo anno, la malattia andava concedendo sempre più spazi di vita e di qualità della vita: i nostri malati bambini diventavano adolescenti ed adulti e cominciavano ad elaborare progetti di vita. Quel Centro divenne punto di riferimento per molte

persone malate ma anche per la formazione di medici e altri operatori sanitari di varie parti d'Italia. Ne fu testimonianza il simposio nazionale organizzato a Verona nel maggio 1970, che raccolse contributi di clinici e ricercatori italiani appena approdati all'interesse per FC e contributi fondamentali dell'ormai americano Paul Artom Di Santagnese, dello svizzero Ettore Rossi, degli inglesi Archie Paul Norman e Moyna Gilbertson.

Lo screening neonatale FC

È del settembre 1973 l'avvio nel Veneto del programma pionieristico di screening neonatale della fibrosi cistica e nel 1982 organizzammo a Verona con Fabio Pederzini il primo meeting internazionale sullo screening neonatale FC. Erano pochissimi i gruppi già attivi, tra cui, oltre a quelli di Veneto e Lombardia in Italia, altri di Normandia e Bretagna francesi, Colorado USA, Victoria Australia, Cardiff nel Galles. Si costituiva così un primo abbozzo di rete di ricerca su un passaggio rilevante negli interventi di cura. A quel tempo lo screening neonatale FC era generalmente ritenuto di scarso significato nel cambiare la storia naturale della malattia. Dimostrammo che non era così, perché lo screening non solo permise di estendere la diagnosi di malattia a molti bambini che altrimenti non sarebbero stati riconosciuti, ma soprattutto consentì di mettere in atto strategie di cura e prevenzione molto precoci, cambiando sostanzialmente il destino di quei bambini. Lo screening impiegò parecchi anni prima di venire accettato e implementato in altre parti d'Italia, in Europa e soprattutto negli Stati Uniti. Oggi In Italia è praticato da tutte le regioni, meno una, e in Europa e negli USA è ampiamente diffuso.

Quando si stava scoprendo il gene

Fu organizzato negli anni '70, presso il centro veneto, un laboratorio specificamente dedicato alla fibrosi cistica: quel laboratorio riuscì nel tempo ad inserirsi efficacemente nei percorsi di ricerca internazionali che già cominciavano a produrre importanti conoscenze sulla malattia. Tra queste, fondamentale la scoperta di Paul Quinton del 1983, che pose le basi per una nuova fase della ricerca FC: il difetto epiteliale di permeabilità al cloro. Fu l'esplosione delle nuove linee di ricerca che ci spinsero ad organizzare a Verona nel 1987, assieme a Paul Quinton, Giorgio Berton e Giulio Cabrini, un meeting internazionale sulla scienza di base della fibrosi cistica. Vi parteciparono i più qualificati ricercatori mondiali del campo, compresi quelli nordamericani finanziati dalla *Cystic Fibrosis Foundation*, che vi partecipò anche con il suo presidente Bob Beall. Mancavano due anni alla scoperta del gene CFTR (1989) e quel meeting parve esprimere bene il terreno scientifico su cui quella scoperta andava strutturandosi.

E venne la legislazione italiana per la fibrosi cistica

Attenti alle problematiche assistenziali, riuscimmo ad ottenere nel Veneto, verso la fine degli anni '80, una legge regionale che riconosceva ai malati FC l'assoluta gratuità delle terapie, l'assistenza domiciliare continuativa e benefici per l'inserimento scolastico e lavorativo dei malati. Una simile legge a base nazionale, su iniziativa del centro veneto FC, in collaborazione con l'Associazione Veneta FC, fu approvata dal Parlamento, con la spinta finale del ministro della salute Maria Pia Garavaglia, nel dicembre 1993, la legge 548/93: quella legge gettò le basi per l'organizzazione di centri specializzati in tutte le regioni italiane, per lo screening neonatale e per quello dei portatori sani, con specifiche disposizioni a supporto della ricerca scientifica.

FFC - organizzazione per la ricerca: le prime battute

Il meeting di Verona del 1987 aveva ispirato l'idea che potesse nascere in Italia una iniziativa aggregante significativi gruppi di ricerca coinvolgibili nell'area FC, anche perché a quel tempo eravamo riusciti a convocare al meeting solo tre gruppi italiani già seriamente in questa impegnati. Bisognava trovare alleanze e risorse. E qualcosa di buono riuscimmo finalmente a mettere insieme

nel 1996, tanto che fu possibile dare il via, alla fine di gennaio 1997, alla Fondazione per la Ricerca sulla fibrosi cistica, che nacque come emanazione dell'Associazione Veneta Fibrosi Cistica, organizzazione di volontariato inserita nella Lega Italiana FC, che molto aveva dato negli anni a sostegno dell'assistenza e della ricerca presso il Centro Veneto. La nuova organizzazione non profit doveva avere una struttura indipendente, funzionalmente snella ed efficiente per la raccolta di fondi e per il sostegno selettivo ed efficace della ricerca. Nei primi 4 anni, la Fondazione, in collaborazione con l'Associazione Veneta FC, si era data l'obiettivo di costruire a Verona, nella sede ospedaliera, un centro di ricerca che fosse vivaio di ricercatori e riferimento per la promozione e il sostegno di progetti innovativi in Italia. Quel piano incontrò non pochi ostacoli di natura tecnica e politica e fu abbandonato agli inizi del 2001. Condividemmo allora l'idea di promuovere l'aggregazione di scienziati, centri e laboratori italiani, anche con partner stranieri, per mettere insieme il meglio delle competenze tecniche e scientifiche di cui pure l'Italia era ben dotata, orientandole al campo della fibrosi cistica.

La rete di ricerca italiana per la fibrosi cistica

Dal 2002 partì un piano basato sulla selezione di progetti di ricerca presentati a seguito di bandi annuali, partendo con la convocazione a Verona nel febbraio di quell'anno di un incontro promozionale tra quasi un centinaio di ricercatori disponibili. In 16 anni, sono state esaminate circa 900 proposte di ricerca, tra le quali sono stati selezionati e finanziati sinora complessivamente 313 progetti, con l'attività di un ben qualificato comitato scientifico, supportato dal lavoro di valutazione di oltre 300 scienziati di varie nazioni. Si è costruita così una crescente rete di ricerca FC, che si sta affermando di elevata competitività nella comunità scientifica internazionale: essa consta di circa 200 gruppi e centri di ricerca, con il coinvolgimento complessivo di oltre 700 ricercatori. L'investimento finanziario complessivo in ricerca e formazione fatto in questo periodo si sta avvicinando ai 25 milioni di euro ed include l'assegnazione di più di 400 borse di studio a giovani ricercatori.

Strategia di ricerca

I progetti hanno affrontato alcune principali linee di ricerca:

1. Struttura e funzione della proteina CFTR, deviate in causa del gene CFTR mutato, e possibili interventi terapeutici per ripristinarne la condizione di normalità.
2. Applicazioni di genetica molecolare per individuare mutazioni non note del gene, perfezionare l'approccio diagnostico e supportare programmi di screening neonatale e dei portatori sani del gene mutato.
3. Infezione polmonare FC: peculiarità biologiche dei batteri più frequentemente in causa, loro possibili bersagli terapeutici, nuove molecole antibatteriche e nuove strategie di trattamento.
4. Infiammazione FC: i suoi meccanismi, i farmaci per contenerne l'azione lesiva sul polmone FC.
5. Ottimizzazione delle strategie cliniche e assistenziali tradizionali, studio delle complicanze e nuovo impulso agli studi epidemiologici.

Queste linee indicano l'intento della Fondazione di rispondere, con la ricerca, ai bisogni terapeutici delle persone malate che ancora dovranno affrontare i problemi tipici di questa malattia e le sue complicanze, nel mentre intende stimolare studi rivolti ad agire terapeuticamente sul difetto che sta alla base della malattia, con la speranza di contribuire a correggerlo a livello di proteina CFTR e a livello genetico. I relatori di questo seminario hanno cercato di fornire notizie essenziali sui risultati più significativi di questo sforzo comune, nel contesto più generale in cui si sta muovendo oggi la ricerca FC. Merita tuttavia sottolineare come la massima parte dei progetti che FFC sostiene appartengono alla cosiddetta "ricerca di base": è la ricerca che scava nel profondo dei meccanismi biologici da cui nasce la malattia, per capire quali siano i bersagli sensibili da colpire. Questa ricerca è sentita spesso lontana dai bisogni immediati delle persone malate ma è su questa che nascono le nuove idee che nutrono la scienza verso soluzioni utili ai malati di oggi e di domani.

La ricerca clinica, quella rivolta ai problemi più immediati per la diagnosi, la cura, la riabilitazione, ha ancora purtroppo uno spazio limitato in questa nostra impresa: non mancano le idee né le competenze, ma mancano i ricercatori, che sono gli operatori sanitari, di cui si registra ancora la grave carenza di organici, oberati da pesanti quotidiani impegni assistenziali nei centri di cura.

Cosa c'è dietro l'angolo

Sulla base di risultati molto significativi, alcuni dei quali già protetti da brevetti di invenzione con partecipazione FFC, la Fondazione si sta preparando ai passi successivi. Alcune molecole derivate da progetti FFC potranno approdare in un prossimo futuro alla sperimentazione clinica. Tra queste ci sono i modulatori di CFTR, in particolare quelli emersi dallo studio *Task Force for CF*, ma anche alcuni composti antibatterici. Bisognerà ricorrere alla collaborazione con aziende specializzate in studi preclinici formali, indispensabili per passare poi agli studi sul malato. Dobbiamo prepararci anche a costi assai superiori a quelli finora affrontati per gli studi di base e ci stiamo organizzando per aprire nuovi fronti di raccolta di risorse. Verranno poi gli studi clinici per i quali sarà inevitabile coinvolgere l'industria farmaceutica, qualora interessata ad investire sulle nuove prospettive di cura FC.

I sogni e il realismo della scienza

A commento generale, mi preme qui riportare quanto scrivevo nel recente Notiziario della Fondazione: "Merita evidenziare il pensiero che guida l'azione di questa Fondazione: è il nostro sogno che i risultati dei nostri progetti producano presto ciò che le persone malate attendono, la soluzione radicale ai loro problemi, ma preferiamo pensare che i risultati di ciascun progetto, rigorosamente selezionato e seriamente condotto, siano dei tasselli che aiutano la ricerca mondiale a costruire le basi per importanti scoperte. Così è avvenuto e avviene nel mondo della scienza in generale e così sta avvenendo veramente anche nel campo che ci sta a cuore". Ci auguriamo naturalmente che le tante persone che ci seguono e ci sostengono colgano questo spirito di militanza nella comunità scientifica, che è fatto anche di tenuta di fronte alle incertezze e agli eventuali risultati insufficienti o negativi. La scienza non fa miracoli ma, per arrivare ai risultati attesi, ha bisogno anche di questa comprensione, perseveranza e capacità talora di riprendere daccapo.
Questo sogno viene perseguito con ogni sforzo possibile, non abbandonando mai comunque il senso di valutazione critica e realismo scientifico e, per quanto riguarda la comunicazione dei risultati, il rispetto della correttezza dell'informazione nei confronti dei malati e dei sostenitori. C'è l'idea di aver già raggiunto un obbiettivo importante: l'innalzamento di qualità della ricerca scientifica FC in Italia, coltivando il principio che ciascun progetto di ricerca, purchè rigorosamente selezionato e condotto, rappresenti un tassello irrinunciabile per la costruzione delle innovazioni di cura e prevenzione.

Pensiero finale

Ho riportato in sintesi la lunga storia che ha precorso la nascita della Fondazione anche per ricordare le molte persone - alcune non ci sono più - che con noi hanno condiviso in varia misura le tappe di questo percorso, malati e loro famiglie in particolare, ma anche scienziati e sostenitori di diversa provenienza. Alcune di loro sono ancora al nostro fianco e hanno fatto crescere una grande famiglia di Volontari, che nutre realistica fiducia nella ricerca e con noi si sta rimboccando le maniche anche per compensare le carenze di iniziativa e di risorse che l'organizzazione statale non riesce ancora ad investire per questi obiettivi.

Linee di ricerca FFC e risultati: un bilancio per un rilancio.

Giorgio Berton
(Dipartimento di Medicina, Università di Verona. Presidente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Il concetto della rete di ricerca

Per cogliere il significato, per noi rilevante (anche se, come accade in tutte le imprese difficili, non scevro da battute di arresto) di questi vent'anni di sostegno alla ricerca in fibrosi cistica è utile sottolineare un aspetto centrale della modalità con cui procede lo sviluppo di azioni finalizzate al miglioramento delle condizioni di salute e alla cura di malattie dell'uomo. Forse non viene enfatizzato abbastanza che qualsiasi atto compia oggi un medico, o altro personale coinvolto in atti di cura, è il risultato di un numero altissimo, e incalcolabile, di ore di lavoro e di studio di un numero altrettanto elevato di persone con competenze diverse che vanno dalle scienze di base classiche (la biologia, la fisica, la chimica) alla medicina vera e propria, all'ingegneria e alla matematica. Il contributo di queste diverse discipline e la loro integrazione è essenziale per comprendere i meccanismi biologici dei processi morbosi, le loro manifestazioni sintomatiche primarie e le complicanze, la produzione di apparecchiature complesse, utili sia all'analisi di modificazioni interessanti cellule e tessuti che allo svolgimento delle procedure diagnostiche e terapeutiche e, nel filone delle innovazioni terapeutiche, per l'analisi di significatività delle risposte all'uso di nuovi farmaci.
In un paese come l'Italia in cui, più che in altri contesti europei, è ricorrente l'attenzione al "santone" di turno, al genio solitario che scopre nuove terapie contro i tumori, le malattie infettive o quant'altro, è utile ricordare l'importanza invece di questa rete di contributi diversi che alla fine si integrano per migliorare le condizioni di vita dell'uomo. Gli enormi progressi che sono stati fatti in quest'ambito si devono proprio a questa peculiare modalità di sviluppo di conoscenze che si costruisce con il rigore e l'approfondimento, il confronto, la critica tra persone con diverse competenze, ma collaboranti a raggiungere lo stesso obiettivo.

Importanza della rete di contributi diversi che alla fine si integrano per migliorare le condizioni di vita

Come ha operato il Comitato di Consulenza Scientifica nelle scelte di ricerca

Quando abbiamo iniziato il nostro lavoro come Comitato di Consulenza Scientifica non è stato difficile identificare il nostro ruolo. La ricerca sulla fibrosi cistica aveva già fatto progressi rilevanti in ambito internazionale e la scoperta nel 1989 del gene le cui mutazioni sono responsabili della malattia faceva addirittura sperare che non fosse lontana la possibilità di un approccio di terapia genica alla sua soluzione. Restavano però importanti aspetti da chiarire relativi, per esempio, ai meccanismi di regolazione della funzione del prodotto del gene implicato (la proteina CFTR), alle conseguenze del suo malfunzionamento sulle patologie infettiva e infiammatoria polmonari, alla possibilità di identificare nuove strategie terapeutiche. Soprattutto, occorreva una vera svolta nel contributo che la ricerca italiana

Occorreva una vera svolta nel contributo che la ricerca italiana poteva offrire in tema di fibrosi cistica

stava offrendo ai progressi nel campo della fibrosi cistica. Infatti, nonostante un livello molto avanzato nella definizione di strumenti e strutture organizzative dedicate all'assistenza della malattia (vedi legge nazionale 548/1993) e nella preparazione del personale dedicato, la ricerca di base alla fine degli anni novanta aveva caratteri ancora episodici e pochissimi erano i ricercatori italiani noti in campo internazionale. Ciò contrastava appunto non solo con l'ottimo livello delle attività di cura ma anche con la grande capacità dei malati, dei famigliari e degli amici di raccogliere risorse per migliorare le cose e favorire un futuro migliore. La straordinaria comunità italiana cresciuta intorno ai problemi della fibrosi cistica meritava un'attività di ricerca che fosse apprezzata a livello internazionale e contribuisse a fare dei passi significativi in avanti.

