fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus
Italian Cystic Fibrosis Research Foundation

SOCIETA' ITALIANA FIBROSI CISTICA

AZIENDA OSPEDALIERA
ISTITUTI OSPITALIERI DI VERONA

VI SEMINARIO DI PRIMAVERA FC

VI Italian CF Spring Seminar

Progressi recenti e sviluppi futuri nella ricerca in fibrosi cistica

Recent advances and future developments in CF research

Dalla ricerca di base al malato per nuove terapie della fibrosi cistica

From bench to bedside for new therapy of cystic fibrosis

Pre-meeting:
Workshop sui modelli animali per la ricerca cf

Animal models in CF research

Verona, 23-24 maggio 2008

fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus
Italian Cystic Fibrosis Research Foundation

SOCIETA' ITALIANA FIBROSI CISTICA

AZIENDA OSPEDALIERA
ISTITUTI OSPITALIERI DI VERONA

VI SEMINARIO DI PRIMAVERA FC

VI Italian CF Spring Seminar

Progressi recenti e sviluppi futuri nella ricerca in fibrosi cistica

Recent advances and future developments in CF research

Dalla ricerca di base al malato

From bench to bedside

Percorso di un farmaco

The drug pathway

I più promettenti studi clinici

The most promising clinical trials

Pre-meeting:

WORKSHOP SUI MODELLI ANIMALI PER LA RICERCA CF

Animal models in CF research

Verona, 23-24 maggio 2008

Indice
Index

Seminario

Presentazione
(G. Mastella) p. 2
- *Programma Seminario* p. 3
- *Programma workshop "Animal models in CF research"* p. 4

Fibrosi cistica: dal laboratorio al malato
Cystic fibrosis: from bench to bedside
(M. Amaral) p. 5

Il percorso di un farmaco, dalla molecola al malato: ma il malato può attendere?
The drug pathway, from molecule to patient: but can the patient wait?
(G. Recchia) p. 9

Aggiornamento sui più promettenti studi clinici in corso per la fibrosi cistica
An update on the most promising clinical trials in cystic fibrosis
(J. Wagener) p. 13

Moderatori del Seminario p. 18

Workshop (pre-meeting)

Introduzione. Utilità e questioni aperte nell'uso di topi con fibrosi cistica
Cystic fibrosis mice: usefulness and unresolved questions
(M. Conese) p. 19

Modelli animali di fibrosi cistica - Infiammazione e rimodellamento tissutale nel topo mutante CF
Animal models of CF - Inflammation and tissue remodelling in CF mutant mice.
(B. Scholte) p. 21

Infiammazione e risposta all'amiloride nel topo transgenico che esprime in eccesso il gene beta-ENaC
Inflammation and amiloride response in betaENaC overexpressing mice
(Z. Zhou) p. 23

Conclusioni. Prospettive applicative dei modelli animali nella ricerca CF
Practical perspectives on animal models in CF research
(G. Cabrini) p. 25

Appendice - Inchiesta sull'uso di modelli animali p. 27

PRESENTAZIONE

Il Seminario di Primavera di quest'anno è completamente dedicato ad un aggiornamento sui Progressi di ricerca più recenti, orientati a mettere a punto nuove strategie terapeutiche per la fibrosi cistica, con particolare attenzione a quelle rivolte a correggere il difetto di base della malattia. Sotto questo profilo dobbiamo constatare che, nonostante il grosso investimento di ricerca fatto negli ultimi 18 anni, dopo la scoperta del gene che causa la malattia, si sta ancora segnando il passo nei confronti di strategie di cura puntate alla radice della malattia stessa. Nel frattempo, l'organizzazione assistenziale, con l'ottimizzazione dell'impiego di terapie palliative, ha compiuto nell'ultimo ventennio passi in avanti assai significativi, se è vero che l'aspettativa di vita è andata drammaticamente aumentando, accompagnata ad un sensibile e misurabile miglioramento della qualità di vita delle persone malate.

Tuttavia, assistiamo proprio in questi ultimissimi anni ad un esplodere di nuove proposte e nuove prospettive di cura, derivate da una migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici e dall'individuazione di nuovi potenziali farmaci che la ricerca di base e preclinica hanno sviluppato. Alcuni di questi farmaci sono già pervenuti allo studio in vivo sul malato e già si misurano per alcuni di essi risultati promettenti.

Si è pensato di offrire a coloro che sono attenti a ciò che si muove in questo ambito, un panorama degli aspetti più significativi che stanno emergendo e che rappresentano presumibilmente una solida premessa ad innovazioni terapeutiche nei prossimi anni. Si è voluto soprattutto render conto dell'enorme lavoro di ricerca che sta sotto ai piccoli passi, evidenziando come il laboratorio e la ricerca di base abbiano fatto acquisire le conoscenze indispensabili per arrivare a proposte efficaci per il malato. Il quale malato non perde occasione di esprimere al mondo della scienza la sua impazienza, talora la sua sfiducia e comunque la sua difficoltà di attendere. Tant'è vero che non infrequentemente ricorre a cure alternative, a dispetto della loro non ancora dimostrata efficacia e sicurezza. Vi è in questo nostro incontro, che è comprensivo delle ansie di molti, l'intento di far conoscere il rigore e lo scrupolo metodologico che guida il percorso di un farmaco, dalla molecola testata in laboratorio, alla sperimentazione in vivo su animali, ai passaggi graduali della sperimentazione sull'uomo, con particolare attenzione ai suoi effetti utili ma anche ai possibili effetti avversi. Per questo abbiamo chiesto il contributo di tre eccellenti esperti, che rappresentano l'arco delle competenze che si integrano nel percorso di ricerca: uno scienziato di base (M. Amaral), un manager medico dell'industria farmaceutica (G. Recchia) ed un clinico (J. Wagener).

Questo seminario vuole essere anche un nuovo tentativo di mettere insieme, come uditorio, operatori di ricerca, operatori di assistenza e persone che vivono direttamente la malattia. Sappiamo essere questo un approccio comunicativo difficile, ma esso è guidato dalla convinzione che sia possibile scoprire una modalità comune e un linguaggio comune per diffondere conoscenze. L'ampio spazio che viene dedicato al dibattito dovrebbe consentire al ricercatore di cogliere preziosamente l'ansia che si esprime nelle domande di chi aspetta dalla ricerca e al multiforme pubblico di trovare presso l'esperto mediazione rispetto ai complessi circuiti del processo scientifico, liberati almeno in parte dal gergo per addetti ai lavori.

Il seminario viene preceduto da uno speciale incontro di lavoro per coloro che si occupano in Italia di ricerca CF. L'incontro è dedicato a fare il punto sui cosiddetti "modelli animali", che vengono impiegati in alcuni passaggi di ricerca per migliorare le conoscenze sulla patogenesi della fibrosi cistica e per valutare terapie sperimentali prima di passare agli studi sugli umani.
Questi modelli animali sono in realtà basati su modificazioni genetiche che riproducono nell'animale una condizione simile a quella della malattia in questione. Si sono realizzati sicuramente notevoli progressi in questo campo ma c'è ancora parecchia strada da fare nello sviluppo di modelli più vicini all'uomo anche nelle sue espressioni di malattia. L'incontro è anche finalizzato ad analizzare l'opportunità di organizzare in Italia delle facilitazioni per poter mettere a disposizione dei ricercatori modelli animali e competenze per operare con essi. La Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica è intenzionata a promuovere e supportare una tale iniziativa, con la convinzione che essa possa contribuire ad accelerare ed ottimizzare i percorsi della ricerca che ci sta a cuore.