Attrarre nel campo FC ricercatori già distintisi per la qualità della loro ricerca in altri settori

Ci sembrò obbligato che il percorso da fare per raggiungere questo obiettivo fosse quello di attrarre nel campo delle ricerche sulla fibrosi cistica ricercatori già distintisi per la qualità della loro ricerca in altri settori. Le condizioni per riuscirci c'erano tutte. Innanzitutto, la fibrosi cistica è una malattia severa che merita e incoraggia lo sforzo per consentire miglioramenti nelle cure. Inoltre, la complessità della patologia, che origina da una ben definita alterazione molecolare, ma comporta lo sviluppo di patologie multiorgano, rappresenta una grande sfida scientifica. Infine, ma non da ultimo, l'opportunità offerta, attraverso il sacrificio di molti, di garantire finanziamenti di un certo rilievo consentiva a diversi laboratori già avviati nuove opportunità di crescita.

Il metodo adottato per selezionare progetti da finanziare

Il metodo che si decise di utilizzare per selezionare progetti da finanziare fu molto tradizionale. Veniva pubblicato un bando annuale che definiva le modalità di presentazione delle domande e le tematiche che sarebbero state prese in considerazione per il finanziamento. Le domande venivano vagliate dai componenti di un Comitato scientifico formatosi allora su chiamata di Gianni Mastella ed inviate a revisori esterni, considerati esperti nell'argomento, ed infine veniva presa una decisione collettiva sui progetti da finanziare e sull'entità del finanziamento. E' utile ricordare quale fu all'inizio il criterio principale utilizzato per la selezione dei progetti. Anche grazie all'insistenza di due grandi ricercatori che svolsero il ruolo di primo e secondo Presidente del Comitato, Antonio Cao e Lucio Luzzatto, tale criterio fu quello di finanziare la "buona" ricerca. Buona ricerca significava ricerca basata su un solido razionale, consistente nell'utilizzo di conoscenze pregresse per svilupparle appieno o prefigurare nuove ipotesi, utilizzo di metodologie adeguate e innovative, utilizzo di appropriati modelli di studio. Infine, non da ultimo, buona ricerca era quella proposta da ricercatori che avevano già dimostrato di saperla condurre in altri campi. Il finanziamento della buona ricerca è ancora un criterio centrale per le scelte di finanziamento del Comitato di Consulenza Scientifica. Il suo significato emerge all'interno di quello sforzo collettivo finalizzato al progresso delle conoscenze e al miglioramento della salute degli uomini che descrivevo all'inizio.

La "buona ricerca"

Vi sono dei numeri che consentono una prima valutazione del contributo della buona ricerca italiana al progresso delle conoscenze nell'ambito della fibrosi cistica. I ricercatori finanziati da FFC hanno pubblicato nel periodo 2004-2016 un totale di quasi 500 pubblicazioni su riviste a diffusione internazionale. Soprattutto, l'indice che viene comunemente usato per definire l'impatto che una rivista ha nella comunità scientifica (il cosiddetto *impact factor* o fattore di impatto), e che deriva da un calcolo che utilizza il numero di quante volte i lavori pubblicati nella rivista stessa sono stati citati in altre pubblicazioni, è alto (un valore medio intorno a 5).

Potenziale "trasferibilità" delle scoperte all'identificazione di nuove strategie per migliorare la vita dei malati

Significativamente però l'attenzione alla buona ricerca si è progressivamente saldato con quello della potenziale trasferibilità delle scoperte fatte all'identificazione di nuove strategie e farmaci per migliorare le condizioni di vita dei pazienti, fino ad arrivare alla "cura" della malattia e, infatti, progetti con tali caratteristiche negli ultimi anni sono stati considerati prioritari dal Comitato nelle scelte di finanziamento. Le ricerche finanziate in questi anni sono comprese all'interno di alcuni principali filoni e cercherò di riassumere brevemente i principali risultati in ciascuno di questi.

UNA SINTESI SUI PRINCIPALI RISULTATI

La proteina CFTR: struttura, interazioni, regolazione e stabilità

Un settore nel quale la ricerca italiana in fibrosi cistica ha dato un contributo significativo è stato lo studio della struttura della CFTR e di sue specifiche parti con l'obiettivo finale di identificare possibili siti di legame per farmaci in grado di modularne la funzione (Moran, Istituto Gaslini, Genova). Inoltre, diversi studi hanno permesso di chiarire che la CFTR è sia associata ad altre proteine che ne stabilizzano l'espressione sulla membrana plasmatica o sono implicate nella generazione di segnali intracellulari che possono regolarne la funzione (Casavola, Università di Bari; Hirsch e Ghigo, Università di Torino), sia modulata da enzimi ed altre molecole che ne modificano la stabilità e la sua veicolazione alla membrana plasmatica (Pinna e Salvi, Università di Padova; Luini, CNR di Napoli, Maiuri e Cozza, IERFC, Milano; Raia, Università Federico II, Napoli). Va sottolineato che le modificazioni che CFTR mutata subisce all'interno della cellula sono universalmente considerate un fattore critico condizionante la sua stabilità e la sua veicolazione alla superficie della cellula. Conseguentemente, farmaci in grado di "correggere" questa sorte di fragilità della CFTR mutata, che determina il suo accumulo all'interno della cellula e la sua precoce degradazione, vengono considerati un punto di arrivo per una terapia efficace della fibrosi cistica, in particolare nel caso di mutazioni di classe II tra le quali è dominante la mutazione F508del.

Conoscere CFTR mutata per poterla trattare

Negli ultimi anni la Fondazione FC ha fatto notevoli sforzi per sostenere ricerche finalizzate alla scoperta di nuovi farmaci correttori e condotte da un pool di ricercatori dell'Istituto Gaslini e dell'Istituto Italiano di Tecnologia di Genova, coordinati da Luis Galietta e Tiziano Bandiera. Non va taciuto che, per la complessità dei fattori implicati nella scoperta di nuovi farmaci e del loro possibile uso nell'uomo, l'investimento fatto presenta rischi di non riuscita e ha sottratto risorse al finanziamento di quella "buona" ricerca a cui accennavo sopra. La Fondazione e il Comitato di Consulenza Scientifica hanno riconosciuto però che dietro la proposta avanzata c'era un solido razionale e il possibile obiettivo era quello di scoprire uno o più "farmaci italiani" per la cura della fibrosi cistica. Il progresso della scienza richiede coraggio e ambizione. Proprio il fatto di sapere di poter contare su una comunità così capace di reperire risorse e supportare la ricerca ci ha dato la forza per compiere questo atto di coraggio.

Un atto di coraggio della fondazione: il progetto task force for cystic fibrosis

Oltre a questo progetto che è stato definito TFCF (*task force for cystic fibrosis*), negli ultimi anni sono stati considerati come prioritari progetti finalizzati all'individuazione di farmaci in grado di aumentare la capacità di CFTR di trasportare cloro. Tra questi suscita interesse la *trimetilangelicina*, e suoi derivati in corso di sintesi, che potenzia il trasporto di cloro mediato da CFTR e ne favorisce la veicolazione sulla membrana (Cabrini, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona; Casavola, Università di Bari; Gambari, Università di Ferrara) riducendo al tempo stesso la produzione di molecole pro-infiammatorie da parte di cellule epiteliali esprimenti CFTR (vedi poi). Lo stesso effetto combinato di correttori e potenziatori è stato anche dimostrato essere esplicato da *aminoariltiazoli* (Galietta, Istituto Gaslini e Millo, Università di Genova). Inoltre, studi condotti nel laboratorio IERFC di Milano (Maiuri, Cozza) hanno attratto l'attenzione sul potenziale effetto di riduzione della degradazione di CFTR mutata e sua maggiore veicolazione sulla membrana cellulare da parte di *cisteamina* ed *epigallocatechin gallato* (EGCG). Studi su altri potenziali correttori derivati da sostanze naturali includono la *matrina* e suoi derivati (Mazzei, Università di Genova).

Altri progetti finalizzati ad individuare farmaci in grado di aumentare la capacità di CFTR a trasportare cloro

Geni mutati: individuazione e correzione

Ricerche supportate da FFC in questi anni hanno contribuito a chiarire importanti aspetti relativi

Mutazioni CFTR in Italia; prospettive di correzione per mutazioni stop e splicing

al gene della fibrosi cistica. È stata definita una mappa della frequenza e distribuzione delle mutazioni in Italia (Piazza, Università di Torino), integrata in seguito dall'identificazione di nuove mutazioni, che sarà essenziale, progredendo la scoperta di nuovi farmaci attivi su specifiche mutazioni, per organizzare sperimentazioni cliniche e valutare i loro effetti in un numero il più ampio possibile di casi. Inoltre, si è iniziato ad identificare mutazioni in regioni non codificanti del gene (Tomaiuolo, Università Federico II, Napoli) e a caratterizzare, anche nell'importante contesto di una possibile correzione farmacologica, sia mutazioni di stop (Lentini e Pibiri, Università di Palermo) che mutazioni che determinano il salto della trascrizione di esoni (Pagani,Trieste). Considerando la differenza tra la gravità delle manifestazioni cliniche (il cosiddetto *fenotipo*) in diversi pazienti pur aventi lo stesso *genotipo* (le stesse mutazioni), è stato ritenuto appropriato finanziare ricerche finalizzate all'individuazione dei cosiddetti *geni modificatori* (Cabrini, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Verona), vale dire di geni non responsabili della patogenesi della malattia, ma in grado di condizionarne la progressione e la gravità. Di questi geni si è arricchita anche una nuova generazione di modelli animali, capaci di sviluppare una malattia FC più vicina a quella umana (Lorè, Osp. San Raffaele, Milano)

Geni modificatori, in grado di condizionare evoluzione e gravità della malattia

Infiammazione polmonare e sua regolazione

È ampiamente condivisa dalla comunità scientifica la convinzione che la CFTR mutata innesti lo sviluppo di un processo infiammatorio delle vie aeree indipendentemente dall'entità dei processi infettivi che interessano i pazienti. Nella fibrosi cistica si determinerebbe quindi un "eccesso" di risposta infiammatoria rispetto a quella fisiologicamente necessaria per combattere gli agenti patogeni. È noto dallo studio di molte patologie umane che un'infiammazione che non si risolve determina lo sviluppo di danni cellulari e l'attivazione conseguente di processi riparativi caratterizzati dalla fibrosi (neoformazione di tessuto connettivo). Regolare l'infiammazione in modo da renderla adeguata al ruolo che essa svolge nelle difese contro le infezioni, ma non "eccessiva", è considerato un obiettivo da perseguire anche in altre patologie croniche basate su meccanismi di tipo infiammatorio quali, oltre le classiche malattie autoimmunitarie, l'aterosclerosi e il diabete di tipo II.

In FC un eccesso di risposta infiammatoria per combattere l'infezione polmonare

Oltre ad incoraggiare ricerche tese a identificare bersagli molecolari in grado di regolare l'infiammazione (Battistoni, Università di Roma 3; Bazzoni, Università di Verona; Chanson, Ospedale Universitario di Ginevra; Dechecchi, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona; De Rose, Università di Torino; Pompella, Università di Pisa; Raia, Università di Napoli Federico II; Romano, Università di Chieti-Pescara; Zazzeroni, Università dell'Aquila), la Fondazione ha sostenuto progetti rivolti ad identificare farmaci in grado di ridurre la generazione di molecole pro-infiammatorie in cellule esprimenti CFTR mutata. Tra queste, l'*azitromicina* (Melotti, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona), inibitori della sintesi di sfingolipidi - quali il *miglustat* e suoi analoghi (Dechecchi e Cabrini, Azienda Ospedaliera-Universitaria Integrata di Verona) e la *miriocina* (Signorelli, Università di Milano), la *trimetilangelicina* (Cabrini, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona; Casavola, Università di Bari; Gambari, Università di Ferrara), *rolipram* e altri inibitori di fosfodiesterasi 4 (Evangelista, Università di Chieti-Pescara).

Identificati nuovi bersagli molecolari per regolare l'infiammazione e farmaci in grado di ridurre la generazione di molecole pro-infiammatorie

Particolare attese si hanno per l'uso di farmaci anti-infiammatori già utilizzati in altre patologie umane, come l'*anakinra* (inibitore del legame dell'importante citochina IL-1 al suo recettore) (Romani, Università di Perugia), anti-infiammatori fisiologicamente generati nel nostro organismo per spegnere l'infiammazione, come la *resolvina D1* (Recchiuti, Università

Riposizionare farmaci anti-infiammatori già utilizzati in altre patologie

di Chieti-Pescara) o l'immunomodulatore *timosina* alfa1 che avrebbe anche un effetto correttore di CFTR (Romani, Università di Perugia).
Va sottolineato che ricercatori italiani hanno dimostrato come la CFTR mutata determini l'innesco di risposte infiammatorie anche nelle cellule delle vie biliari (colangiociti) epatiche (Strazzabosco, Università di Milano Bicocca). Inoltre, è stato dimostrato che i monociti, sottopopolazione di leucociti appartenenti alle difese innate, esprimono CFTR funzionale ed, essendo facilmente isolabili dal sangue, possono costituire un bersaglio ottimale per monitorare l'effetto biologico di farmaci usati nel paziente (Sorio e Buffelli, Università di Verona). Va notato che CFTR regola la migrazione dei monociti dall'interstizio polmonare alle vie aeree, determinando indirettamente un maggiore richiamo di neutrofili, responsabili della particolare infiammazione FC (Sorio e Laudanna, Università di Verona).

Monociti per monitorare l'effetto di farmaci usati nel malato

Infezioni polmonari

La consapevolezza della centralità di *Pseudomonas aeruginosa* nelle infezioni polmonari dei pazienti con fibrosi cistica ha incoraggiato diversi studi sull'identificazione sia di fattori di virulenza del batterio che di meccanismi specifici implicati nella sua sopravvivenza nelle vie aeree, allo scopo di validare nuovi bersagli terapeutici utili ad eradicarne l'impianto. Tra questi, alcuni fattori regolanti la formazione del "biofilm" (Landini, Università di Milano; Leoni, Università di Roma 3; Venturi, ICGEB, Trieste; Visca, Università di Roma 3), componenti di superficie implicate nella sopravvivenza e virulenza del batterio (Bonomi, Università di Milano; Molinaro e Bernardini, Università di Roma La Sapienza; Polissi, Università di Milano Bicocca; Silipo, Università di Napoli Federico II), piccoli RNA regolanti la sintesi di fattori di virulenza (Bertoni, Università di Milano). Significativamente, i progressi nella comprensione dei meccanismi patogenetici dell'infezione da *Pseudomonas* hanno permesso di identificare potenziali farmaci, tra i quali il peptide antimicrobico M33 (Pini, Università di Siena), *esculentina*, un peptide antimicrobico isolato dalla pelle delle rane (Mangoni, Università di Roma La Sapienza) ed altri peptidi (Notomista, Università di Napoli Federico II; Gennaro e Scocchi, Università di Trieste).