Gianni Mastella (Direttore Scientifico Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

VI Seminario di Primavera FC

PROGRESSI RECENTI E SVILUPPI FUTURI IN RICERCA CF

Verona, Sabato 24 Maggio 2008
Sala Convegni Unicredit Group, Via Garibaldi 2

Dalla ricerca di base agli studi clinici per nuove terapie della fibrosi cistica

From basic research to clinical trials for new therapies of cystic fibrosis

Programma

Ore 10,30 - 11,30	**Dalla ricerca di base alla ricerca clinica in fibrosi cistica** *Cystic Fibrosis: from bench to bedside* **Margarida Amaral** *(Dip.to di Chimica e Biochimica, Facoltà di Scienze, Università di Lisbona; Centro Genetica Umana, Ist. Nazionale della Salute, Lisbona, Portogallo)* Moderatore/Discussant: **Carla Colombo** *(Direttore Centro Fibrosi Cistica, Clinica De Marchi, Università di Milano)*
Ore 11,30 - 12,30	Discussione
Ore 12,30 - 13,30	Pausa buffet
Ore 13,30 - 14,10	**Il percorso di un farmaco, dalla molecola al malato: ma il malato può attendere?** *The drug pathway, from molecule to patient: but can the patient wait?* **Giuseppe Recchia** *(Direttore medico-scientifico Glaxo Smith Kline, Verona)* Moderatore/Discussant: **Francesca Pardo** *(Direttore Centro Fibrosi Cistica, Osp. G. Di Cristina, Palermo)*
Ore 14,10 - 14,40	Discussione
Ore 14,40 - 15,00	Pausa caffè
Ore 15,00 - 16,00	**Aggiornamento sui più promettenti studi clinici in corso per la fibrosi cistica** *An update on the most promising clinical trials in cystic fibrosis* **Jeffrey Scott Wagener** *(Centro Fibrosi Cistica, Dip.to di Pediatria, Università del Colorado, Denver, USA)* Moderatore/Discussant: **Cesare Braggion** *(Direttore Centro Fibrosi Cistica, Osp. Meyer, Firenze)*
Ore 16,00 - 17,00	Discussione e conclusioni

Pre-meeting: Workshop

Verona, Venerdì 23 maggio 2007
Sede Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Ospedale Maggiore, P.le Stefani 1

Modelli animali nella ricerca CF
Animal models in CF research

Programma

Confronto tra diversi modelli animali FC: utilità nel "predire" la malattia umana e l'efficacia di nuovi interventi terapeutici
Comparison among CF mouse models: prediction of the human disease and their usefulness for novel therapeutic interventions

Ore 14.30 - 15.00	**Massimo Conese** (Foggia, Italy) Introduction. Cystic fibrosis mice: usefulness and unresolved questions
Ore 15.00 - 16.00	**Bob Scholte** (Rotterdam, The Netherlands) Animal models of CF - Inflammation and tissue remodelling in CF mutant mice
Ore 16.00 - 16.30	Discussion
Ore 16.30 -17.00	Coffee break
Ore 17.00 - 18.00	**Zhe Zhou** (Heidelberg, Germany) Inflammation and amiloride response in beta-ENaC overexpressing mice
Ore 18.00 - 18.30	Discussion
Ore 18.30 - 19.00	**Giulio Cabrini** (Verona, Italy) Conclusions and practical perspectives

Fibrosi cistica: dal laboratorio al malato
Cystic Fibrosis: from the Bench to the Bedside

Margarida D. Amaral, PhD

Department of Chemistry and Biochemistry
Faculty of Sciences, University of Lisboa
Lisboa, Portugal

Professore Ausiliario nella facoltà di Scienze dell'Università di Lisbona. Coordinatrice dell'Unità di Ricerca in Fibrosi Cistica presso il Centro di Genetica Umana dell'Istituto Nazionale per la Salute di Lisbona.
Il maggiore interesse di ricerca di Margarida Amaral consiste nello studio di regolazione dell'espressione genica associata con le malattie umane. In particolare, i meccanismi molecolari e cellulari della fibrosi cistica. La maggior parte delle ricerche è stata orientata a comprendere i meccanismi molecolari che trattengono la proteina CFTR con mutazione DF508 nel reticolo endoplasmico. Attraverso manipolazioni dei meccanismi di controllo di questo reticolo, particolarmente quelli legati ai chaperoni molecolari, il suo gruppo è riuscito a far sfuggire parte della proteina mutata dal reticolo endoplasmico, ristorando così il trasporto di cloro a livello della membrana cellulare.
Recenti studi hanno riguardato anche la caratterizzazione di altre mutazioni CFTR, lo sviluppo di nuove tecniche di diagnosi genetica, e nuovi approcci farmacologici e genomici per la terapia CF. Margarida Amaral è coinvolta altresì in una vasta iniziativa europea rivolta a caratterizzare i meccanismi di maturazione di alcune proteine, tra cui la CFTR, ed è vice-coordinatrice del progetto europeo denominato EuroCareCF

The major research interest of Margarida Amaral is to study the regulation of gene expression associated with human disease. In particular, molecular and cellular mechanisms of the autosomic genetic disease Cystic Fibrosis (CF). Most of the research has been to understand the molecular mechanisms that retain the CFTR (CF transmembrane Conductance Regulator) protein with the most frequent mutation in patients (F508del) at the endoplasmic reticulum (ER). Indeed, through manipulation of these ER quality control mechanisms, which involve multiple intervenients, namely molecular chaperones, her group could enable some mutant protein to escape its ER retention and thus restore (even if partially) Cl- transport at the cell membrane, with substantial benefit for CF patients.
Recent work has also focused on the characterization of other CFTR gene mutations, namely on the effect of CF-causing mutations at the level of: 1) mutations that affect the processing of mRNA, namely, those impairing the mechanisms of splicing and stop mutations inducing nonsense-mediated decay; and 2) additional CFTR traffic mutants, and characterization of genetic revertants which rescue the ER retention defect. A major emphasis has been on the assessment of basic cellular defects in fresh native tissues (collected from patients), namely, nasal epithelial cells and rectal biopsies.
Transcriptomics and proteomics projects have also been underway in the lab to better understand CF pathophysiology and also, in collaboration with nanoelectronics centres, towards the development of novel chips (based on magnetic sensors) for the quick and cheap diagnosis of CF. She is also involved in pharmacological projects (elucidation of the mechanism of action of compounds) and genomic (human artificial chromosomes) approaches to CF therapy.
More recently, she got European Union funding to coordinate a large European initiative (including 4 academic groups and 4 companies) on genome-wide functional genomics, to identify and characterize proteins involved in the traffic of three model proteins, namely: CFTR, the epithelial Na+ channel ENaC and the G-protein coupled receptor (GPCR) melanocortin 4 receptor (MC4R). Proteins resulting from these functional screens will exploited as molecular targets for novel therapeutic strategies.
She is also vice-coordinator of EuroCareCF (www.eurocarecf.eu), another EU initiative to coordinate research in CF across Europe, where she is in charge of basic research activities, as well as the creation and distribution of novel tools (reagents and cell lines).

Associate alla fibrosi cistica, sono state finora identificate oltre 1500 mutazioni CFTR [1]. Negli individui normali la proteina CFTR è un canale del cloro (Cl-) attivato da cAMP ed espresso a livello della membrana apicale della maggior parte delle cellule epiteliali comprese le cellule che tappezzano il lume e i dotti di parecchie ghiandole. In causa dell'assenza o della compromissione di CFTR funzionale, generalmente si osserva assai poco o nessun trasporto di Cl- CFTR-mediato.

Benché, in linea di principio, il ristoro del trasporto di Cl- CFTR-mediato dovrebbe migliorare clinicamente la malattia CF, le oltre 1500 alterazioni presumibilmente patologiche del gene CFTR rendono assai arduo un tale compito. Tuttavia, una singola mutazione associata con un fenotipo clinico severo, la deltaF508, è assai frequente, interessando essa circa il 70% dei cromosomi in tutto il mondo con una presenza nel 90% dei pazienti CF in almeno un allele. Di conseguenza, la maggior parte degli sforzi di ricerca sono pertanto orientati a comprendere i difetti molecolari e cellulari che sono associati con la mutazione deltaF508.

Il difetto principale causato da deltaF508 sulla proteina CFTR è a livello della sua localizzazione intracellulare [2]. In effetti, la proteina deltaF508-CFTR fallisce nel suo accedere alla membrana apicale, essendo per la massima parte trattenuta a livello del reticolo endoplasmico (ER), dal quale essa viene identificata per la degradazione. La ritenzione a livello di ER porta al fallimento dell'acquisizione della naturale (ripiegata) conformazione da parte della proteina mutante, venendo essa riconosciuta dal sistema di controllo di qualità di ER (ERQC) che la manda alla degradazione (vedere rassegna in [3]). Il poter superare questa ritenzione intracellulare di deltaF508-CFTR avrebbe tuttavia un grande valore terapeutico, dal momento che questa proteina mutante è ancora funzionale (benché solo all'incirca per il 20% della CFTR normale [4]) se essa viene manipolata in modo da farle raggiungere la membrana cellulare (ad esempio, incubando le cellule a bassa temperatura).

Per correggere questi due tipi di difetto (di maturazione e di funzione di canale), si sta così indagando su due recenti categorie di piccole molecole assai promettenti sul piano terapeutico e precisamente: 1) quelle che recuperano il difetto di maturazione e sono chiamate "correttori"; 2) quelle che superano e rinforzano l'attività del canale del cloro difettoso, chiamate "potenziatori" [5,6].
Chiaramente, questi composti possono anche servire per ottenere la correzione di altri tra gli oltre 1500 mutanti CFTR che causano malattia. Tuttavia, per recuperare una tale varietà di difetti di gene/proteina, i mutanti CFTR devono essere raggruppati in classi funzionali, che teoricamente possono essere corrette attraverso la stessa strategia di recupero applicata alla deltaF508-CFTR o con una strategia diversa, per mezzo di un approccio coniato come "terapia mutazione-specifica" [5,6].

Questa strategia si basa così sulla classificazione funzionale delle mutazioni CFTR in cinque principali categorie [7,8] e precisamente: 1) mutazioni di classe I, che impediscono la produzione di proteina, essendo queste spesso mutazioni non senso o mutazioni stop (es., R1162X), che generano cioè dei codoni di stop prematuro che spesso portano alla degradazione dei rispettivi RNA messaggeri (mRNAs); 2) mutazioni di classe II (inclusa deltaF508) che causano ritenzione intracellulare della proteina mutante e conseguente degradazione, da cui consegue l'impedimento di queste proteine mutanti a raggiungere la superficie cellulare; mutazioni di classe III (es. G551D) che permettono alla proteina di raggiungere la superficie cellulare ma causano compromissione dell'apertura del canale CFTR (gating); 4) mutazioni di classe IV che causano una sostanziale riduzione nel flusso di ioni Cl- che diffondono attraverso il canale CFTR (es. R334W); 5) mutanti di classe V (incluse le mutazioni di splicing alternativo, come la 3272-26A>G) che ancora permettono la sintesi di una certa quota di mRNA CFTR e di proteina normali ma a livelli fortemente ridotti in causa della maggior produzione di mRNA CFTR montato in maniera aberrante. I mutanti di classe IV e classe V, che pur consentono un trasporto residuo di Cl- tramite CFTR, sono generalmente associati con fenotipi clinici più miti.

Parecchie strategie terapeutiche che adottano questo approccio "mutazione-specifico" per correggere il difetto di base CF sono attualmente in corso di valutazione sperimentale o sono già progredite fino all'ambito clinico. Alcuni esempi includono:
Classe I: Alcuni antibiotici aminoglicosidi sono stati descritti come capaci di sopprimere i codoni di interruzione prematura attraverso l'incorporazione di un aminoacido, consentendo così la continuazione della sintesi di proteina fino al suo termine normale. Un esempio è dato dal trial clinico condotto in pazienti con mutazioni stop (precisamente, W1282X) attraverso la correzione indotta da gentamicina [9], benché un più recente trial clinico non sia stato in grado di dimostrare l'efficacia di un tale approccio [10], suggerendo che questa correzione può essere mutazione-specifica.

Classe II: Chaperoni chimici, molecolari o farmacologici, generalmente chiamati "correttori", sono stati descritti come capaci di stabilizzare la struttura della proteina e di promuoverne la maturazione, consentendo l'espressione dei mutanti maturati a livello della superficie cellulare. Ci si aspetta che queste piccole molecole imitino l'azione delle proteine cellulari, chiamate "chaperoni molecolari", che entro la cellula vivente aiutino altre proteine (chiamate "clienti") ad acquisire la loro conformazione naturale (vedere rassegna in [11]). Già agli inizi di quest'anno un composto correttore, il VX-809 (Vertex Pharmaceuticals Inc, San Diego, CA) è giunto ad un trial clinico di fase I su pazienti CF omozigoti per deltaF508 [12]. Ci si attende che ulteriori composti di questo tipo, provenienti da altre compagnie farmaceutiche, raggiungano molto presto l'ambito clinico.

Classe III: Si era visto in passato che alcuni attivatori della CFTR, come le alchilxantine (CPX) e il flavonoide genisteina, erano in grado di superare il difetto nell'apertura del canale CFTR, agendo pertanto come "potenziatori". La CFTR-deltaF508 è anche un mutante di classe III, dal momento che, quando il canale ad esso corrispondente è localizzato sulla membrana, si presenta anche compromesso nella sua apertura e pertanto con ridotta attività di canale (vedi sopra). Recentemente, la US Cystic Fibrosis Foundation ha annunciato che il VX-770 (pure della Vertex Pharmaceuticals Inc, San Diego, CA), un farmaco potenziatore che stimola l'apertura dei mutanti CFTR con difetto di gating, ha mostrato risultati promettenti in un trial clinico di fase IIa che sta proseguendo e ha coinvolto pazienti CF portatori della mutazione G551D che assumevano questo farmaco per bocca [13].

Classe IV: La compensazione del difetto di conduzione di Cl- da parte di questi mutanti può essere raggiunta aumentando la loro espressione complessiva a livello di membrana cellulare attraverso la promozione della loro maturazione con composti correttori o/e attraverso un'aumentata stimolazione di canali già esistenti per mezzo di potenziatori (quali il VX-770).

Classe V: Si era visto che alcuni fattori di splicing che promuovo la normale inclusione di esoni nel mRNA o fat-

tori che promuovono una abnorme omissione di esoni aumentavano in vitro i livelli di trascritti (mRNA) correttamente montati. Benché questo tipo di correzione abbia ancora una lunga strada da compiere per arrivare alla clinica, i potenziatori sono pure utili per questi mutanti, poiché essi accrescono l'attività dei normali canali già presenti sulla superficie cellulare.

Un altro approccio che è completamente diverso dai precedenti, perché indipendente dal difetto primario del gene CFTR, è il cosiddetto "approccio di bypass". Esso consiste nella correzione dei difetti di trasporto ionico che accompagnano il difetto di base CF. In realtà. accanto alla compromissione della secrezione di Cl- cAMP-dipendente , si sa anche da lungo tempo che le vie aeree presentano un aumentato assorbimento di sodio (Na+), che a sua volta porterebbe ad un aumentato assorbimento di liquido e di elettroliti attraverso la superficie dell'epitelio, con contrazione isotonica dello strato liquido di superficie (ASL) [14]. Inoltre, la CFTR è stata implicata nella regolazione di questo assorbimento e in molti altri trasportatori ionici, venendo così a costituire realmente un regolatore della conduttanza ionica [15]. L'"approccio di bypass" propone di correggere questi altri difetti di trasporto indipendentemente da CFTR, per esempio inibendo il canale del sodio (ENaC) [6]. In alternativa, esso preconizza che, attraverso l'attivazione di altri canali del cloro non-CFTR, la mancanza di CFTR funzionante possa essere elusa, almeno nelle vie aeree [6]. La strategia attuale più promettente consiste nello stimolare alcuni recettori purinergici ATP-attivati per mezzo di nucleotidi sintetici, che sono più stabili dell'ATP, quali l'INS365, o mediante composti tipo denufosol. Quest'ultimo sta già andando ad un trial clinico di fase III [16] ed ha il vantaggio di attivare i canali della conduttanza del cloro calcio (Ca2+)-attivata (CaCC) ma anche di inibire i canali epiteliali del sodio, attenuando pertanto l'eccessivo assorbimento di Na+ e la disidratazione dell'ASL [6].

Riassumendo, parecchi nuovi composti si presentano come molecole guida per sviluppare farmaci efficaci nei confronti del difetto di base CF e le prime razionali terapie per la fibrosi cistica, che si basano sulle conoscenze del difetto di base, hanno incominciato ad entrare nell'ambito clinico. Sulla base dell'attuale "drug pipeline", ci si aspetta che queste aumentino in numero molto presto.

La validazione pre-clinica di questo afflusso di nuovi composti, in termini di loro efficacia, richiede peraltro ulteriori e sostanziali sforzi, cosicché solo i migliori siano realmente offerti ai malati, che stanno ora incominciando a presentare una elevata domanda per la partecipazione a studi clinici in prospettiva competitivi. Di conseguenza, la validazione dei composti direttamente su tessuti umani ex vivo, usando per esempio biopsie rettali, diventa un'opzione attraente per aiutare a risolvere tali problemi, dal momento che questi tessuti sono già raccolti per la diagnosi e per la prognosi della fibrosi cistica in parecchi centri europei [17]. Inoltre, lo stabilire adeguate misure di risultato (endpoints) appare indispensabile per determinare l'efficacia di un farmaco e la sua validazione clinica, per la quale gli attuali metodi di diagnosi (la misura del cloro nel sudore, la differenza di potenziale nasale o la secrezione di cloro nelle biopsie rettali) possono essere estremamente utili. Con una tale concertata azione può essere possibile ottenere il circa 10% della normale attività CFTR, che generalmente si crede essere sufficiente per risolvere la fibrosi cistica [3].