Individuati nuovi fattori di virulenza di Pseudomonas aeruginosa, possibili bersagli per nuove terapie

Il potenziale terapeutico dei peptidi antimicrobici

Più recentemente è stata avviata una linea sperimentale tesa a validare l'uso di fagi (virus che infettano batteri) come strumenti per uccidere *Pseudomonas* (Ghisotti, Università di Milano). L'infezione da *Pseudomonas* è stata affrontata anche nel contesto di studi clinici finalizzati a definire il trattamento antibiotico migliore per eradicarne l'impianto dopo la prima infezione (Taccetti, Centro FC, Osp. Meyer, Firenze) e la distanza tra due persone che ne facilita la trasmissione (Braggion, Centro FC, Osp. Meyer, Firenze).

Nuove prospettive per Pseudomonas: i batteriofagi e l'eradicazione precoce

L'attenzione alle infezioni polmonari ha anche riguardato gli Stafilococchi meticillino-resistenti - MRSA (Taccetti, Centro FC, Firenze), nuovi patogeni emergenti come *Burkholderia cenocepacia*, con proposte innovative di trattamento antibatterico (Riccardi, Università di Pavia) e Micobatteri atipici (Tortoli, Istituto S. Raffaele, Milano) e, più recentemente, la caratterizzazione dell'intera popolazione batterica (il *microbioma*) che colonizza le vie aeree e il suo rapporto con l'evoluzione della malattia polmonare (Bevivino, Centro Ricerche ENEA, Roma).

Batteri emergenti: Stafilococco MRSA, Burkholderia cenocepacia e Micobatteri atipici, con proposte di trattamento

Il microbioma polmonare

Nel contesto delle terapie anti-batteriche, va sottolineato che diversi studi hanno permesso di fare ottimi progressi nella definizione e uso di nanoparticelle da utilizzare per la veicolazione di farmaci nelle vie aeree per aerosol (Berlutti, Università di Roma la Sapienza; Cocuzza, Università di Milano; Notomista e Quaglia, Univer-

Le nanoparticelle, via innovativa per veicolare farmaci per aerosol

sità di Napoli Federico II, Pini, Università di Siena; Sonnino, Università di Milano). Tali studi hanno un significato notevole anche nella prospettiva della veicolazione di altri farmaci.

Uomini, topi, tessuti e cellule

Un obiettivo sicuramente raggiunto in questi primi vent'anni di lavoro è stato la costruzione di una comunità molto ampia di scienziati che hanno acquisito interesse, conoscenze e competenze avanzate nell'ambito della fibrosi cistica. I più di 300 progetti finanziati hanno coinvolto e coinvolgono complessivamente molte centinaia di ricercatori. L'organizzazione di un meeting annuale (*Convention d'Autunno*), a cui partecipano questi ricercatori, ha avviato non solo un prezioso confronto scientifico, ma anche lo sviluppo di collaborazioni fra ricercatori con competenze diverse. Questa "rete" è ciò che contribuisce a rendere sostenibile, come cercavo di descrivere all'inizio, il progresso della conoscenza e la possibile sconfitta della malattia.

La rete di ricerca e la Convention dei ricercatori

I servizi alla ricerca per i modelli animali e per le colture primarie da polmoni FC espiantati

La Fondazione ha fatto enormi sforzi per mettere a disposizione dei servizi essenziali per lo sviluppo della ricerca in fibrosi cistica. Innanzitutto una struttura per la ricerca in vivo su topi difettivi di CFTR, o esprimenti CFTR mutata, che è ospitata presso l'Istituto san Raffele di Milano e diretta da Alessandra Bragonzi. Senza appropriati modelli animali, soprattutto in una patologia multiorgano complessa, la ricerca rimarrebbe confinata in un'area marginale e poco competitiva rispetto a quella di altri paesi. I topi ospitati al San Raffaele sono entrati in molti, avanzati studi, soprattutto negli ultimi anni. Più recentemente è stato finanziato presso l'Istituto Gaslini di Genova un servizio permanente finalizzato ad isolare, ed inviare ad altri ricercatori che ne fanno richiesta, cellule bronchiali primarie da pazienti FC (da polmoni espiantati in soggetti sottoposti a trapianto polmonare), diretto da Luis Galietta. Sono e saranno uno modello essenziale per lo studio dell'azione di nuovi farmaci.

Misurare l'effetto di nuovi farmaci: organoidi intestinali e cellule da brush nasale

Nell'ambito dei modelli di studio vi sono aspettative per la preparazione di organoidi a partire da prelievi bioptici poco invasivi (Melotti, Azienda ospedaliera-universitaria integrata, Verona; De Jonge, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Olanda) e cellule isolate da brush (spazzolamento) dell'epitelio endonasale (Castaldo, Università di Napoli Federico II). Anche questi è prevedibile rappresenteranno un modello elettivo per la valutazione dell'effetto di nuovi farmaci sulla funzione della CFTR mutata.

Considerazioni conclusive

La ricerca sulla fibrosi cistica in Italia è, dopo questi vent'anni, competitiva e avanzata. Ciò si deve soprattutto all'enorme sforzo fatto da pazienti, famigliari e amici per renderla possibile, sostenendola finanziariamente, e alla lungimiranza del Presidente, del Direttore Scientifico e del Consiglio di Amministrazione della Fondazione nel definire strategie per l'utilizzo dei fondi. Il Comitato Scientifico ha cercato e cerca di svolgere il suo compito. Non posso in chiusura non ricordare Antonio Cao, il primo Presidente del Comitato, e Gerd Döring, che non sono più fra noi, e dei quali ci manca il rigore e la competenza scientifica, e Lucio Luzzatto, secondo Presidente del Comitato e brillante scienziato e medico che è tornato al suo impegno di ricerca e cura in Africa. Grazie anche a Roberto Buzzetti, che è il solo, con me, ad aver condiviso questa stimolante avventura fin dall'inizio e a Paola Bruni, Gian Maria Rossolini e Paolo Bernardi che hanno portato in seguito nuove competenze, entusiasmo e capacità critiche. La qualità e la quantità dei risultati ottenuti, di alcuni dei quali ho fatto solo brevi cenni, rappresentano un bagaglio scientifico che potrà imprimere nuovo impulso all'attività di FFC nei prossimi anni, per il raggiungimento di obiettivi importanti nella storia di questa malattia.

313 PROGETTI **700 RICERCATORI** **500 PUBBLICAZIONI**

24 MILIONI PER RICERCA E FORMAZIONE

Riflessioni sulla Ricerca Scientifica

Paolo Bernardi
(Dipartimento di Scienze Biomediche,
Università di Padova.
Membro del Comitato Scientifico FFC)

Ho accettato con entusiasmo di far parte del Comitato Scientifico della FFC anche perchè l'invito veniva per il tramite dell'amico e collega Giorgio Berton, che conosco e stimo da più di trent'anni. Sono un medico-ricercatore attivo nello studio dei meccanismi alla base delle malattie, soprattutto riguardo il ruolo dei mitocondri – le nostre centrali energetiche. Non sono uno specialista della fibrosi cistica ma il mio approccio metodologico, in particolare lo studio dei canali ionici e la ricerca sui farmaci, mi ha fatto subito sentire vicino alla vostra "comunità di intenti", sentimento che si è rafforzato dopo l'incontro con Gianni Mastella, Graziella Borgo ed il Comitato Scientifico. Devo dire che mi sono subito sentito parte di una famiglia e .... non ho più avuto vie d'uscita! Ho già imparato moltissimo sulla malattia e ho trovato nelle procedure della FFC i più alti standard di rigore e di ricerca dell'eccellenza, lavoro reso meno difficile dalla straordinaria competenza e memoria storica del prof. Mastella e dei suoi collaboratori, a cui va la mia ammirazione per i risultati ottenuti in un periodo relativamente breve di attività.

Vorrei fare qualche considerazione sul ruolo delle società di raccolta dei fondi per la cura delle malattie in generale, e delle malattie "rare" in particolare. In Italia si investe troppo poco nella ricerca, con una tendenza che sembra non conoscere distinzioni di schieramento politico. La percezione che la ricerca sia un costo, quasi un lusso e non un'attività produttiva che si può quindi tagliare senza troppi problemi è una forma di miopia che in realtà costa molto. Ogni farmaco, ogni strumento complesso, ogni attrezzatura con licenze di esclusiva prodotti fuori dall'Italia, spesso per merito di italiani all'estero, comporta costi aggiuntivi per tutti noi (basti pensare al caso del Sofosbuvir per la terapia dell'epatite C, esclusiva della Gilead che al paziente italiano costa 37.000 Euro + IVA per un ciclo completo di terapia). In questo panorama le malattie "rare" sono ancora più trascurate, perchè si pensa che il numero di pazienti coinvolti non permetta un ritorno degli investimenti in termini di profitto. Anche questo è un atteggiamento miope. Abbiamo un debito con questi malati, perché lo studio delle malattie genetiche rare ci ha permesso non solo di curarne alcune, ma anche di capire elementi fondamentali che intervengono anche nelle malattie complesse e multifattoriali che colpiscono tutta la popolazione. Ridistribuire parte della ricchezza per la ricerca e la cura delle malattie rare sarebbe una forma di grande civiltà e condivisione, ma i pazienti non possono aspettare. Da qui nasce il ruolo fondamentale delle società no-profit come la FFC, che saldano il solco fra bisogni dei pazienti, sviluppo della ricerca e sperimentazione di terapie. La relazione dei colleghi Galietta e Bandiera rappresenta un esempio di successo e di speranza del metodo della Fondazione, che da un lato punta decisamente sui programmi con prospettive terapeutiche "prossime" ma dall'altro sostiene anche progetti di ricerca "esplorativi" purchè di alta qualità. È anche

in questa biodiversità la ricchezza della FFC, dato che spesso le svolte più innovative nella ricerca biomedica vengono da studi solo in apparenza lontani dal letto del malato, magari con costi iniziali contenuti ma che possono ancora fare la differenza soprattutto per i ricercatori più giovani.

Vorrei approfittare di questa occasione per ringraziare pubblicamente voi e tutte le Fondazioni no-profit che raccolgono fondi e selezionano progetti di ricerca di rilevanza medica per la cura delle malattie, quelle rare in particolare. Con due di queste ho un debito personale, un debito che cerco di saldare anche riversando nella FFC la mia esperienza. Nel 1988 sono rientrato da un periodo di studio di oltre 2 anni negli Stati Uniti in un momento assai difficile per un ricercatore giovane quale ero all'epoca. Il mio Dipartimento era senz'altro ottimo ma le possibilità di finanziamento scarsissime. Per i primi 3-4 anni sono riuscito a lavorare puntando su tecniche a basso costo ma è stata la comparsa di Telethon a ridirezionare la mia ricerca su temi di diretto interesse alla cura delle malattie muscolari, ottenendo il mio primo finanziamento nel 1992. Quel finanziamento (e soprattutto la lungimiranza di quel Comitato Scientifico) hanno cambiato la vita mia e di molti giovani che ho contribuito a formare. Ho potuto infatti iniziare e poi continuare per 25 anni i miei studi su una possibile terapia "mitocondriale" delle distrofie muscolari tramite finanziamenti che non si sono più interrotti. Questi finanziamenti mi hanno consolidato come ricercatore permettendomi di estendere gli studi ad altre patologie, comprese quelle neoplastiche con il supporto determinante di AIRC e dei fondi FIRB ministeriali. Sulla base di questa esperienza spero di essere anch'io capace di aiutare la FFC ad identificare le giovani promesse di oggi e i progetti del futuro, quelli che continueranno ad alimentare i vostri sforzi per i pazienti e a portare dalla speranza alla formulazione di terapie efficaci. A tutti voi i miei auguri più sinceri di buon lavoro e di crescente successo.

Panorama degli studi per terapie del difetto di base della fibrosi cistica

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

A quasi 28 anni dalla scoperta del gene CFTR, è ora possibile guardare il cammino fatto dalla ricerca e valutare successi e insuccessi. La scoperta del gene, nel 1989, dimostrò che la proteina CFTR mutata nei pazienti con fibrosi cistica (FC) risiede nella membrana di molti tipi di cellule, soprattutto dell'apparato respiratorio e digerente, nelle quali è coinvolta nel trasporto di ioni cloruro. In effetti, negli anni precedenti alcuni gruppi di ricerca avevano già fornito dei risultati che indicavano nel trasporto di ioni, e soprattutto di cloruro, uno dei problemi principali alla base della FC. Con il tempo si è capito, anche grazie allo sviluppo di modelli animali di FC quali il maiale, che CFTR è coinvolta anche nella secrezione di bicarbonato. Il deficit di bicarbonato sembra avere conseguenze negative, soprattutto nelle vie aeree, sulle proprietà del muco e sui meccanismi di difesa antibatterici (Figura 1)

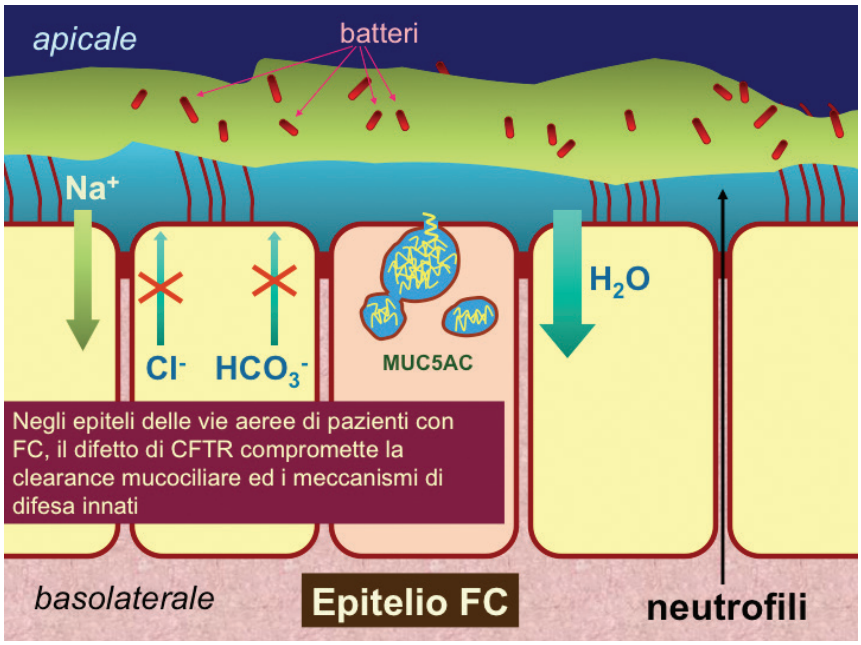


Figura 1. Conseguenze della perdita di funzione di CFTR nelle vie aeree dei pazienti FC.
Le cellule epiteliali prive di CFTR funzionante mostrano un deficit di secrezione di cloruro (Cl) e bicarbonato (HCO3-). A questo problema è associato anche l'assorbimento eccessivo di sodio (Na+). Le conseguenze sono molteplici: riduzione del fluido che ricopre le vie aeree, rallentamento del battito ciliare, accumulo di muco denso, compromissione delle difese antimicrobiche.

La scoperta del gene e le speranze per la terapia genica

Nei primi anni 90 si pensò che, trovato il gene, la cura della malattia fosse a portata di mano. Vari centri di ricerca provarono a trasferire il gene sano nelle cellule dei pazienti usando strategie di cosiddetta terapia genica, basate soprattutto su virus opportunamente modificati. Purtroppo gli studi dimostrarono che, per vari motivi, il trasferimento genico, con le tecnologie allora disponibili, era un processo molto inefficace.

Possibile un approccio farmacologico per correggere il difetto di base: i primi studi

Nonostante gli insuccessi iniziali della terapia genica, i ricercatori hanno continuato lo studio della proteina CFTR e delle mutazioni che la colpiscono per trovare una strategia terapeutica alternativa. Con gli anni è stato possibile capire che le diverse mutazioni che colpiscono il gene determinano la perdita di funzione della proteina CFTR con meccanismi diversi, raggruppabili in almeno 6 classi. In particolare, uno dei primi risultati dimostrò che la mutazione F508del, la più frequente tra i pazienti, compromette la struttura e stabilità di CFTR per cui questa non riesce a raggiungere la superficie cellulare ma viene precocemente degradata dalle cellule stesse che la riconoscono come un difetto di fabbricazione. Altri studi rivelarono che mutazioni diverse da F508del, ad esempio G551D, non alterano l'espressione della proteina CFTR ma la rendono inattiva, incapace di trasportare ioni cloruro. Dagli stessi studi emerse anche un'informazione molto importante: molti tipi di mutazioni FC non distruggono la funzione di CFTR in maniera irreversibile. Ad esempio, si dimostrò che la proteina con la mutazione F508del poteva essere salvata dalla degradazione incubando le cellule a bassa temperatura o con particolari sostanze chimiche quali il glicerolo. Venne anche dimostrata la possibilità di recuperare la CFTR colpita da G551D e mutazioni simili, definite di classe 3. In questo caso si scoprì che la proteina mutata poteva essere risvegliata dal suo "torpore" utilizzando composti chimici quali la genisteina. In definitiva, questi risultati resero i ricercatori consapevoli della possibilità di utilizzare un approccio farmacologico per la correzione del difetto di base nella FC. Per le mutazioni di classe 3 si trattava di identificare nuovi composti, chiamati genericamente *potenziatori*, che avessero attività paragonabile alla genisteina ma dotati di maggiore efficacia e specificità. Per F508del e altre mutazioni simili, definite di classe 2, bisognava invece cercare composti, per i quali venne coniato il termine di *correttori*, che mimassero l'effetto della bassa temperatura o del glicerolo (Figura 2).

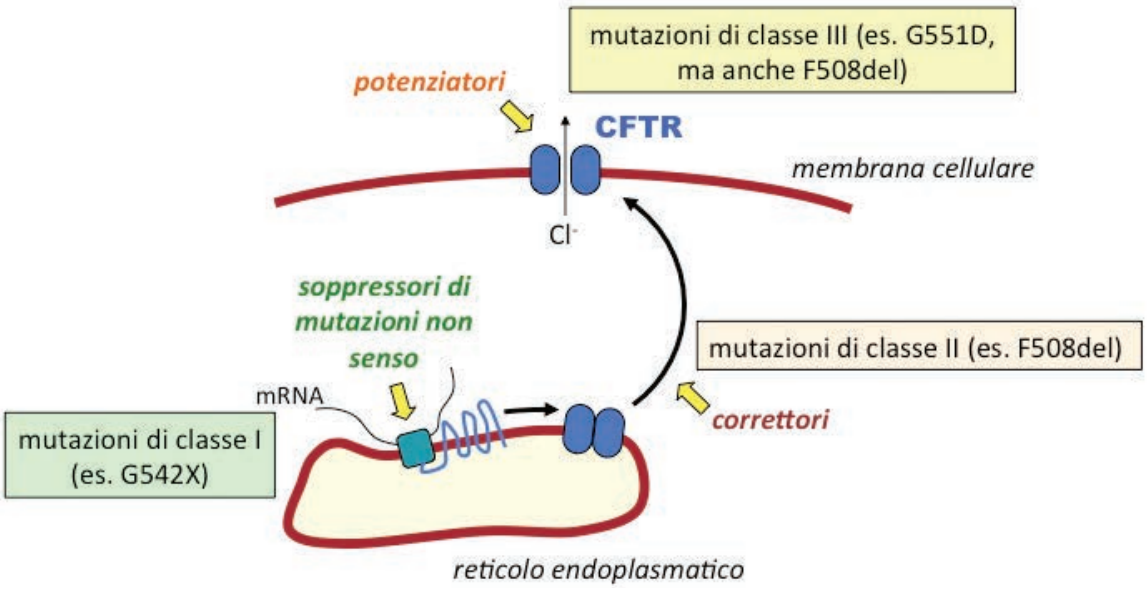


Figura 2. Strategie per la correzione farmacologica della CFTR mutata.
Molte mutazioni di classe I (es. G542X, R1162X, W1282X, che sono mutazioni stop o non senso) provocano l'arresto della sintesi della proteina CFTR. Durante la lettura del RNA messaggero che codifica la proteina, il processo di sintesi si arresta in corrispondenza della mutazione, generando una proteina CFTR tronca. Alcuni composti, come gli aminoglicosidi, funzionano da "soppressori" del messaggio di stop trasmesso da queste mutazioni, permettendo così la continuazione della sintesi. Le mutazioni di classe II, principalmente F508del, invece, compromettono la maturazione, la struttura e la stabilità della proteina CFTR. Questa viene sintetizzata nel reticolo endoplasmatico (un sistema di canali allineati a membrane, situato all'interno del citoplasma della cellula) ma non può raggiungere la sua corretta posizione nella membrana cellulare perché i meccanismi di controllo cellulari la riconoscono come proteina difettosa convogliandola quindi verso la degradazione. I correttori sono composti che possono migliorare la stabilità della proteina mutata facilitandone l'uscita dal reticolo. Infine, le mutazioni di classe III (es. G551D) non alterano la localizzazione della proteina CFTR ma bloccano il normale processo di attivazione che porta all'apertura del poro attraverso il quale passano gli ioni cloruro (Cl-). In questo caso, altri tipi di farmaci, i potenziatori, stimolano la proteina determinandone l'apertura.

Alla ricerca di correttori e potenziatori della proteina CFTR: successo del potenziatore Ivacaftor

Per trovare correttori e potenziatori sono stati sviluppati dei saggi ad alta capacità, capaci di valutare su cellule in coltura migliaia di composti al giorno. Nel corso degli anni, questi saggi sono stati utilizzati in diverse campagne di screening, sia in industrie farmaceutiche sia in laboratori di università e di centri di ricerca pubblici. Con questo approccio sono stati identificati diversi tipi di composti attivi sulla proteina CFTR mutata. Bisogna però considerare che la scoperta di composti chimici attivi in vitro su cellule è solo il primo passo verso lo sviluppo di farmaci. Infatti, molte sostanze attive non possono essere sviluppate ulteriormente perché prive delle altre proprietà necessarie per un farmaco quali la facilità di somministrazione, la stabilità all'interno del corpo umano e l'assenza di effetti nocivi. Non è quindi sorprendente che solo pochissimi composti siano stati approvati per l'uso su pazienti FC. La molecola che ha avuto più successo è stata il potenziatore Ivacaftor, sviluppato dalla compagnia farmaceutica Vertex. La grande efficacia di Ivacaftor, dimostrata in esperimenti di laboratorio e in studi clinici, ne ha permesso l'approvazione da parte delle agenzie del farmaco americana ed europea per il trattamento di pazienti con diversi tipi di mutazioni di classe 3.

Il problema dei correttori di CFTR-F508del

La ricerca di correttori è stata invece molto più complessa e irta di difficoltà. Il motivo è dovuto soprattutto agli effetti multipli che la mutazione F508del causa alla struttura della proteina CFTR. L'unico trattamento al momento disponibile per pazienti con due copie della mutazione F508del è il farmaco Orkambi costituito dalla combinazione del correttore Lumacaftor e del potenziatore Ivacaftor. Questo farmaco ha dimostrato una certa efficacia, seppure modesta, sulla funzione respiratoria dei pazienti. È possibile che Orkambi sarà utile per rallentare il decorso della malattia nei pazienti omozigoti per F508del, in attesa di farmaci più efficaci. Infatti la ricerca continua per lo sviluppo di nuovi correttori. La stessa Vertex e altre compagnie farmaceutiche e centri di ricerca (Abbvie/Galapagos, Flatley Discovery Lab) studiano nuovi composti, i cosiddetti correttori di seconda generazione, che potrebbero essere più efficaci di Orkambi. Alle compagnie farmaceutiche si affiancano anche altre iniziative promosse da fondazioni private. In particolare, in Italia, la Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica sostiene il progetto "*Task Force for Cystic Fibrosis*" che si prefigge di trovare nuovi composti per la correzione del difetto di base nella FC. I risultati ottenuti da questa iniziativa sono molto promettenti, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo di correttori dotati di alta potenza farmacologica.

Allo studio vie alternative: i regolatori della proteostasi

Altri tipi di possibili correttori per F508del sono stati trovati non eseguendo screening su vasta scala ma facendo attenzione alle alterazioni che la perdita di funzione di CFTR provoca a diverse funzioni intracellulari. L'ipotesi è che sostanze, possibilmente farmaci già conosciuti, in grado di normalizzare l'ambiente intracellulare abbiano un effetto benefico sulla proteina mutata. Da questa linea di ricerca sono nate alcune molecole quali la cisteamina e la timosina alfa1 che, per la loro modalità d'azione, sono stati definiti "regolatori della proteostasi" (un insieme di meccanismi all'interno delle cellule che controllano la biogenesi, la conformazione, il traffico e la degradazione delle proteine).

Correttori più potenti potrebbero giovare a pazienti con una sola mutazione F508del

Non è ancora possibile prevedere quali tra i vari farmaci sperimentali in corso di sviluppo riusciranno a raggiungere l'obiettivo desiderato, ma l'esistenza di tante iniziative in competizione tra loro aumenta la probabilità che uno o più trattamenti dotati di particolare efficacia siano confermati ed approvati nei prossimi anni. È opportuno notare che lo sviluppo di correttori molto attivi sarà particolarmente importante per quei pazienti dotati di una sola copia di F508del e di un'altra mutazione. Infatti, un recupero funzionale di F508del-CFTR molto vicino al 100%, senza necessità di correggere il secondo tipo di mutazione, sarebbe sufficiente ad avere una condizione clinica buona.

Farmaci per altre mutazioni CFTR: il caso delle mutazioni stop (o non senso)

Non bisogna dimenticare che altri tipi di mutazioni che colpiscono il gene CFTR sono anch'esse potenzialmente trattabili con agenti farmacologici. Tra queste ci sono alcune mutazioni appartenenti alla classe 1, quali G542X o R1162X (Figura 2). Queste sono mutazioni che provocano l'arresto della sintesi della proteina CFTR che normalmente è costituita da una catena di 1480 aminoacidi. Nel caso delle due mutazioni di classe 1 citate ad esempio, la proteina rimane tronca, ferma rispettivamente alle posizioni 542 e 1162. Alcuni anni fa si scoprì che il difetto di queste mutazioni poteva essere superato con composti chiamati aminoglicosidi (gruppo di antibiotici) efficaci in vitro ma non utilizzabili su pazienti perché hanno una certa tossicità. Anche in questo caso la ricerca ha trovato sostanze alternative. Una di queste è Ataluren, sviluppato dalla compagnia farmaceutica PTC Therapeutics. Sfortunatamente Ataluren non ha ottenuto risultati positivi in uno studio molto recente che si sperava potesse confermare gli effetti promettenti ottenuti in uno studio precedente. È possibile che l'efficacia di Ataluren in vitro sia stata sopravvalutata. Tuttavia, la speranza per le mutazioni di classe 1 non è persa perché alcuni ricercatori hanno sviluppato degli aminoglicosidi efficaci ma apparentemente privi di tossicità ed altri composti sono in fase di studio.

Medicina personalizzata: cellule e organoidi per valutare risposta individuale ai farmaci

È possibile prevedere che nei prossimi anni la ricerca metterà a disposizione dei clinici una batteria di farmaci che potranno essere adoperati da soli o in combinazione per massimizzare il recupero della funzione mutata. In effetti, sarà necessario commisurare il trattamento di ciascun paziente a seconda del tipo di mutazioni che porta, eseguendo la cosiddetta "medicina personalizzata" o "medicina di precisione". A tal riguardo, recentemente sono stati messi a punto dei metodi molto promettenti per valutare farmaci direttamente sulle cellule dei pazienti. Uno di questi metodi è basato sul prelievo mediante biopsie rettali di cellule che poi vengono coltivate generando dei cosiddetti organoidi intestinali, piccole sfere che racchiudono al loro interno una piccola quantità di fluido (Figura 3B).

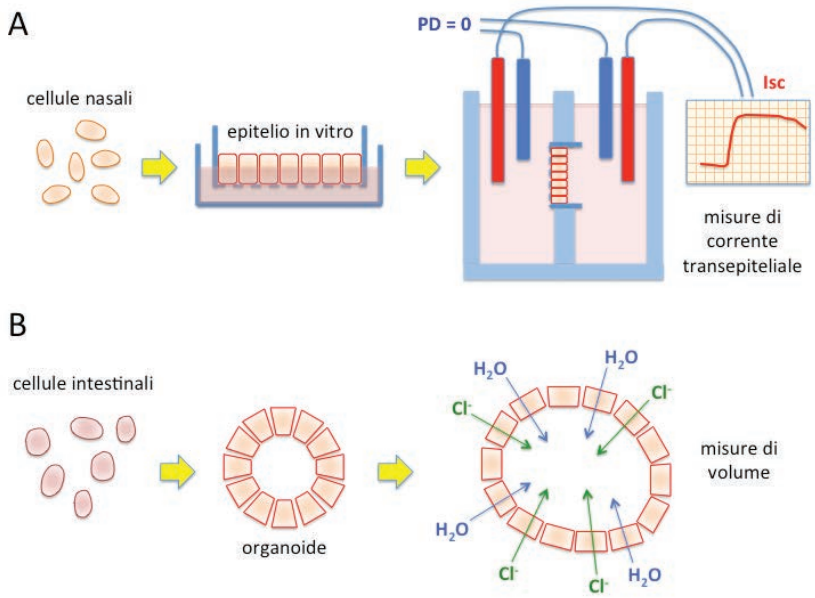


Figura 3. Test cellulari per la determinazione della sensibilità farmacologica di CFTR. *(A) Test su cellule epiteliali nasali. Le cellule vengono prelevate dal naso di pazienti FC e da soggetti di controllo mediante la procedura del "brushing". Dopo opportuna espansione del numero di cellule con la coltura in vitro, queste vengono poi seminate su membrane porose in condizioni tali da rigenerare un epitelio simile a quello originario. Gli epiteli così prodotti vengono sistemati in una "camera di Ussing" nella quale, con opportuni elettrodi, è possibile misurare la corrente ionica transepiteliale associata all'attività di CFTR. In particolare, la corrente viene misurata bloccando la differenza di potenziale elettrico (PD) a zero. (B) Test su cellule epiteliali intestinali. Le cellule vengono prelevate con una biopsia rettale. Seminate all'interno di una matrice gelatinosa, formano dei cosiddetti "organoidi", strutture cave ripiene di liquido. La stimolazione di CFTR provoca il rigonfiamento degli organoidi, che può essere facilmente misurato con un microscopio equipaggiato con una telecamera.*

La stimolazione di CFTR nelle cellule intestinali provoca la secrezione di cloruro ed acqua che determina un rigonfiamento dell'organoide. Quindi, misurando al microscopio il rigonfiamento di organoidi generati da pazienti FC è possibile determinare l'attività di CFTR e quindi il grado di risposta a correttori, potenziatori ed altri tipi di farmaci. Il secondo metodo è invece basato sul prelievo di cellule nasali attraverso una procedura poco invasiva chiamata "brushing" (prelievo di cellule dell'epitelio nasale mediante "spazzolamento"). È possibile coltivare queste cellule fino a generare tessuti che riproducono fedelmente gli epiteli che rivestono in vivo le vie aeree (Figura 3A). Anche su questi preparati è possibile valutare l'attività della proteina CFTR mutata e la risposta a farmaci. A questo scopo si usa la tecnica della registrazione della corrente transepiteliale in corto circuito (Isc) in camera di Ussing. Infatti, il trasporto di ioni mediato da CFTR è rivelabile come flusso di cariche elettriche che attraversano l'epitelio. In definitiva, i test effettuati su cellule di pazienti permetteranno di identificare i tipi di trattamento maggiormente efficaci. Questo sarà particolarmente importante per i pazienti con mutazioni rare, la cui sensibilità farmacologica non è ancora conosciuta.