To date, over 1,500 CFTR mutations were identified in association with Cystic Fibrosis [1]. In normal individuals, CFTR protein is a cAMP-activated chloride (Cl-) channel expressed at the apical membrane of most surface epithelial cells but also in cells lining the lumen and duct of several glands. Due to the absence/ impairment of functional CFTR, in epithelia of CF patients very little or no CFTR-mediated Cl- transport is generally observed.
Although in principle, restoration of CFTR-mediated Cl- transport should clinically improve CF, the ~1,500 presumably pathological CFTR gene alterations make this a hard task. However, one single mutation associated with a severe clinical phenotype, F508del, is very frequent, accounting for ~70% of CF chromosomes worldwide and occurring in 90% of CF patients in at least one allele. Accordingly, most research efforts are thus aimed at understanding the molecular and cellular defects associated with the F508del mutation.

The major defect caused by F508del on CFTR protein is at the level of its intracellular localization [2]. Indeed, the F508del-CFTR protein fails to traffic to the plasma membrane, being mostly retained at the endoplasmic reticulum (ER) from where it is targeted for degradation. Retention at the ER results from failure in the acquisition of a native (folded) conformation by the mutant protein, being the abnormal misfolded form recognized by the ER quality control (ERQC) which sends it to degradation (reviewed in [3]). Overcoming this intracellular retention of F508del-CFTR, however, would have great therapeutic value, since this mutant is still functional (albeit at only ~20% of normal CFTR [4]) if it is manipulated to reach the cell membrane (e.g., by incubating the cells at low temperature).

To correct for these two types of defects associated with F508del-CFTR, two kinds of recent and promising therapeutic small molecules are thus being searched for, namely: 1) those rescuing the trafficking defect, which are termed 'correctors'; and 2) those overcoming/ enhancing the defective Cl- channel activity, which are called 'potentiators' [5,6].
Clearly these compounds may also serve to achieve correction of the other reported ~1,500 CFTR disease-causing mutants. Notwithstanding, to rescue such a variety of gene/protein defects, CFTR mutants have to be grouped into functional classes, which potentially can be corrected through the same restoring strategy applied to F508del-CFTR or by a different one, by an approach coined as 'mutation-specific therapy' [5,6].

This strategy thus relies on functional classification of CFTR mutations into five main categories [7,8], namely: i) class I mutations, which prevent protein production, often being nonsense mutations (e.g., R1162X), i.e, generating premature stop codons that often lead to the degradation of the respective mRNAs; ii) class II mutations (including F508del) causing intracellular retention of the mutant protein and subsequent degradation thus preventing these mutant proteins from reaching the cell surface; iii) class III mutants (e.g., G551D) that allow protein to traffic to the cell surface, but cause impairment in the CFTR channel opening (gating); iv) class IV mutants which cause substantial reduction in the flow of Cl- ions that permeate through the CFTR channel (e.g., R334W); and v) class V mutants (including alternative splicing mutants, e.g., 3272-26A>G) which still allow for the synthesis of some normal CFTR mRNA and protein, but at dramatically reduced levels due to the major production of aberrantly spliced CFTR mRNA. Class IV and class V mutants, which still allow residual CFTR-mediated Cl- transport, are generally associated with milder clinical phenotypes.

Several therapeutic strategies adopting this 'mutation-specific' approach to correct the basic defect in CF are currently under experimental testing or already progressed to the clinical setting [6]. Examples include:
***Class I:** aminoglycoside antibiotics have been described to suppress premature termination codons by allowing the incorporation of an amino acid, thus permitting protein synthesis to continue until its normal termination. An example is the clinical trial carried out in CF patients with stop mutations (namely, W1282X) through gentamicin-induced correction [9], although a more recent clinical*

trial has failed to demonstrate efficacy [10], suggesting that this correction may be mutation-specific.

Class II: *Chemical, molecular or pharmacological chaperones, generally called 'correctors' were described to stabilize protein structure and promote folding, allowing cell surface expression of trafficking mutants. These small molecules are expected to mimic the action of the cellular proteins, called 'molecular chaperones', which within the living cell help other (called 'client') proteins to acquire their native conformation (reviewed in [11]). Already early this year, one corrector compound VX-809 (Vertex Pharmaceuticals Inc, San Diego, CA) went to Phase I of clinical trial for F508del-homozygous patients [12]. More compounds of this type from a number of other companies are expected to hit the clinical setting very soon.*

Class III: *CFTR activators such as alkylxanthines (CPX) and the flavonoid genistein were shown to overcome defects in the gating of the CFTR channel, thus acting as 'potentiators'. F508del-CFTR is also a class III mutant, since membrane localized channels also exhibit impaired gating and thus reduced channel activity (see above). Recently, the US Cystic Fibrosis Foundation announced that VX-770 (also from Vertex Pharmaceuticals Inc, San Diego, CA), a potentiator drug that stimulates the opening of CFTR mutants with a gating defect, showed promising results in an ongoing Phase 2a clinical trial involving CF patients carrying the G551D mutation who took this drug orally [13].*

Class IV: *Compensation for reduced conductance of these mutants can be achieved by increasing the overall cell surface expression of these mutants by promoting their traffic with corrector compounds or/and through increased stimulation of the existing channels with potentiators (such as VX-770).*

Class V: *Splicing factors that promote normal exon inclusion or factors that promote abnormal exon skipping were shown to increase levels of correctly spliced transcripts in vitro. Although this kind of correction is still a long way from the clinic, potentiators are also useful for these mutants, since they enhance the activity of normal channels already at the cell surface.*

Another approach which is completely different from the above because it is independent of the primary CFTR gene defect is the so-called 'bypassing approach', which relies on the correction of the ion transport defects occurring in CF. Indeed, besides the impaired cAMP-dependent Cl- secretion, the CF airways are also known for long to exhibit enhanced sodium (Na+) absorption which in turn has been postulated to lead to hyperabsorption of fluid and electrolytes by the surface epithelium and isotonic contraction of the airway surface liquid (ASL) [14]. Moreover, CFTR has been implicated in the regulation of this Na+ hyperabsorption and in many more ion transporters, being thus truly a conductance regulator [15]. The 'bypassing approach' proposes to correct for these other ion transport defects independently of CFTR, for example, by inhibiting the Na+ epithelial channel (ENaC) [6]. Alternatively, it also preconizes that by activation of other non-CFTR Cl- channels, the lack of functional CFTR can be circumvented, at least in the airways [6]. The most promising current strategy is to stimulate ATP-activated purinergic receptors by synthetic nucleotides which are more stable than ATP, such as INS365 or by compounds like denufosol. The latter is already going to Phase III of clinical trial [16] and has the advantage of activating both calcium (Ca2+)-activated Cl- conductance (CaCC) channels but also of inhibiting epithelial Na+ channels, thus attenuating excessive Na+ absorption and ASL dehydration [6].

In summary, several novel compounds appear as promising leads to develop effective drugs against the basic defect in CF and the first rationale therapies for CF relying on the understanding of the basic defect have started to hit the clinical setting. Based on the current 'drug pipeline', these are expected to rise in numbers very soon.

Pre-clinical validation of this affluence of novel compound in terms of their efficacy thus requires additional substantial efforts, so that only the best are actually given to patients who are now starting to be in high demand for the several competing clinical trials in perspective. Accordingly, validation directly on human tissues ex vivo using for instance rectal biopsies becomes an attractive option to help solving such problems, since these tissues are already commonly collected for the diagnosis and prognosis of CF in several European centres [17]. Moreover, establishing adequate therapy endpoints is indispensable to assess drug efficacy and clinical validation, for which the current diagnosis methods (sweat Cl- measurements, nasal potential difference or Cl- secretion assessment in rectal biopsies) may be extremely helpful. With such a concerted action, it may be possible to achieve the ~10% normal CFTR activity, generally believed to be sufficient to cure CF [3].