Altri bersagli terapeutici indipendenti da CFTR, per tutti i malati

La proteina CFTR non è l'unico bersaglio possibile per correggere il difetto di base nella FC. Infatti, il deficit di CFTR, soprattutto nell'apparato respiratorio, determina uno scompenso generale dei meccanismi di trasporto di elettroliti e di acqua che coinvolgono anche altri tipi di proteine. Tra queste c'è ENaC, un altro tipo di canale ionico che, a differenza di CFTR, non trasporta cloruro ma sodio. Diversi studi hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica di ENaC potrebbe migliorare la situazione nelle vie aeree dei pazienti FC, aumentando l'idratazione e quindi la fluidità delle secrezioni mucose. Quindi alcuni centri di ricerca e industrie farmaceutiche si concentrano su ENaC lavorando allo sviluppo di inibitori specifici che, a differenza di correttori e potenziatori, dovrebbero essere somministrati per via inalatoria. Il motivo è la necessità di evitare effetti collaterali vista la funzione di ENaC in altri organi, soprattutto nel rene. Altri possibili bersagli alternativi sono rappresentati dalle proteine TMEM16A e SLC26A9, che funzionano da canali del cloruro. In questo caso, la loro stimolazione con farmaci opportuni potrebbe essere il modo per aggirare l'ostacolo costituito dalla proteina CFTR mutata. È opportuno notare che la modulazione di bersagli alternativi avrebbe potenzialmente efficacia su tutti i pazienti FC ma sarebbe di particolare importanza soprattutto per gli individui con mutazioni di CFTR non trattabili farmacologicamente (ad esempio delezioni del gene o mutazioni con scivolamento del codice di lettura).

Terapie del futuro: riparazione del gene (*gene editing*)

Il trattamento farmacologico del difetto di base rappresenta sicuramente la strategia più promettente per la FC nel prossimo futuro. È ovvio però che i pazienti dovranno assumere i farmaci per tutta la loro vita. Il passo successivo sarà la possibilità di curare il difetto di base alla radice, sostituendo il gene malato o addirittura tutta la cellula. Due sono le scoperte principali degli ultimi anni che hanno risvegliato le speranze nella terapia genica e nella terapia cellulare. La prima è la scoperta di meccanismi molecolari di taglio e riparazione del DNA che possono essere sfruttati per effettuare il cosiddetto "*gene editing*" (Figura 4).
Particolare attenzione è rivolta verso le cosiddette "forbici molecolari" basate sul metodo CRISPR/Cas9. Cas9 è una nucleasi, una proteina che taglia il DNA, che utilizzando degli opportuni RNA può essere indirizzata verso punti precisi del genoma cellulare, ad esempio in corrispondenza di una mutazione del gene CFTR. Avvenuto il taglio, le cellule effettuano una riparazione che, in presenza di un opportuno DNA stampo, può portare all'eliminazione definitiva della mutazione e al ripristino della sequenza normale del gene CFTR. Sono stati già pubblicati studi in cui la riparazione del gene CFTR è stata ottenuta in vitro su cellule umane in coltura. L'ostacolo principale, che al momento appare quasi insormontabile, è capire come effettuare la riparazione in vivo. In pratica, nessuno sa ancora come portare Cas9, l'RNA guida ed il DNA stampo nelle cellule malate dei pazienti FC. Nonostante l'obiettivo sia molto difficile, sono state investite risorse imponenti per applicare il "*gene editing*" alla FC e ad altre malattie ereditarie.

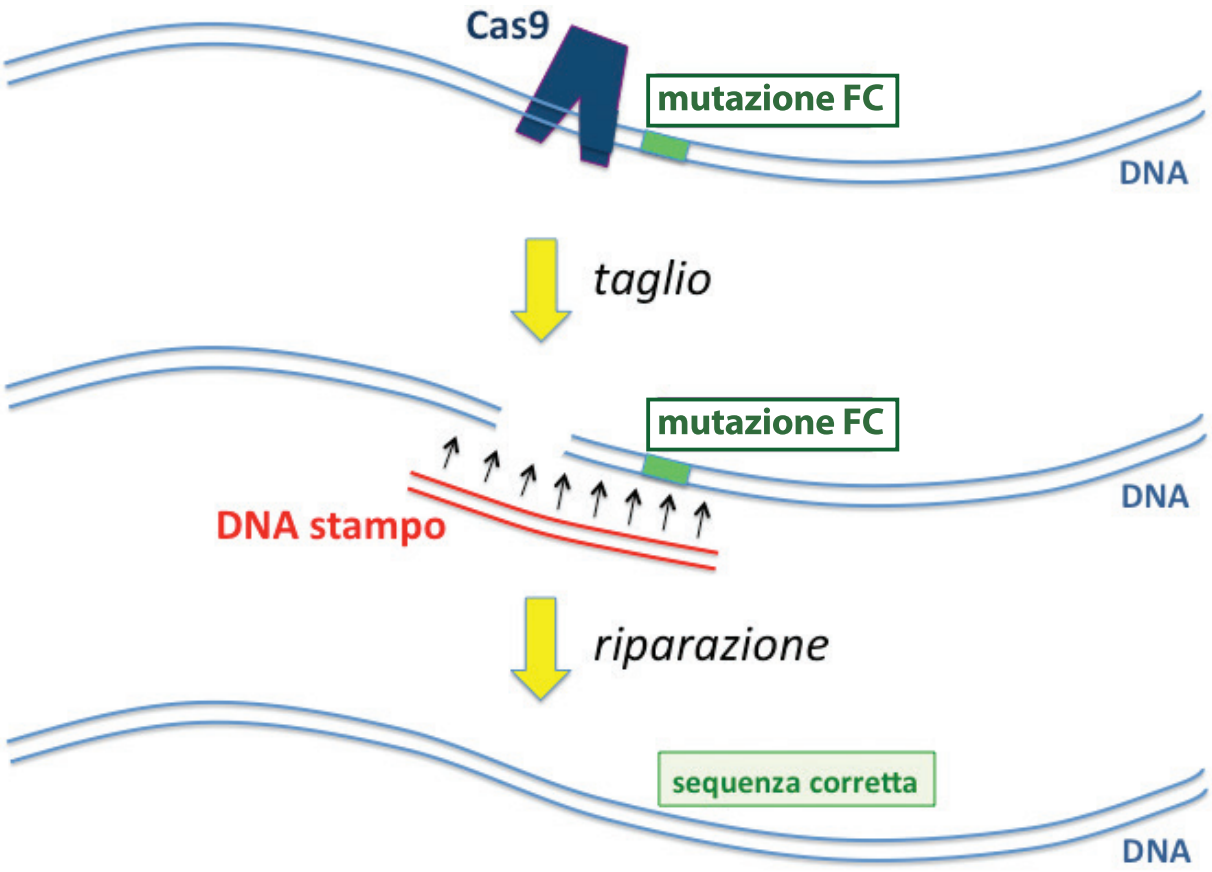


Figura 4. Strategia di "gene editing" per la correzione delle mutazioni FC. *L'enzima Cas9, che funziona tagliando i due filamenti di DNA, viene posizionato precisamente in prossimità di una mutazione utilizzando degli RNA guida (non raffigurati). Le cellule tendono normalmente a riparare i tagli al DNA utilizzando un meccanismo (chiamato "non-homologous end joining", NHEJ) che incolla le estremità tagliate. Tuttavia in presenza di un opportuno DNA stampo, in cui la mutazione è assente, può essere utilizzato un tipo di riparazione diverso ("homology directed repair", HDR) in cui parte del tratto di DNA a monte e a valle del taglio viene sostituita con la sequenza corretta.*

Il possibile futuro: cellule staminali

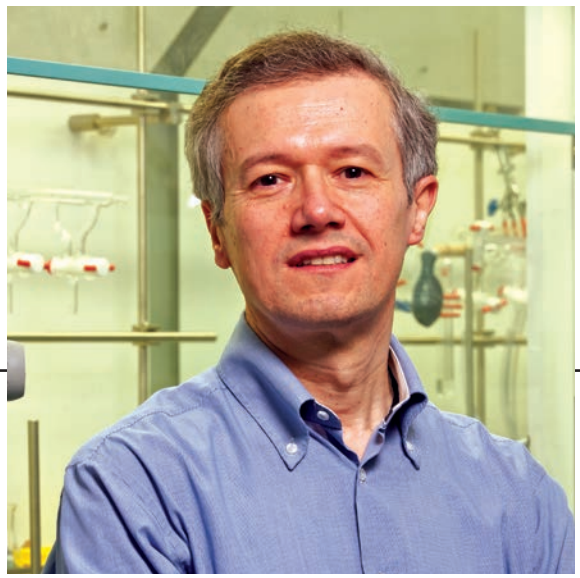
La seconda scoperta riguarda le cellule staminali. Fino ad alcuni fa si pensava che le cellule adulte non potessero generare nuovi organi e tessuti. Invece è possibile riprogrammare le cellule adulte facendole tornare bambine e quindi staminali. Nel caso della FC, questa scoperta potrebbe servire in futuro per prelevare cellule dal paziente, riprogrammare le cellule facendole diventare staminali, effettuare in vitro il "*gene editing*" per correggere il gene CFTR e utilizzare poi le cellule corrette per ripopolare i tessuti malati. In questo caso il processo di "*gene editing*" sarebbe facilitato perché avverrebbe in vitro. La difficoltà sarebbe però al momento quella del trapianto delle cellule curate, perché finora la possibilità di ottenere una sufficiente rigenerazione del tessuto tramite staminali non è stata dimostrata. In definitiva, i nuovi approcci di terapia genica e terapia cellulare potrebbero rappresentare la soluzione definitiva per la FC ma ci vorranno molti anni per sviluppare procedure efficaci. Nel frattempo, la disponibilità crescente di farmaci permetterà ai pazienti di affrontare il futuro con ragionevole ottimismo.

PANORAMA DELLE STRATEGIE TERAPEUTICHE

approccio	obiettivo	meccanismo d'azione	tipo di trattamento (farmaci già in uso o in corso di sperimentazione)	entità coinvolte
correttori	CFTR con F508del e altre mutazioni di classe 2	correzione del difetto di maturazione (probabile effetto diretto sulla proteina CFTR mutata)	VX-809 (Lumacaftor), VX-661 (Tezacaftor), Orkambi (combinazione di Lumacaftor e Ivacaftor), GLPG2222, GLPG2737, FDL169	Vertex Pharmaceuticals, Abbvie/Galapagos, Flatley Discovery Lab, CFFT, progetto TFCF (FFC)
regolatori della proteostasi	CFTR con mutazione F508del	correzione del difetto di maturazione (effetto basato sulla modulazione dell'ambiente intracellulare)	cisteamina, timosina alfa 1	centri di ricerca di Novara, Milano, Perugia, Roma
potenziatori	mutazioni di classe 3 (G178R, G551D, G1244E, G1349D ecc.)	stimolazione dell'attività (gating) della proteina CFTR mutata	VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco), CTP-656 (forma deuterata di VX-770), GLPG1837	Vertex Pharmaceuticals, CoNCERT Pharmaceuticals, Abbvie/Galapagos, progetto TFCF (FFC)
soppressori di mutazioni non senso (agenti "readthrough")	mutazioni di classe 1 (G542X, R1162X, W1282X ecc.)	superamento delle mutazioni non senso con sintesi della proteina CFTR completa	PTC124 (Ataluren), aminoglicosidi	PTC Therapeutics, CFFT
attivatori o inibitori di canali alternativi	tutte le mutazioni	stimolazione della secrezione di cloruro (TMEM16A, SLC26A9); inibizione dell'assorbimento di sodio (ENaC)	P-1037, altri inibitori di ENaC, attivatori di TMEM16A	Parion, Vertex Pharmaceuticals, Novartis, Enterprise Therapeutics
gene editing	tutte le mutazioni	riparazione del gene CFTR mutato	strategie basate su CRISPR/Cas9	diversi centri di ricerca

Bibliografia

- *Fajac I, De Boeck K (2017) New horizons for cystic fibrosis treatment. Pharmacol Ther 170: 205-211*
- *Galietta LJ (2013) Managing the underlying cause of cystic fibrosis: a future role for potentiators and correctors. Paediatr Drugs 15: 393-402*
- *Harrison PT, Sanz DJ, Hollywood JA (2016) Impact of gene editing on the study of cystic fibrosis. Hum Genet 135: 983-992*
- *Hoegger MJ, Fischer AJ, McMenimen JD, Ostedgaard LS, Tucker AJ, Awadalla MA, Moninger TO, Michalski AS, Hoffman EA, Zabner J, Stoltz DA, Welsh MJ (2014) Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. Science 345: 818-822*
- *Mall MA, Galietta LJ (2015) Targeting ion channels in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 14: 561-570*
- *Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, Beekman JM (2016) Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: a successful patient-oriented research collaboration. Curr Opin Pulm Med 22: 610-616*
- *Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB Jr, Welsh MJ, Zabner J (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. Nature 487: 109-113*
- *Romani L, Oikonomou V, Moretti S, Iannitti RG, D'Adamo MC, Villella VR, Pariano M, Sforna L, Borghi M, Bellet MM, Fallarino F, Pallotta MT, Servillo G, Ferrari E, Puccetti P, Kroemer G, Pessia M, Maiuri L, Goldstein AL, Garaci E (2017) Thymosin α1 represents a potential potent single-molecule-based therapy for cystic fibrosis. Nat Med doi: 10.1038/nm.4305*
- *Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. Mol Biol Cell 27: 424-433*
- *Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P (2009) Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. Proc Natl Acad Sci USA 106: 18825-18830*
- *Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci USA 108: 18843-18848*



Il progetto Task Force for Cystic Fibrosis: ultima fase e prospettive di seguito

Tiziano Bandiera
(Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)

L'idea e l'avvio

Il progetto "Task Force for Cystic Fibrosis" (TFCF) nasce con l'obiettivo di identificare nuovi potenziali farmaci per il trattamento della fibrosi cistica. Si tratta di un progetto applicativo, in cui le conoscenze di base e le tecnologie sviluppate nell'ambito della ricerca sulla fibrosi cistica, quali i saggi messi a punto per valutare l'attività biologica dei composti, vengono utilizzate per cercare nuove molecole in grado di potenziare l'attività (potenziatori) o correggere la forma (correttori) della proteina difettosa all'origine della malattia, nota come *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR).

Alla ricerca di correttori e potenziatori della proteina CFTR difettosa

La realizzazione dell'obiettivo del progetto è affidata ad un team di ricercatori dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova, con competenze di biologia, farmacologia e screening di composti, guidato dal dott. Luis Galietta (attualmente al TIGEM, Pozzuoli - Napoli), e dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) di Genova, con competenze di chimica farmaceutica ed esperienza nel processo di ricerca di nuovi farmaci, coordinato dal dott. Tiziano Bandiera.

Il progetto TFCF, iniziato a Marzo 2014, si sviluppa su tre fasi della durata complessiva di 3,5 anni, come mostra schematicamente la Figura 1, ed è supportato dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC).

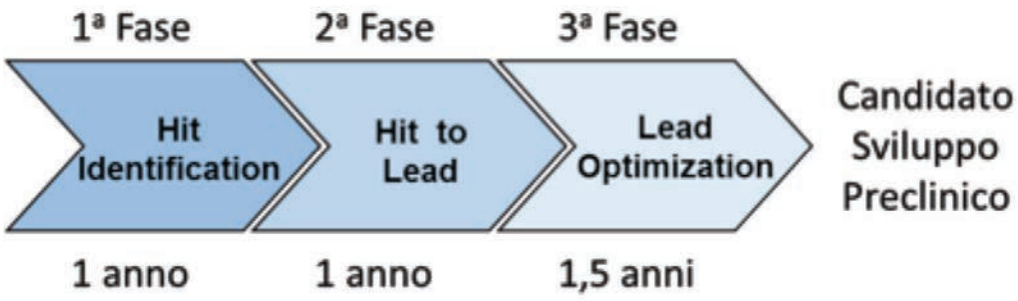


Figura 1. *Rappresentazione schematica delle fasi e della durata del progetto TFCF.*

La prima fase del progetto: "Hit Identification"

Lo screening di 11300 composti chimici porta all'identificazione di 5 composti attivi (hits) appartenenti a diverse classi chimiche

Nella prima fase del progetto, detta in gergo **"Hit Identification"**, è stato condotto lo screening di oltre 11300 composti chimici diversi, esistenti nella collezione di composti del dipartimento di Drug Discovery and Development (Scoperta e Sviluppo Farmaci) dell'IIT. Tale screening ha comportato l'esecuzione di oltre 82000 test e ha portato all'identificazione di "hits", vale a dire "composti attivi" nei saggi cellulari utilizzati per la ricerca di correttori e di potenziatori. Tra questi composti ne sono stati selezionati 5, appartenenti a tre diverse classi chimiche, come punto di partenza per la seconda fase del progetto. Due degli hits selezionati hanno mostrato attività come correttori, mentre gli altri tre si sono dimostrati attivi come potenziatori.

La seconda fase del progetto: "Hit to Lead"

La seconda fase del progetto, detta **"Hit to Lead"** (dai composti attivi ai composti "guida"), ha visto l'inizio delle attività di sintesi chimica e di chimica farmaceutica. I chimici hanno lavorato alla sintesi di nuovi composti, analoghi per struttura chimica agli hits selezionati, con l'obiettivo di ottenere molecole più potenti ed efficaci. Nel secondo anno del progetto si è sviluppato appieno il "lavoro di team", che ha visto uno stretto contatto e interscambio tra chimici e biologi. I risultati dei nuovi composti nei saggi biologici hanno dato ai chimici informazioni importanti per poter disegnare e sintetizzare nuove molecole.

Disegno e sintesi di molecole più efficaci (composti guida) con attività di correttori e potenziatori

In tal modo, mediante un processo iterativo consistente nella sintesi di nuovi composti, test di questi ultimi negli opportuni saggi, condivisione e discussione dei risultati, disegno e sintesi di nuove molecole sulla base delle informazioni ottenute, si è arrivati a composti più potenti ed efficaci. Complessivamente, sono stati sintezzati oltre 250 composti, ciascuno dei quali è stato testato nei saggi cellulari specifici per valutarne l'attività come correttore o come potenziatore. I composti più interessanti dal punto di vista dell'attività biologica sono stati ulteriormente caratterizzati in altri saggi mirati a determinarne la solubilità, la stabilità al metabolismo epatico e l'eventuale tossicità epatica. Questo lavoro ha condotto all'identificazione di alcuni correttori e potenziatori con migliori caratteristiche rispetto agli hits di partenza.

Da 5 hits la sintesi di 250 composti tra i quali vengono identificati i leader con caratteristiche migliori degli hits di partenza

Le molecole più efficaci (Leads) nel campo dei correttori

Vari saggi per scoprire fra i composti leader i migliori correttori di F508del-CFTR

Nella terminologia del processo di ricerca di nuovi farmaci, tali composti vengono definiti "Leads". Per quanto riguarda i correttori, il miglioramento ottenuto è illustrato nelle Figure 2A,2B,2C, che paragonano l'efficacia del correttore VX-809 (lumacaftor), di un hit (composto attivo) chiamato ARN5562 e di tre composti arrivati allo stadio di composti leader come correttori: ARN19736, ARN19768, ARN21586, in diversi saggi biologici con mutazione F508del.

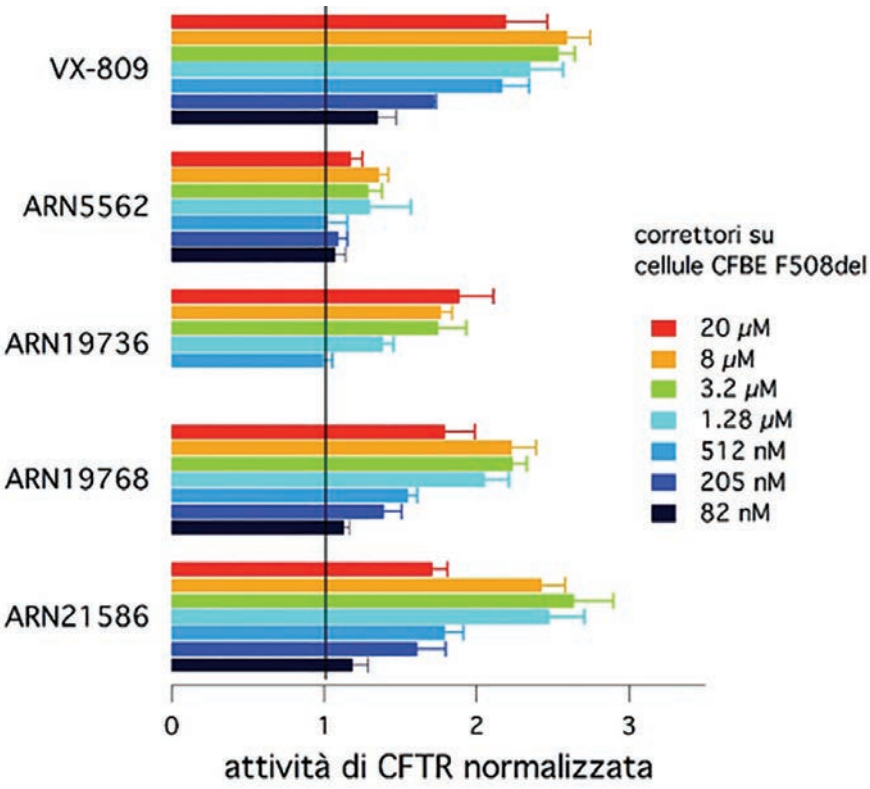


Figura 2 A: Saggio su cellule CFBE41o- (cystic fibrosis bronchial cells, cellule epiteliali bronchiali umane) esprimenti F508del-CFTR.
Le barre indicano l'attività della proteina F508del-CFTR in membrana dopo trattamento con il composto alla concentrazione indicata dal colore. La linea nera verticale indica l'attività del mezzo nel quale è sciolto il composto (controllo). Nella figura le concentrazioni più basse sono rappresentate dal colore celeste chiaro (1.28μM), verde(3.2μM) e giallo (8μM). Maggiore è la lunghezza della barra colorata, più elevata è l'attività del composto. I composti migliori sono quelli che hanno elevata attività anche a bassa concentrazione (composti più potenti). Tali composti potrebbero essere somministrati a un dosaggio più basso di composti meno potenti, diminuendo così la possibilità di effetti collaterali. Per attività di CFTR normalizzata si intende la misura del recupero dell'attività della CFTR nelle cellule trattate rispetto a quanto si osserva nelle cellule non trattate (controllo).

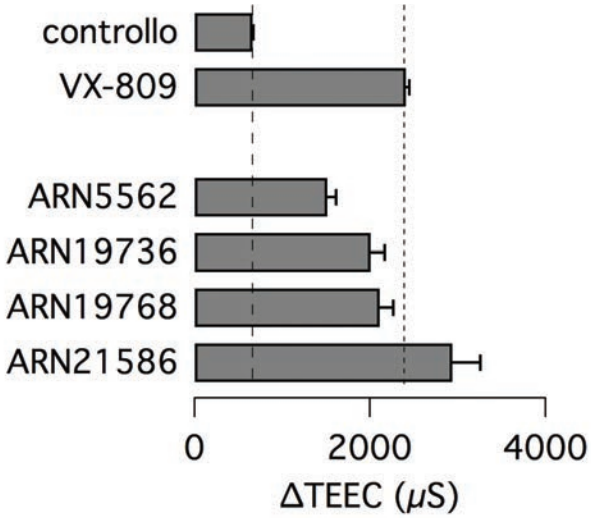


Figura 2 B: Saggio su cellule FRT (Fischer Rat Thyroid, cellule tiroidee da ratti Fischer) esprimenti F508del -CFTR.
Le barre indicano la variazione di conduttanza (TEEC), espressa in microSiemens (S), indotta da ciascun correttore attraverso uno strato di cellule FRT. La conduttanza è definita come l'inverso della resistenza al passaggio di corrente, dovuta al flusso di ioni attraverso lo strato di cellule. Più bassa è la resistenza al passaggio di ioni (corrente), più elevata è la conduttanza. Maggiore è la variazione di conduttanza, maggiore è la quantità di proteina CFTR che il correttore riesce a far giungere in membrana e, pertanto, più alta è l'efficacia del correttore

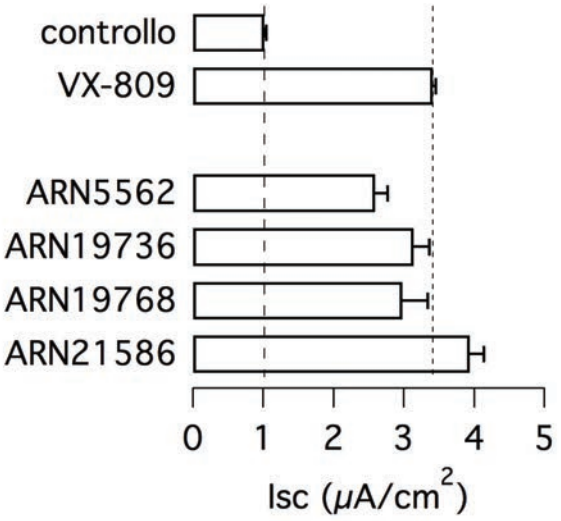


Figura 2 C: Saggio su cellule bronchiali di pazienti omozigoti per la mutazione F508del-CFTR.
Le barre indicano l'entità del recupero di F508del-CFTR, rispetto al controllo, a seguito del trattamento con ciascun correttore alla concentrazione di 5 micromolare (1 micromolare nel caso di VX-809). Tale recupero viene stimato con una misura dell'intensità di corrente (Isc) che fluisce attraverso uno strato di cellule dopo trattamento con i correttori. La corrente è dovuta al flusso di ioni cloruro attraverso la proteina CFTR presente sulla membrana cellulare. Maggiore la corrente misurata, maggiore sarà la quantità di proteina che il correttore riesce a far giungere in membrana e, pertanto, più alta è l'efficacia del correttore.

Il dato più importante si ottiene su cellule bronchiali primarie F508del e riguarda il correttore ARN21586

A partire da uno degli hits identificati nello screening della collezione di composti, la cui sigla è ARN5562, si è arrivati al composto ARN21586 che, nei tre saggi maggiormente utilizzati per valutare l'attività dei composti, ha mostrato efficacia paragonabile al correttore VX-809 (lumacaftor), il principio attivo presente insieme al potenziatore ivacaftor nel farmaco Orkambi. Tra questi saggi, quello che fornisce il dato più importante è il test condotto su cellule bronchiali di pazienti omozigoti per la mutazione F508del nella proteina CFTR. Il risultato riportato è una misura del recupero dell'attività della CFTR nelle cellule trattate rispetto a quanto si osserva nelle cellule non trattate (controllo). Nella fase di Hit to Lead è stata esplorata anche una seconda classe di correttori aventi struttura chimica diversa dagli analoghi di ARN5562. Questa esplorazione ha portato a composti con attività migliore rispetto al hit di partenza, ma con efficacia e potenza inferiore a quella di correttori quali ARN21586.

Le molecole più efficaci (Leads) nel campo dei potenziatori

Alla ricerca dei migliori potenziatori: due potenziatori leader ARN19885 e ARN20011

Le attività sui potenziatori sono partite da tre hits appartenenti alla stessa classe chimica, vale a dire composti aventi una struttura di base comune. Mediante il processo iterativo precedentemente descritto per i correttori, si sono ottenuti i composti ARN19885 e ARN20011. Come si può osservare in Figura 3, i potenziatori ARN19885 e ARN20011 hanno dimostrato efficacia paragonabile al hit ARN12350 ma maggiore potenza, in quanto mostrano attività più elevata di ARN12350 alle concentrazioni più basse.