References

1. *The CFTR Mutation Database: http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/*
2. *Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ (1992) Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. J Cell Biol 118: 551-559.*
3. *Amaral MD (2005) Processing of CFTR – Traversing the cellular maze. How much CFTR needs to go through to avoid Cystic Fibrosis? Pediatric Pulmonol 39, 479-491.*
4. *Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallant S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP Lazdunski M (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. Nature 354, 526-528.*
5. *Kerem E (2005) Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. Pediatr Pulmonol 40: 183-196.*
6. *Amaral MD, Kunzelmann K (2007) Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. Trends Pharmacol Sci 28: 334-341.*
7. *Welsh MJ, Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 73: 1251-1254.*
8. *Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu Rev Genet 29: 777-807.*
9. *Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. N Engl J Med 349: 1433-41.*
10. *Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, Aitken ML, Gibson R, Zeitlin P, Berclaz P, Moss R, Knowles MR, Oster RA, Mayer-Hamblett N, Ramsey B (2007) No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. Am J Respir Cell Mol Biol 37: 57-66.*
11. *Amaral MD (2006) Therapy through chaperones: sense or anti-sense? Cystic fibrosis as a model disease. J Inherit Metab Dis 29, 477-487.*
12. *See the 'Drug Development Pipeline' at the US Cystic Fibrosis Foundation website: http://www.cff.org*
13. *See press release on results from the VX-770 at the US Cystic Fibrosis Foundation website: http://www.cff.org*
14. *Donaldson SH, Boucher RC (2003) Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Curr Opin Pulm Med 9, 486-491.*
15. *Kunzelmann K (2001) CFTR: interacting with everything? News Physiol Sci 16: 167-170.*
16. *Kellerman D, Rossi Mospan A, Engels J, Schaberg A, Gorden J, Smiley L (2007) Denufosol: A review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3.Pulm Pharmacol Ther. [Epub ahead of print].*
17. *Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Matthias Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lopes A-I, Barreto C, Ramalho AS, Amaral MD, Kunzelmann K, Mall M (2004) CFTR Cl- channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. Gastroenterology 127, 1085-1095.*

Il percorso di un farmaco, dalla molecola al malato. Ma il malato può attendere ?

The drug pathway, from molecule to patient But can the patient wait?

Giuseppe Recchia, MD
Scientific & Medical Director
Glaxo Smith Kline, Verona, Italy

Giuseppe Recchia è medico specializzato in Chirurgia Generale presso l'Università di Verona nel 1985 ed in Farmacologia Applicata presso l'Università di Modena nel 1990.
Entrato nella Direzione Medica della società farmaceutica Glaxo di Verona nel 1984, dal 1993 fu Direttore Medico della società e nel 2001 è stato nominato Vice Presidente e Direttore Medico della nuova società GlaxoSmithKline spa, nata dalla fusione tra GlaxoWellcome e SmithKline Beecham. Dal 2007 ha l'incarico di Direttore Medico e Scientifico di detta società.
Tra il 1985 ed il 1992 ha partecipato con responsabilità diretta allo sviluppo clinico, dalla fase 1 alla fase 4, di Lacidipina, il primo farmaco scoperto nei laboratori italiani del Gruppo Glaxo.
Tra gli interessi più recenti vi è la applicazione della genetica allo sviluppo clinico dei farmaci, con particolare riferimento alla gestione delle implicazioni etiche, legali e sociali della farmacogenetica ed allo sviluppo della Medicina Personalizzata.
Nel 2004 è stato consulente della Regione Toscana nell'ambito del progetto "Gli Scenari Futuri nella Sanità" per l'analisi su "gli effetti dell'evoluzione della medicina e delle tecnologie sanitarie sui sistemi sanitari".
Dal 2004 è membro del Centro Studi della Fondazione Smith Kline di Roma.
E' professore a contratto presso la Scuola di Specializzazione di Farmacologia Clinica dell'Università di Catania per l'insegnamento di farmacogenetica e presso la Scuola di Specializzazione di Farmacologia Clinica dell'Università di Pisa.

Giuseppe Recchia is a medical doctor specialized in general surgery (University of Verona 1985) and in applied pharmacology (University of Modena, 1990). He entered the medical direction of the Glaxo company on 1984. Since 1993 he was the medical director of that company. Vice president and medical director of the new company GlaxoSmithKline spa, wich was born on 2001, at present he is appointed as medical-scientific director of this society. He is also professor at the specialization schools of pharmacology of Catania and Pisa.
He was responsible of the clinical development of a new drug, lacidipine, discovered by the Glaxo Group. The major research interest of Giuseppe Recchia is now the application of the genetics to the clinical development of drugs, with special reference to the ethical, loyal ad social implications of the pharmacogenetics and the development of the personalized medicine.

1. Introduzione

Perseguendo l'obiettivo di scoprire e sviluppare farmaci e vaccini in grado di offrire benefici incrementali rispetto alle terapie disponibili, la ricerca farmaceutica innovativa rappresenta una delle risposte maggiori ai problemi di salute della persona e della società. Scoprire e sviluppare un nuovo farmaco innovativo è un processo complesso, caratterizzato da notevoli incertezze, costi ingenti e tempi lunghi, il cui svolgimento può essere sintetizzato in quattro fasi principali: Ricerca di Genetica, Ricerca di Discovery, Ricerca di Drug Discovery e Ricerca di Sviluppo del Prodotto, ognuna delle quali con un obiettivo fondamentale da raggiungere (figura 1). In questo arco di tempo vengono utilizzate circa 2.000 molecole prima che una sola di queste posso essere candidata a raggiungere la prima somministrazione umana (figura 2).

Figura 1 - Fasi della Ricerca e dello Sviluppo del Farmaco

2. Ricerca di Genetica

Ha lo scopo di identificare i nuovi "targets" molecolari che formeranno la base per la ricerca di composti chimici da attuarsi nella ricerca di discovery. La ricerca di genetica permette anche di stabilire le relazioni tra varianti genetiche e suscettibilità alle malattie ed individuare le basi genetiche della risposta individuale ai farmaci.

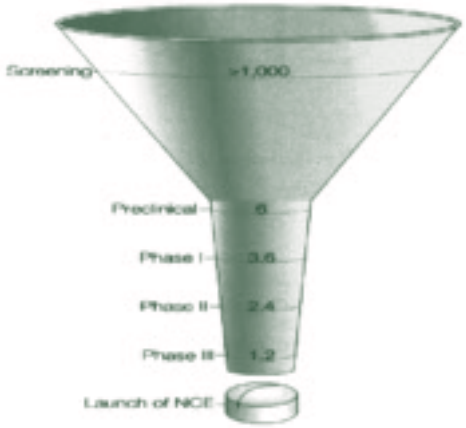
3. Ricerca di Discovery

Ha lo scopo di generare nuovi composti chimici specifici per i targets molecolari precedentemente identificati. Lo studio di questi composti chimici permette di valutare le loro caratteristiche per trasformarli in "lead compounds" ossia in potenziali farmaci candidati.

4. Ricerca di Drug Discovery

Ha lo scopo di far progredire i lead compounds fino alla prima dimostrazione di efficacia clinica, attraverso le prime fasi di sviluppo e la prima somministrazione nell'uomo (First Time In Human - FTIH).
La dimostrazione di efficacia e tollerabilità da parte dei lead compounds viene identificata come "Proof of Concept" (POC). Successivamente alla POC clinica possono essere condotti ulteriori studi di approfondimento atti a valutare la sviluppabilità prima dell'eventuale impegno allo sviluppo completo del nuovo composto.

Figura 2 - L'attrito della ricerca e sviluppo del farmaco. Per ogni nuovo farmaco immesso nella pratica medica sono almeno 2.000 le molecole sottoposte a screening farmacologico per la verifica preliminare di attività.



5. Ricerca di Sviluppo del Prodotto

Ha lo scopo di trasformare il potenziale farmaco candidato in farmaco vero e proprio, attraverso ulteriori studi sulla sicurezza, tollerabilità, efficacia clinica e formulazione, fino alla registrazione, commercializzazione e produzione su scala industriale.

5.1. Ricerca di Sviluppo Non – Clinica

La ricerca di sviluppo non clinica è costituita dall'insieme delle discipline (tossicologia, tecnica farmaceutica, farmacocinetica) che consentono di documentare un grado di tollerabilità sufficiente a consentire la richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica e successivamente a completare il dossier di registrazione del farmaco.

5.2. Ricerca di Sviluppo Clinico

Lo sviluppo clinico, condotto nell'uomo, procede attraverso 4 fasi distinte, che avvengono in parte in sequenza, in parte progrediscono in parallelo.

5.1.1. Fase I

E' la fase dello studio preliminare sulla sicurezza e sulla modalità di azione. Lo scopo principale di questa fase è ottenere una prima valutazione della sicurezza del farmaco e determinare ciò che accade al farmaco stesso una volta somministrato nel corpo umano: come esso viene assorbito, metabolizzato ed escreto (studio della cinetica). Lo studio è effettuato in generale su un numero limitato di volontari sani.
In alcuni casi, durante la fase I è possibile valutare alcuni effetti farmacologici. Per passare alle fasi successive, un farmaco deve dimostrare di essere sicuro, ben tollerato e possedere un'adeguata cinetica.

5.1.2. Fase II

E' la fase degli studi terapeutici pilota. Lo scopo principale è quello di valutare l'efficacia del farmaco in un ristretto numero di pazienti affetti dalla malattia o dalla condizione clinica per la quale il farmaco è proposto. Durante questa fase, vengono anche valutate le relazioni tra dose e risposta in gruppi ristretti di pazienti.

5.1.3. Fase III

E' la fase degli studi terapeutici allargati. Se la fase II fornisce risultati incoraggianti, la fase III coinvolge un numero più ampio di pazienti al fine di approfondire i dati di efficacia, di valutare il dosaggio più opportuno, di monitorare gli eventuali effetti collaterali su un campione di ampie dimensioni. Per la maggior parte, gli studi di fase III sono di tipo randomizzato e in doppio cieco e la loro durata è variabile a seconda degli obiettivi che la sperimentazione stessa si pone.
Durante questa fase viene sempre controllata con molta attenzione la tollerabilità (insorgenza di effetti indesiderati e/o collaterali) del farmaco.
I farmaci che passano con successo la fase III della sperimentazione ottengono l'autorizzazione per la commercializzazione.

5.1.4. Fase IV

E' la fase di sviluppo clinico condotta dopo la commercializzazione del nuovo farmaco nelle indicazioni, dosaggi e popolazioni autorizzate.
Anche quando un farmaco viene commercializzato ed utilizzato da migliaia di persone in uno o più paesi, gli studi clinici continuano con la fase IV. Gli studi di fase IV sono volti a confermare la sicurezza e la tollerabilità a lungo termine del farmaco, su un ampio numero di pazienti, nelle condizioni di trattamento proprie della pratica assistenziale.
I dati che si ottengono sono statisticamente importanti, in quanto coinvolgono un gran numero di utilizzatori, spesso diversi per età, razza, sesso.

6. Costi della scoperta e sviluppo del farmaco

Secondo l'ultimo rapporto sui costi della ricerca farmaceutica del Centro studi della Tufts University sono circa 800 i milioni di dollari necessari a scoprire e sviluppare un nuovo farmaco sino alla messa a disposizione dei pazienti.

7. L'esperienza della ricerca italiana

I composti scoperti e sviluppati in Italia negli ultimi 3 decenni rappresentano una minima parte dei farmaci immessi nella pratica medica dopo il 1990 e complessivamente ammontano a meno di una decina negli ultimi 30 anni. Tra questi, Lacidipina, farmaco antipertensivo appartenente alla classe dei calcio-antagonisti attualmente nella fase finale della propria vita brevettuale, per il quale è in corso la esplorazione della possibilità di sviluppo di un test farmacogenetico predittivo di risposta terapeutica nei confronti della progressione della aterosclerosi (figura 3).

Figura 3a - Lo sviluppo di Lacidipina, prodotto della ricerca italiana attualmente in commercio a livello globale.

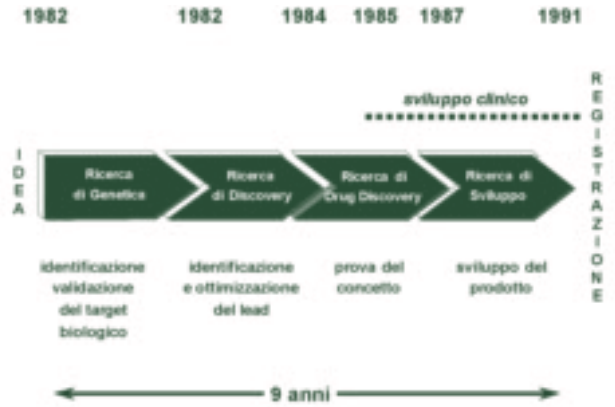
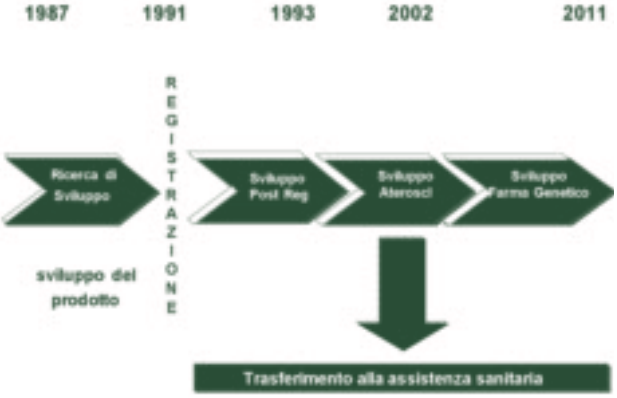


Figura 3b - Lo sviluppo farmacogenetico ha lo scopo di identificare eventuali geni correlati con la farmacocinetica e/o la farmacodinamica del composto, in grado di condizionare la risposta di efficacia e/o tollerabilità al farmaco e che possano essere utilizzati per lo sviluppo di un test predittivo di risposta al farmaco.



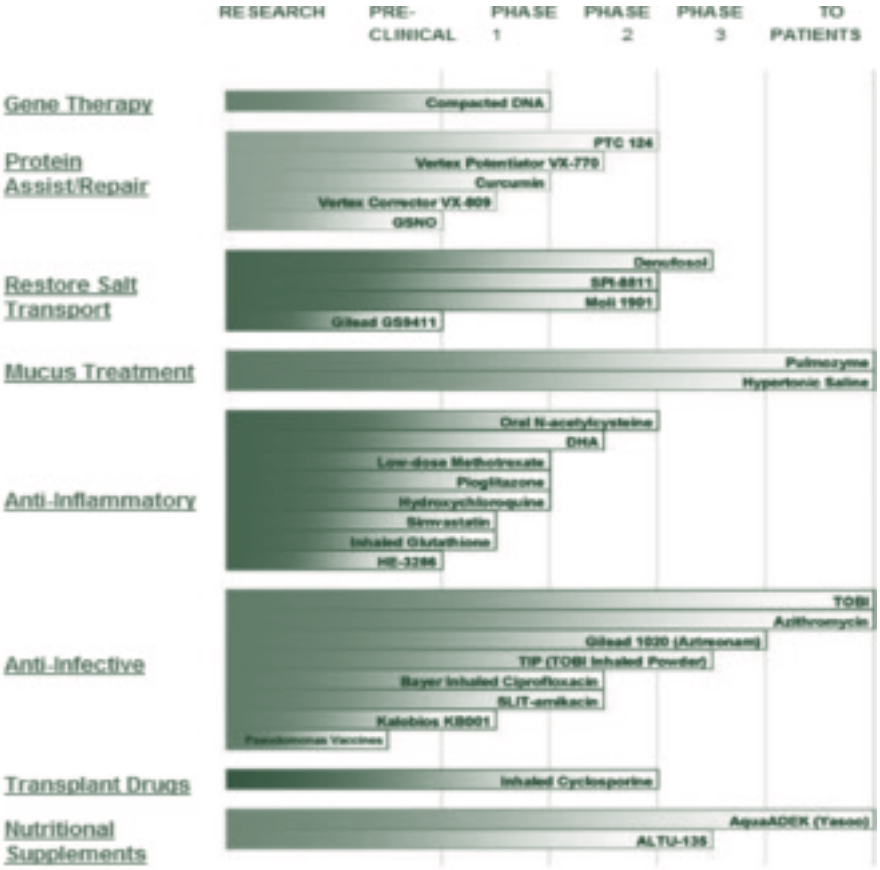


Figura 4 - Composti in sviluppo al gennaio 2008 per la terapia della fibrosi cistica (Pipeline pubblicata da Cystic Fibrosis Foundation, US)

8. Conclusioni

La scoperta e lo sviluppo di un farmaco innovativo, in grado di fornire beneficio incrementale, richiede una grande quantità di conoscenza, tecnologia, organizzazione e risorse. La tecnologia offre oggi la possibilità di trasformare la conoscenza sui meccanismi attraverso i quali la malattia si sviluppa in nuovi prodotti in grado di rispondere a bisogni di salute ancora in attesa di risposta, come nel caso della Fibrosi Cistica (figura 4).
Per giustificare il contratto sociale e la licenza di operare sui quali si regge lo sviluppo della impresa farmaceutica, tale attesa deve essere il più breve possibile, perché il malato non può aspettare.