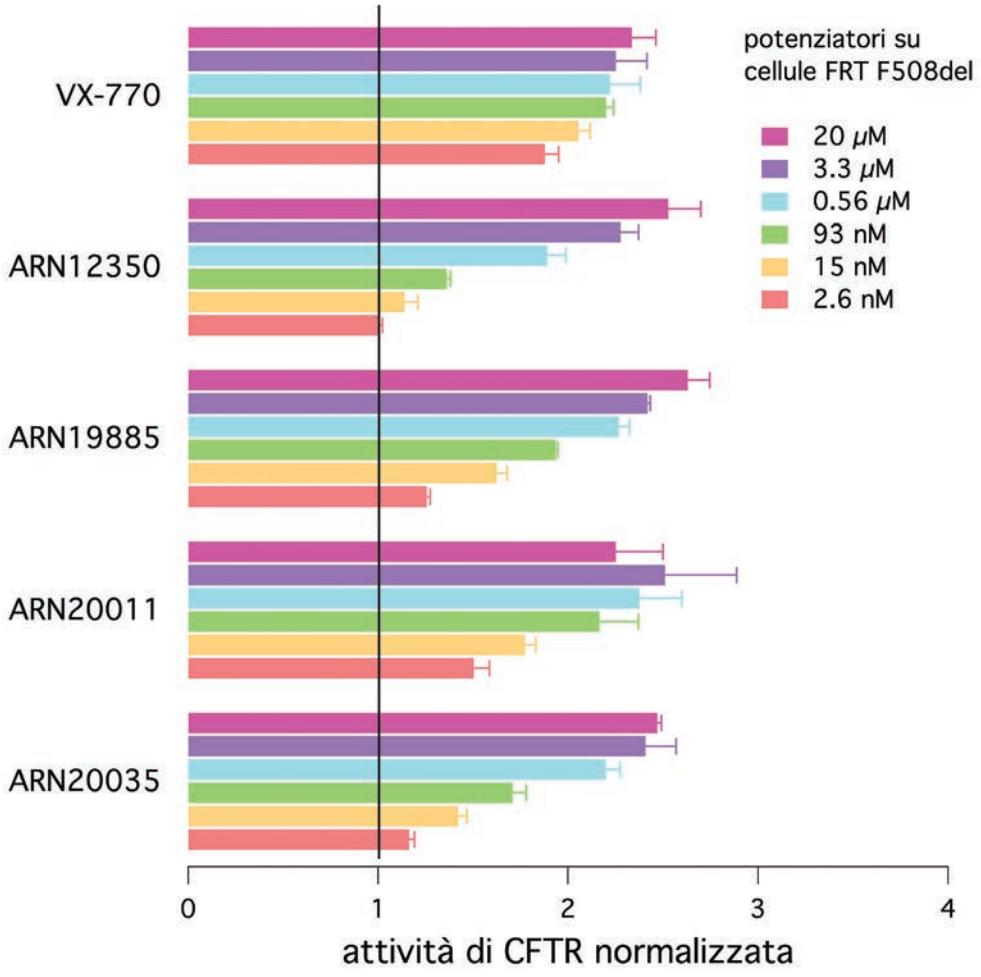


Figura 3. Valutazione dell'efficacia del potenziatore VX-770 (ivacaftor), del hit ARN12350 e di tre potenziatori Task Force nel saggio su cellule FRT (Fisher Rat Thyroid, cellule tiroidee da ratti Fisher) esprimenti F508del di CFTR.
Le barre indicano l'attività della proteina F508del-CFTR in membrana dopo trattamento con il composto alla concentrazione indicata dal colore. I colori che indicano le concentrazioni più basse sono celeste chiaro (0.56μM), rosso chiaro (2.6nM), viola (3.3μM) e ciclamino (20μM). La linea nera verticale indica l'attività del mezzo nel quale è sciolto il composto (controllo). Maggiore è la lunghezza della barra colorata, più elevata è l'attività del composto.

La terza fase del progetto: "Lead Optimization"

I risultati ottenuti nella seconda fase del progetto hanno costituito il punto di partenza per la terza fase, definita in gergo **"Lead Optimization"** (ottimizzazione dei Leads). Questa è la fase più difficile e impegnativa del processo di ricerca di nuovi farmaci in quanto occorre modificare la struttura chimica dei Leads precedentemente ottenuti per ottimizzarne le loro proprietà. In particolare, la sfida consiste nell'ottenere composti che ad una buona efficacia e potenza nei saggi cellulari uniscano le caratteristiche che si ritrovano tipicamente nei farmaci che sono utilizzati nell'uomo quali, ad esempio, solubilità, sufficiente stabilità al metabolismo epatico, assenza di tossicità in specifici saggi cellulari, assorbimento dal tratto gastro-intestinale dopo somministrazione orale e sufficiente durata del composto nel circolo sanguigno per poter raggiungere gli organi bersaglio ed esercitare la loro azione farmacologica. Tali caratteristiche vanno sotto il nome di "*drug-likeness*", ovvero somiglianza ad un farmaco.

Nella fase di lead optimization viene modificata la struttura chimica del composto leader affinchè acquisti le caratteristiche di un vero farmaco

Il composto candidato allo sviluppo preclinico

L'obiettivo di questa fase è di arrivare all'identificazione di almeno un "candidato allo sviluppo preclinico", vale a dire un composto che abbia efficacia e potenza possibilmente superiori allo standard di riferimento (lumacaftor nel caso di un correttore, ivacaftor nel caso di un potenziatore), e possieda le caratteristiche di *drug-likeness* descritte precedentemente.

La fase di "Lead Optimization", tuttora in corso, ha visto un aumento delle risorse chimiche impegnate nel progetto allo scopo di contenere i tempi per la possibile identificazione del candidato allo sviluppo preclinico. Le attività si sono focalizzate prevalentemente sull'ottimizzazione della classe di correttori rappresentata da ARN21586. I risultati ottenuti finora sono sinteticamente illustrati in Figura 4, nella quale sono mostrati i dati di attività di alcuni dei correttori migliori nel saggio su cellule bronchiali di pazienti omozigoti per la mutazione F508del nella proteina CFTR.

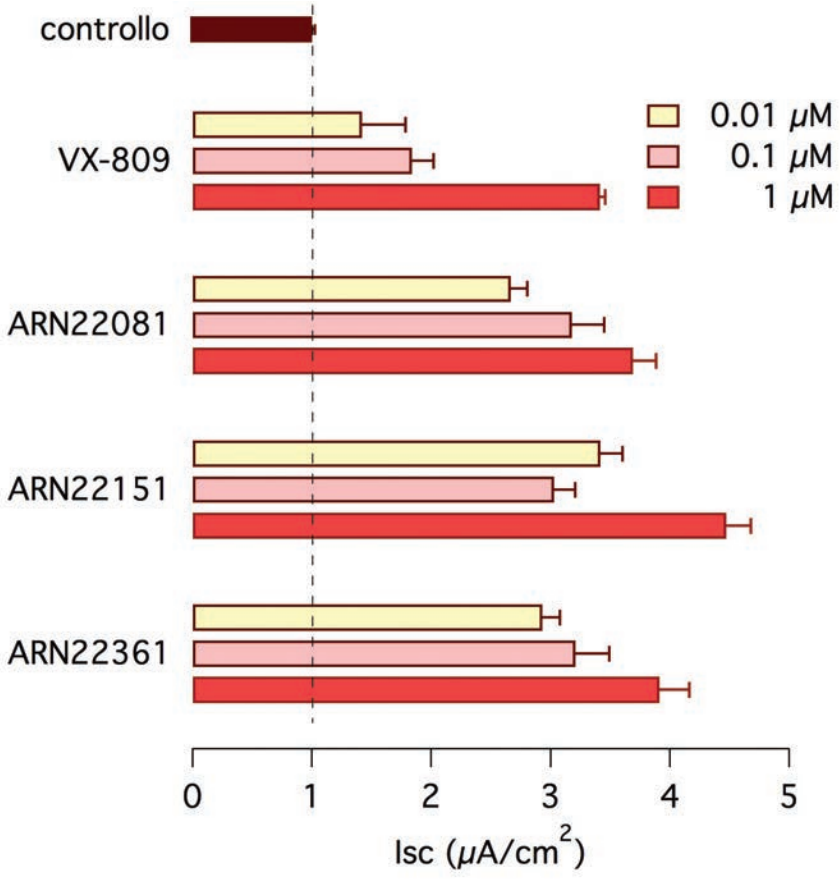


Figura 4. Valutazione dell'efficacia del correttore VX-809 (lumacaftor) e di tre correttori Task Force nel saggio su cellule bronchiali di pazienti omozigoti per la mutazione F508del di CFTR.
Le barre indicano l'entità del recupero di F508del-CFTR, rispetto al controllo, a seguito del trattamento con ciascun correttore a tre diverse concentrazioni: 1, 0.1 e 0.01 micromolare (mM). Tale recupero viene stimato con una misura dell'intensità di corrente (Isc) che fluisce attraverso uno strato di cellule dopo trattamento con i correttori. La corrente è dovuta al flusso di ioni cloruro attraverso la proteina CFTR presente sulla membrana cellulare. Maggiore sarà la corrente misurata, maggiore la quantità di proteina che il correttore riesce a far giungere in membrana, e, pertanto, più alta sarà l'efficacia del correttore.

Prove di efficacia dei nuovi correttori

Come si può vedere, i correttori ARN22081, ARN22151 e ARN22361 mostrano efficacia comparabile o superiore a quella di VX-809. In particolare, si può notare come l'efficacia dei correttori Task Force alla concentrazione di 1 micromolare (1 µM) non sia molto diversa dall'efficacia ad una concentrazione cento volte inferiore (0.01 µM). Al contrario, nel caso di VX-809, l'efficacia alla concentrazione più bassa non differisce molto dal controllo, ossia dalla risposta che si osserva quando le cellule sono trattate solo con il mezzo nel quale sono sciolti i composti. Da questi dati appare dunque che i migliori correttori Task Force sono più potenti di VX-809 perchè agiscono anche a bassi dosaggi.

Caratteristica dei nuovi correttori: una maggiore potenza rispetto a vx-809 (lumacaftor)

Dal punto di vista delle proprietà di *drug-likeness*, i correttori precedentemente indicati hanno mostrato, rispetto al Lead ARN21586, un incremento di 20 volte nella solubilità, di 5 volte nella stabilità al metabolismo epatico, e si sono dimostrati non tossici, anche ad alte concentrazioni, nel saggio che valuta la potenziale tossicità epatica.

I correttori appartenenti alla classe chimica del hit ARN5562 sono stati oggetto di due domande di brevetto che sono state recentemente depositate. In tali domande di brevetto sono rivendicate le strutture di tutti i composti sintetizzati ed il loro utilizzo per il trattamento della fibrosi cistica.

Prove di efficacia dei nuovi potenziatori

In parallelo all'attività sui correttori è continuato lo studio della classe dei potenziatori, anche se con minori risorse chimiche dedicate. Sono stati sintetizzati nuovi composti per cercare di ottenere potenziatori più potenti rispetto a ARN19885 e ARN20011 e con attività paragonabile o superiore a quella di VX-770 (ivacaftor). Finora sono stati ottenuti composti con efficacia paragonabile a quella di ARN19885 ma con potenza più elevata, ovvero più alta efficacia alle concentrazioni più basse. Ulteriori attività sono in corso su questi potenziatori.

Anche i nuovi potenziatori appaiono dotati di maggiore potenza rispetto a VX-770 (ivacaftor)

Correttori candidabili per lo sviluppo preclinico

Complessivamente, dall'inizio del progetto TFCF sono stati sintetizzati e testati oltre 600 nuovi composti. L'obiettivo da raggiungere entro la fine della terza fase, prevista per fine agosto 2017, consiste nel selezionare un composto come candidato allo sviluppo preclinico e, possibilmente, uno o due composti come sostituti nel caso in cui il candidato dovesse cadere durante lo sviluppo preclinico a causa di problematiche non emerse nella fase di ricerca. Alla luce dei risultati finora ottenuti, la selezione potrebbe cadere su un correttore, avendo ottenuto composti con efficacia paragonabile a VX-809 ma con assai maggiore potenza.

Dovrà essere selezionato il composto candidato allo sviluppo preclinico, un correttore di F508del-CFTR e alcuni composti di riserva

Prospettive di seguito del progetto TFCF

Studio di Sviluppo Preclinico

La selezione di un candidato allo sviluppo preclinico segna l'inizio di una nuova fase del processo di ricerca di nuovi farmaci, chiamata **Sviluppo Preclinico**, non inclusa nel progetto TFCF. In tale fase, il candidato viene testato in una serie molto ampia di saggi, sia in vitro sia nell'animale, per verificare prima di tutto che sia privo di tossicità che lo rendano non idoneo all'uso nell'uomo

e, secondariamente, che possa essere opportunamente formulato per la somministrazione nell'uomo. Dapprima viene valutata l'eventuale genotossicità, ovvero la capacità di produrre alterazioni a livello del patrimonio genetico di cellule batteriche, animali ed umane. I risultati degli studi di genotossicità sono fondamentali per la prosecuzione delle attività di sviluppo preclinico: il candidato può proseguire solamente se i risultati sono negativi. Gli studi di genotossicità, insieme ad altri saggi che vengono condotti per verificare la possibilità di effetti farmacologici diversi dall'attivazione della proteina CFTR mutata, richiedono in genere circa 3÷4 mesi. Pertanto, se il progetto TFCF riuscirà a selezionare un candidato e si deciderà di iniziare lo sviluppo preclinico, i dati sui quali basare la decisione di proseguire lo sviluppo preclinico saranno disponibili indicativamente a gennaio-febbraio 2018.

La fase di sviluppo preclinico prevede per il candidato scelto nuovi saggi in vitro e su modelli animali, inoltre verifiche per tossicità e formulazione farmacoterapica

In caso di risultati favorevoli alla prosecuzione dello sviluppo preclinico del candidato, si dovranno avviare una serie di attività (ad esempio, la sintesi del candidato su larga scala e la ricerca di una appropriata formulazione) e di studi che culmineranno con la valutazione della tossicità del candidato in roditori a seguito di somministrazioni ripetute nel tempo. Le tempistiche necessarie per portare a termine tali studi sono nell'ordine di 12-18 mesi, con un costo previsto che supererà abbondantemente il milione di Euro.

Sviluppi dopo lo studio preclinico

A conclusione dello sviluppo preclinico, disponendo di una opportuna formulazione per la somministrazione del candidato e in assenza di tossicità che ne precludano l'ulteriore sviluppo, potrà iniziare lo studio clinico nell'uomo. A questo scopo, tutti i dati generati durante lo sviluppo preclinico dovranno essere raccolti in un dossier contenente le informazioni necessarie per legge per richiedere l'autorizzazione ad iniziare tale studio. Se si arrivasse a questo punto, si aprirebbe la fase più delicata, più lunga e costosa del processo di ricerca di un nuovo farmaco: la sperimentazione nell'uomo. Sarebbe un traguardo molto importante, poiché si potrebbe valutare l'efficacia di un potenziale farmaco frutto dell'impegno di tanti ricercatori sostenuti dalle Delegazioni FFC, dai donatori, e dai tanti volontari che hanno contribuito alla raccolta dei fondi necessari per la ricerca.

Bibliografia

- *Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL, Principles of early drug discovery. British Journal of Pharmacology 2011, 162, 1239-1249*
- *Petrone PM, Wassermann AM, Lounkine E, Kutchukian P, Simms B, Jenkins J, Selzer P, Glick M. Biodiversity of small molecules – a new perspective in screening set selection. Drug Discovery Today 2103, 18, 674-680.*
- *Leeson PD and Springthorpe B, The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. Nature Reviews Drug Discovery 2007, 6, 881-890.*
- *Hadida S, Van Goor F, Zhou J, Arumugam V, McCartney J, Hazlewood A, Decker C, Negulescu P, Grootenhuis PD. Discovery of N-(2,4-di-tert-butyl-5-hydroxyphenyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (VX-770, ivacaftor), a potent and orally bioavailable CFTR potentiator. Journal of Medicinal Chemistry 2014, 57, 9776-9795.*
- *Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proceedings of the National Academy of Science USA 2011, 108, 18843-18848.*

Dati essenziali sull'attività scientifica FFC 2002 - 2017

Forniamo di seguito alcune informazioni, tradotte in grafici essenziali, su alcuni aspetti concernenti l'attività di ricerca della Fondazione dal 2002 al 2017 (dal 1997 al 2001 la Fondazione ha raccolto i primi fondi per affrontare i programmi di ricerca). I dati sono aggiornati ad Aprile 2017.

Fig. 1 e 2.

I Progetti FFC sono rivolti a 5 aree (o linee) di ricerca:

1) La correzione del difetto di base della malattia
2) Sviluppo di nuove conoscenze e interventi su aspetti genetici della malattia
3) Nuove strategie per l'infezione broncopolmonare
4) Nuove strategie per l'infiammazione broncopolmonare
5) Studi clinici ed epidemiologici

Le Facilities sono servizi di supporto alla ricerca che la Fondazione ha avviato e sostiene mettendoli a disposizione di tutti i ricercatori FFC.
Le Facilities attualmente operative sono:

1) Servizio per i "Modelli animali" CFaCore
2) Servizio "Colture Primarie" (Cellule Epiteliali derivate da polmoni FC espiantati)
3) Cystic Fibrosis DataBase (CFDB), DataBase on line su tutti gli studi clinici FC

L'investimento arrotondato di 24 milioni include anche quasi 1 milione dedicato all'attività di formazione connessa all'attività di ricerca (corsi di formazione, supporto a convegni, seminari, convention, pubblicazioni educative, servizi scientifici sui media, recensioni e commenti scientifici su Newsletter e sito FFC.)