---

1. Introduction

In pursuing the aim of discovering and developing drugs and vaccines that can offer more benefits to patients than those already on the market, innovative pharmaceutical research represents one of the main responses to individual and social health problems. Discovering and developing an innovative new drug is a complex process, characterised by considerable uncertainty, enormous costs and lengthy periods of time, which can be summarised in four main phases: Genetic Research Discovery Research, Drug Discovery Research and Product Development Research, each of which has a fundamental objective (figure 1). In this period of time, approximately 2,000 molecules are used before just one of these can be proposed for the first human administration (figure 2).

Figure 1 - Phases of Drug Research and Development

Figure 2 - The attrition of drug research and development. For every new drug introduced into medical practice, at least 2,000 molecules are subjected to pharmacological screening for the preliminary activity check.

2. Genetic Research
The aim of this phase is the identification of new molecular "targets" which will form the basis for the search for chemical compounds to be implemented in the discovery research phase. Genetic research also makes it possible to establish the relationships between genetic variations and susceptibility to diseases and identify the genetic foundations for the individual response to drugs.

3. Discovery Research
The aim of this phase is to generate new and specific chemical compounds for the molecular targets identified in the previous phase. The study of these chemical compounds makes it possible to assess their characteristics in order to transform them into "lead compounds", i.e. into potential candidate drugs.

4. Drug Discovery Research
The aim of this phase is to develop the lead compounds as far as the first demonstration of clinical efficacy, through the first stages of development and the first administration in humans (First Time In Human - FTIH).
The demonstration of efficacy and tolerability by the lead compounds is identified as "Proof of Concept" (POC). Following clinical POC, additional in-depth studies may be carried out in order to evaluate the development possibilities before any actual commitment is made for the full development of the new compound.

5. Product Research and Development
The aim of this phase is to transform the potential candidate drug into an actual drug, through further studies on safety, tolerability, clinical efficacy and formulation, up to registration, marketing and production on an industrial scale.

5.1. Non-Clinical Development Research
Non-clinical development research consists of the combination of specialist areas (toxicology, pharmaceutical technique, pharmacokinetics) that make it possible to document a sufficient degree of tolerability to allow the request for authorisation of clinical trials and then to complete the drug registration dossier.

5.2. Clinical Development Research
Clinical development, carried out in humans, proceeds through 4 distinct phases, which take place partly in sequence and partly in parallel.

5.1.1. Phase I
This phase deals with the preliminary trial regarding safety and mode of action. The main aim of this phase is to obtain an initial evaluation of the safety of the drug and to determine what happens to the drug in the human body once it has been administered: how it is absorbed, metabolized and excreted (kinetics study). The study is generally carried out in a limited number of healthy volunteers.
In some cases, it is possible to assess some pharmacological effects during phase I trials. A drug must prove to be safe and well tolerated and have adequate kinetics before moving on to the next phases.

5.1.2. Phase II
This phase consists of pilot therapeutic trials. The main aim is to evaluate the efficacy of the drug in a restricted number of patients affected by the disease or clinical condition for which the drug is proposed. During this phase, the relationships between dose and response are also evaluated in small groups of patients.

5.1.3. Phase III
This phase consists of extended therapeutic trials. If phase II provides encouraging results, phase III involves a larger number of patients in order to obtain more information on efficacy, to determine the most appropriate dosage and to monitor any side effects in a larger series of subjects.
Most phase III trials are randomized and in double blind, and their duration varies according to the objectives of the trial. Particular attention is paid to the tolerability of the drug (onset of undesired and/or side effects) during this phase.
Drugs that pass phase III trials successfully are granted marketing authorisation.

5.1.4. Phase IV
This clinical development phase is carried out after marketing of the new drug for indications, dosages and authorised populations. Even when a drug is marketed and used by thousands of people in one or more countries, the clinical trials continue with phase IV. The aim of phase IV trials is to confirm the safety and the long-term tolerability of the drug in a large number of people under normal health care treatment conditions. The data obtained are statistically important as they concern a large number of users, often differing in age, race and sex.

6. Drug discovery and development costs
According to the latest report on pharmaceutical research costs by the Tufts University Study Centre, the cost of discovering and developing a new drug and making it available to patients is around 800 million US dollars.

7. Italian research experience
The compounds discovered and developed in Italy over the last 3 decades represent just a small part of the drugs introduced into clinical practice since 1990, and overall amount to less than ten in the last 30 years. Among these, Lacidipine, an antihypertensive drug belonging to the class of calcium-channel blockers and currently in the final stage of its patent life, is being investigated for the possibility of developing a pharmacogenetic test to predict the therapeutic response with respect to the progression of atherosclerosis (figure 3).

8. Conclusions
The discovery and development of a new drug, able to provide an additional benefit to patients, requires considerable knowledge, technology, organisation and resources. Technology currently offers the possibility of transforming the knowledge of the mechanisms through which a disease develops into new products that can respond to health requirements that are still waiting for an answer, as in the case of Cystic Fibrosis (figure 4).
To justify the social contract and the licence to operate which govern the development of a pharmaceutical company, this waiting period must be as short as possible, since the patient does not have the time to wait.

References

- *Andrew J. Fletcher, Lionel D. Edwards, Anthony W. Fox, Peter D. Stonier*
  Practice and Principles of Pharmaceutical Medicine
  John Wiley, New York 2005
- *John Griffin and John O'Grady*
  The Textbook of Pharmaceutical Medicine
  Blackwell, New York 2006
- *Wells J*
  Pharmaceutical Ethics
  Med Ethics.2004; 30: e2
- *Center for Drug Evaluation and Research - CDER Drug and Biologic Approval Reports*
  http://www.fda.gov/cder/rdmt/default.htm
  consultato il 28 aprile 2008
- *Center for Drug Evaluation and Research - Frequently Asked Questions on Drug Development and Investigational New Drug Applications. http://www.fda.gov/cder/about/smallbiz/faq.htm*
  consultato il 28 aprile 2008
- *GlaxoSmithKline - Rapporto di sostenibilità 2006*
  http://www.gsk.it/attach/content/2107/Rapposto_sos_2006.pdf
  consultato il 28 aprile 2008

Aggiornamento sui più promettenti studi clinici in corso per la fibrosi cistica.

An Update on the Most Promising Clinical Trials in Cystic Fibrosis.

Jeffrey Scott Wagener, MD
Professor of Pediatrics
University of Colorado School of Medicine
Denver, USA

Jeff Wagener ha una lunga esperienza nel campo della pneumologia pediatrica, avendo egli contribuito ad importanti acquisizioni nell'approccio broncoscopico e in vari aspetti dell'infiammazione polmonare. Direttore associato (con Frank Accurso) del centro fibrosi cistica di Denver dal 1990 al 2005 e direttore medico del dipartimento per le cure respiratorie dal 1995 al 2004, ha prodotto studi rilevanti su aspetti molteplici della fibrosi cistica. In particolare ha coltivato i problemi dell'infiammazione broncopolmonare precoce, del rapporto tra stato nutrizionale e funzione polmonare, del significato delle vitamine, dello screening neonatale (in Colorado il primo programma di screening neonatale CF negli USA), della gravidanza in donne FC. Ha condotto o collaborato a numerosi trial clinici sul trattamento della fibrosi cistica, tra cui l'impiego di antiossidanti. Nella sua pausa da diretti impegni clinici, tra il 2005 e il 2007, come direttore medico della Cystic Fibrosis Biotherapeutics, Genentech, Inc, ha contribuito all'elaborazione di significativi studi epidemiologici su dati ricavati dal registro americano ECFS. Ora è direttore del Pediatric Pulmonary Fellowship all'Università del Colorado.

Jeff Wagener has a long experience in pediatric pulmonology, and contributed to important acquisitions in the bronchoscopic approach and in several aspects of the lung inflammation. Associate Director (with Frank Accurso) of the Cystic Fibrosis Center of Denver from 1990 to 2005 and Medical Director of the Respiratory Department (Children Hospital, Denver) from 1995 to 2004, he raised remarkable studies on several aspects of cystic fibrosis. Particularly, he faced the problems of the: early bronchopulmonary inflammation in infants diagnosed by newborn screening, relationship between nutritional status and lung function, meaning of vitamins status, newborn screening (the first one regional screening programme in US), pregnancy in CF women. Jeff Wagener led or collaborated to several clinical trials on the treatment of CF patients, with the recent inclusion of the use of antioxidants. During a pause in the clinical commitment, from 2005 to 2007, as medical director of the Cystic Fibrosis Biotherapeutics, Genentech Inc, he contributed to develop significant studies based on data from the American ECFS registry. At present, he is the director of the Pediatric Pulmonary Fellowship at the University of Colorado.