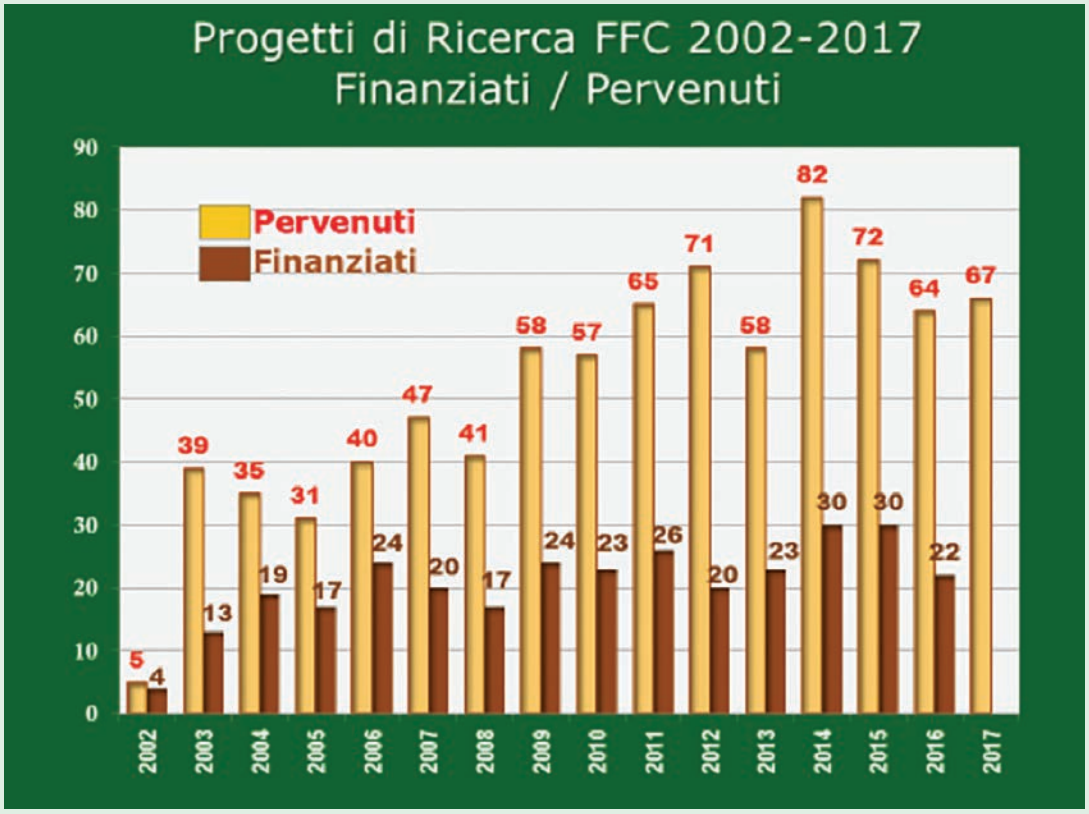


Fig. 3.
I progetti di ricerca vengono selezionati anno per anno a seguito di:
1) Bando Pubblico
2) Prima valutazione del Comitato Scientifico FFC
3) Valutazione secondo il metodo *"Peer Review"* (2-3 esperti internazionali per progetto)
4) Selezione e approvazione finale del Comitato Scientifico.

Il numero di progetti pervenuti attraverso bando annuale è progressivamente aumentato. Però la selezione si è fatta sempre più stretta per finanziare progetti di qualità sempre maggiore: nel periodo 2002-2007 è stato approvato il 48% dei progetti pervenuti, nel periodo 2008-2011 il 40%, nel periodo 2012-2016 il 36%. Nella colonna del 2017 manca il numero dei progetti selezionati perché ad Aprile 2017 erano ancora in fase di valutazione da parte dei revisori internazionali

Il Comitato Scientifico (CS) della Fondazione si riunisce dopo che i revisori internazionali hanno valutato i progetti di ricerca (i revisori sono scelti fra i massimi esperti sull'argomento affrontato dal progetto). Il CS compone il parere dei revisori con la valutazione interna, recepisce il parere del Consiglio di Amministrazione sull'investimento complessivo possibile per la ricerca in quell'anno, e decide quali progetti sono da finanziare e l'entità del finanziamento per progetto.

Fig. 4.
Distribuzione percentuale dei finanziamenti rispetto alle Aree di ricerca e Facilities.
Il dato è riferito fino al 2016, essendo i progetti 2017 ancora in fase di valutazione

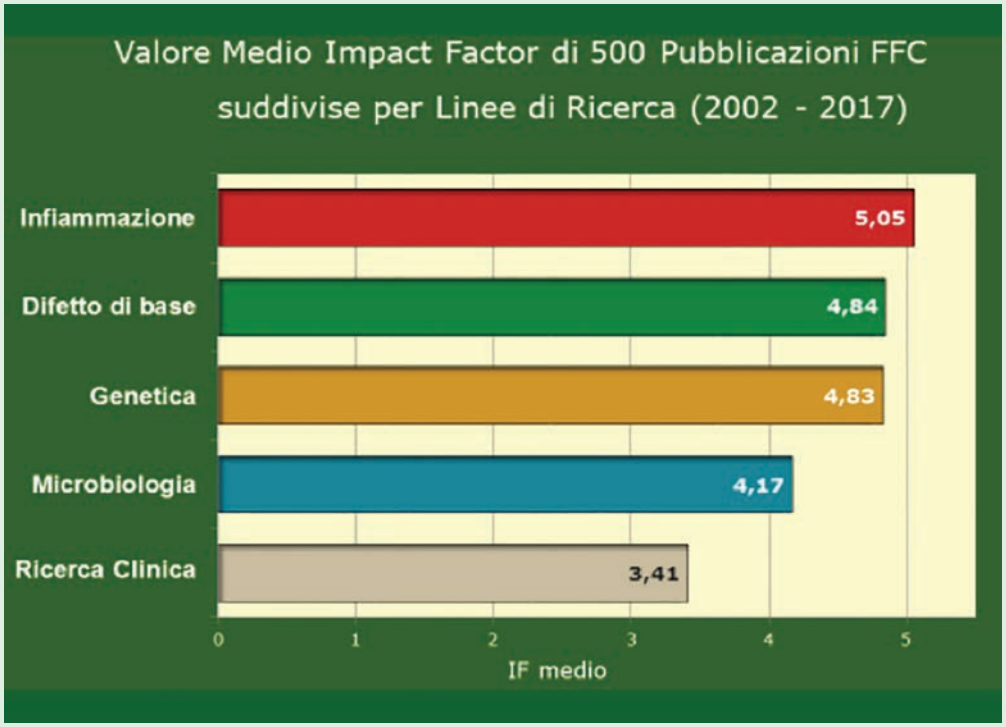


Fig. 5.
Le barre rappresentano il valore medio di Impact Factor (IF) delle pubblicazioni generate da progetti FFC, suddivise per aree di ricerca, nel periodo 2002-2017 fino ad aprile 2017. L'IF è una misura dell'importanza della rivista scientifica internazionale che valuta l'articolo in cui sono esposti i risultati del progetto e lo ritiene meritevole di pubblicazione. Più elevato è l'IF della rivista, maggiore la sua importanza nel mondo scientifico, più rigorosamente vagliati e selezionati gli articoli pubblicati. Le pubblicazioni originate da progetti di ricerca nel campo dell'Infiammazione, della Genetica e della Terapia del Difetto di base sono quelle che ad Aprile 2017 hanno valore di impatto più elevato. Un IF intorno a 5 è generalmente considerato un indicatore di buona qualità.

Presidente
VITTORIANO FAGANELLI

Direttore Scientifico
GIANNI MASTELLA

Presidente Comitato Scientifico
GIORGIO BERTON

Consiglio di Amministrazione
Presidente Vittoriano Faganelli
Vicepresidente Matteo Marzotto
Consiglieri Michele Bauli, Sandro Caffi, Francesco Cobello, Paolo Del Debbio, Francesco Ernani, Giuseppe Ferrari, Gianni Mastella, Michele Romano, Donatella Treu, Luciano Vettore, Patrizia Volpato

Direzione scientifica
Direttore Gianni Mastella
Vicedirettore Graziella Borgo

Comitato di consulenza scientifica
Presidente Giorgio Berton
Consulenti Paola Bruni, Roberto Buzzetti, Gian Maria Rossolini, Paolo Bernardi

Presidenza e Segreteria
(V. Faganelli, G. Cadoni, F. Lavarini)
Tel. 045 8123438-7037 – Fax 045 8123568
Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani 1
37126 Verona
fondazione.ricercafc@aovr.veneto.it
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

Direzione Scientifica (G. Mastella)
Tel. 045 8123567
gianni.mastella@aovr.veneto.it

Vicedirezione Scientifica (G. Borgo)
Tel. 045 8127027
borgograziella@gmail.com

Direzione di Gestione (G. Zanferrari)
Tel. 045 8127028
giuseppe.zanferrari@gmail.com

Amministrazione (G. Cadoni, M. Bergamaschi, M. Giacopuzzi, E. Fabietti)
Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025 - 7029
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
fondazione.ricercafc@aovr.veneto.it

Comunicazione
(M. Zanolli, R. Perbellini, S. Chignola, F. Malvezzi)
Tel. 045 8123599 - 7026
comunicazione.ffc@aovr.veneto.it

Ufficio stampa (P. Adami)
Tel. 045 581893
patrizia@clabcomunicazione.it

Raccolta Fondi e Rapporti con il Territorio
(F. Cabianca, L. Fratta, G. Buemi, F. Morbioli)
Tel. 045 8123605 - 7032 - 7033 - 3604
fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it
laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it
giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it
francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it

fibrosicisticaricerca.it

Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica

Certificazione IID 2008/10
Aderiamo agli standard della Carta della Donazione

Delegazioni della Fondazione

Alessandria - Valle Scrivia	347 3095778
Ancona - Fabriano	347 8638704
Avellino	349 3940749
Bari - Molfetta	349 6384907
Belluno	0437 943360
Bergamo - Trescore Balneario	338 4276716
Bergamo - Villa D'almè	335 8369504
Biella	331 9028525
Bologna	348 1565099
Brescia	030 5233919
Cagliari	329 6241193
Catania Mascalucia	333 1909983
Catania - Paternò	340 7808686
Catanzaro - Soverato	347 5283975
Cecina e Rosignano	340 6113886
Cosenza Nord	349 0519433
Cosenza 2 Sud	347 9041138
Cuneo - Alba	333 6301943
Fermo	339 4758897
Ferrara	347 4468030
Foggia	320 4848190
Genova	348 1634818
Grosseto – Manciano	333 8221877
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	388 3498587
Livorno	0586 808093
Lodi	347 0969534
Lucca	340 3436289
Mantova	335 7077280
Matera Montescaglioso	329 6016214
Messina	349 7109375
Milano	335 456809
Napoli	338 8099917
Napoli - Pompei	081 679151
Novara	331 7287449
Olbia Tempio	334 6655844
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	338 4124077
Parma	0521 386303
Pavia	338 3950152
Pesaro	347 0191092
Pescara	347 0502460
Ragusa - Vittoria Siracusa	338 6325645
Reggio Calabria	0965 787225
Reggio Emilia	0522 874720
Roma	339 7744458
Roma - Monterotondo	349 6500536
Roma - Pomezia	349 1538838
Rovigo	349 1252300
Salerno	320 4229443
Siena	349 3599497
Sondrio - Valchiavenna	338 3133275
Taranto "A Carmen La Gioia"	320 8715264
Teramo	349 6067242
Torino	328 8352087
Torino - Rivarolo Canavese	347 9672344
Trapani - Marsala	333 7240122
Treviso - Montebelluna	335 8413296
Treviso - Trevignano	340 6749202
Trieste	348 4959691
Varese	347 8347126
Varese - Tradate Gallarate	347 2441141
Verbania e V.C.O.	338 2328074
Verona	347 8480516
Verona - Bovolone	348 3395278
Verona - Bussolengo Pescantina	328 2316828
Verona - Cerea "Il Sorriso di Jenny"	339 4312185
Verona - Lago di Garda	348 7632784
Verona - Boschi Sant'Anna Minerbe	328 7140333
Verona - Valdadige	340 6750646
Verona - Valpolicella	339 3316451
Vibo Valentia San Costantino Calabro	388 7767773
Vicenza	333 8877053
Viterbo	339 2107950

Gruppi di sostegno della Fondazione

Agrigento	347 5490769
Alessandria - Acqui Terme	366 1952515
Ancona Falconara	347 3329883
Arezzo	331 3700605
Ascoli Piceno	320 4792114
Bari - Alberobello	348 2632041
Bari - Altamura	349 0846868
Bari - Bitritto	340 1618950
Barletta	0883 519569
Benevento	347 4722532
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bologna - Monte S. Pietro	051 6760729
Bolzano - Val Badia	0474 520127
Brindisi - Latiano	347 6350915
Brindisi - Torre	327 2056244
Cagliari - Isili	345 1442597
Cagliari - Villasimius	348 7162291
Campobasso	346 8744118
Como - Dongo	333 7737473
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Firenze - Reggello	328 7043136
Foggia - Manfredonia	347 5012570
Foggia - San Severo	334 9370137
Frosinone	320 7277330
Genova - Cavi di Lavagna	349 3152910
Genova " Mamme per la ricerca"	010 3538371
Gorizia - Grado	328 6523404
Imperia - Ospedaletti	335 5881657
Imperia	333 2163849
La Spezia - Sarzana "Natalina"	349 7665757
Matera - Marconia "Roberto"	338 9573904
Medio Campidano	349 7829841
Messina - Tremestieri	328 5541071
Milano - Brugherio	039 2873024
Milano - Bussero	340 5327647
Milano - Lainate	348 3807009
Milano - Magenta	339 4887552
Milano - Seregno	338 4848262
Modena - Sassuolo	333 5862932
Napoli - Cicciano	335 6551613
Napoli - San Giuseppe Vesuviano	338 7032132
Oristano - Riola Sardo	342 5133252
Padova - Urbana	347 0814872
Perugia - Città di Castello Umbertide	320 9273469
Parma - Fidenza	334 6994359
Pisa	347 4235635
Ravenna - Faenza	0546 44310
Roma - Vaticano	328 2442701
Rovigo - Adria	347 8497842
Sassari - Alghero	329 2096790
Sassari - Castelsardo	338 8437919
Savona - Spotorno	338 8775863
Siracusa - Melilli	333 2005089
Taranto - Massafra	329 2025039
Torino - Chivasso	011 9172055
Torino - Ivrea	335 7716637
Torino - Rivarolo Canavese	347 9672344
Trento - Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica	340 5228888
Varese - Samarate "Terremoto Team"	345 2287044
Venezia	349 8707627
Verona "Rita"	347 6064471
Verona - Val d'Alpone	328 9688473

PER DONARE

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

Per maggiori informazioni: www.fibrosicisticaricerca.it

Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

www.fibrosicisticaricerca.it