Da quando nel 1989 è stato scoperto il gene responsabile della fibrosi cistica (FC), le condizioni di salute e la durata della vita dei malati sono nettamente migliorate (1). Tuttavia, in questi 19 anni solo due farmaci (il dornase alfa e la tobramicina in soluzione da usare per aerosol) sono stati realmente sviluppati e specificamente approvati per la cura dei malati FC. Inoltre, se guardiamo ai miglioramenti ottenuti riguardo a durata e qualità di vita, non possiamo dire che siano state queste terapie a modificarle vistosamente. Ma adesso possiamo dire che stiamo per entrare in un nuovo periodo di scoperta e sviluppo di terapie per la malattia FC. Quando il gene è stato identificato è stata aperta la porta per capire meglio la fisiopatologia della malattia polmonare dovuta alla FC. L'identificazione del gene ha portato alla descrizione della **CFTR** (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane conductance **R**egulator , la *proteina della fibrosi cistica regolatrice della conduttanza transmembrana*) e l'identificazione della proteina ha dato avvio alla comprensione dei meccanismi che portano al danno polmonare. Ora, migliorando continuamente la conoscenza di questi meccanismi, è possibile ideare nuovi farmaci per impedire che il processo si sviluppi. Per capire come si possa arrivare alla messa a punto di nuovi farmaci, abbiamo bisogno di capire prima di tutto come gli aspetti dell'anormalità genetica portino all'ostruzione cronica, all'infezione, all'infiammazione; e come tutto questo alla fine possa distruggere il tessuto polmonare. Inoltre, per capire come i nuovi farmaci possano portare beneficio alla salute dei malati FC, abbiamo bisogno di sapere come i pazienti vengono assistiti e come può essere migliorata la qualità dell'assistenza che ricevono.

Il gene responsabile della FC codifica per la proteina CFTR, che normalmente è situata sulla superficie apicale delle cellule epiteliali, ed è responsabile di molte attività, la fondamentale delle quali è il trasporto degli ioni cloro dentro e fuori le cellule. Nell'epitelio respiratorio la proteina CFTR ha il compito di far sì che il cloro lasci la cellula ed entri nel lume delle vie aeree. La teoria corrente suggerisce che se la proteina CFTR non funziona si verifica un'alterazione dell'equilibrio esistente fra gli ioni all'interno e all'esterno della cellula, con il risultato che il sodio presente nel lume aereo è eccessivamente riassorbito, cosicchè passa all'interno della cellula e trascina con sé anche l'acqua (2). Questo eccessivo riassorbimento dell'acqua porta ad un ispessimento delle secrezioni e l'ispessimento delle secrezioni porta all'ostruzione mucosa del bronco. Nel bronco ostruito si sviluppa l'infezione che tende a diventare cronica. All'infezione si accompagna uno stato di infiammazione cronica che comporta un danno delle cellule e la distruzione dell'integrità delle vie aeree. Quando il danno delle vie aeree è molto avanzato, la sola terapia disponibile per avere la possibilità di allungare la vita è il trapianto di polmoni.
Una terapia per fermare o almeno ritardare la progressione della malattia polmonare FC può essere rivolta a qualsiasi aspetto e a qualsiasi livello di questo processo patologico, che è progressivo. Tuttavia, si potrà intervenire più efficacemente sul decorso della malattia se la terapia potrà influenzarne gli stadi più precoci, in modo da prevenire la fase finale della distruzione del polmone.

Le mutazioni del gene nella FC incidono su molti aspetti della produzione e della funzione di CFTR (3). Sono state descritte cinque classi generali di mutazioni. Le mutazioni di Classe I, come la W1282X, fanno sì che la proteina CFTR non venga sintetizzata. Durante la lettura dell'informazione genetica si verifica un improvviso stop e il tentativo di copiare l'informazione termina prematuramente, con il risultato che la proteina non viene prodotta. Le mutazioni di Classe II, a cui appartiene la DF 508, producono una proteina instabile che è degradata prima che raggiunga la superficie della cellula . E' interessante il fatto che se la proteina raggiunge la superficie della cellula, può funzionare in maniera simile (ancorché in misura minore) alla CFTR normale. Le mutazioni di Classe III, come la G551D, danno origine ad una proteina che raggiunge la superficie della cellula epiteliale, ma poi non risponde al normale processo di attivazione esercitato dalla cellula. Le mutazioni di Classe IV , come per esempio la R117H, sono simili a quelle di Classe III, infatti raggiungono la superficie della cellula, però il canale del cloro attraverso la membrana cellulare funziona in maniera ridotta. Infine, le mutazioni di Classe V , come la 3849+10kbC->T, portano ad una proteina che funziona normalmente, ma è prodotta in quantità più scarsa e ha una minor densità sulla superficie della cellula. In definitiva, le mutazioni sia di Classe IV che di Classe V determinano la sintesi di una quantità di proteina sufficiente per un minimo funzionamento del canale del cloro, per questa ragione i pazienti in cui sono presenti hanno in genere sufficienza pancreatica, test del sudore con valori più bassi e sintomi respiratori con andamento più lieve.

Al momento attuale ci sono molti farmaci, sia farmaci nuovi che farmaci già esistenti, che sono indirizzati ai pazienti FC. Io tratterò in particolare di quelli che ritengo rappresentare le cinque scoperte più brillanti, i **cinque punti luce** emersi durante lo scorso anno; ma farò anche brevemente menzione di altre interessanti potenziali terapie. Molti di questi approcci riguardano studi attivamente supportati dalla Cystic Fibrosis Foundation degli USA nel suo piano a catena per le nuove terapie e se ne può trovare descrizione nel sito www.cff.org .

Ovviamente, trattandosi di una malattia genetica, la **terapia genica** è la prima terapia presa in considerazione nella ricerca di un trattamento risolutivo (4). Però l'ottimismo dei primi tempi è stato smorzato dalle difficoltà relative al trasporto del nuovo gene là dove è necessario che si collochi; e inoltre dalla conoscenza delle difese che l'organismo mette in atto contro le interferenze genetiche esterne. Pur con questi limiti, rimane molto forte l'attrattiva verso questa potenziale terapia, perciò le ricerche continuano e sono orientate a sviluppare nuove interessanti strategie per affrontare le difficoltà incontrate finora.

Una seconda opzione attraente è la **correzione della proteina CFTR**. C'è da dire che l'esistenza di più classi di mutazioni porta alla necessità potenziale di molti tipi di terapia. In generale, i farmaci diretti verso la proteina CFTR possono essere distinti in "correttori" e "potenziatori". I "correttori" sono farmaci che hanno lo scopo di impedire la precoce degradazione della proteina, in modo da permetterle di raggiungere la superficie della cellula. I "potenziatori" sono farmaci che hanno lo scopo di stimolare la conduttanza (il passaggio del cloro attraverso il canale) una volta che la proteina è situata sulla superficie della cellula. In presenza di alcune mutazioni, come la DF508, può essere necessaria una combinazione di due farmaci perché vi sia beneficio evidente nel paziente.

Un nuovo farmaco interessante, che sembra avere buone probabilità di successo, è il **PTC-124** (5). Sebbene non sia ufficialmente considerato un "correttore", questo farmaco, somministrato per bocca, promuove la completa lettura dell'informazione genetica delle mutazioni nonsenso, vale a dire quelle di Classe I. Gli studi preliminari sono stati incoraggianti e in aggiunta alla FC, ci sono altre malattie genetiche, come la distrofia muscolare di Duchenne, per cui questo approccio sembra essere valido. Di rilievo però il fatto che, mentre alcuni studi con il PTC-124 svolti in Israele sono sembrati promettenti, uno studio progettato in maniera simile, realizzato con la partecipazione di molti centri FC negli USA, non ha mostra-

to lo stesso livello di beneficio. La maggior difficoltà in questi studi clinici è stata quella di identificare quali fossero gli indici di miglioramento da studiare nei pazienti, dal momento che non è detto che qualsiasi farmaco necessariamente produca un miglioramento della funzione polmonare, che è l'indice clinico più comunemente usato in tutti gli studi finora svolti in FC.

La CFF degli USA ha fortemente intensificato la ricerca di "**correttori**" e di "**potenziatori**" qualche anno fa, mettendo a disposizione dell'industria farmaceutica finanziamenti ingentissimi, rivolti a scoprire nuove terapie per mezzo di un procedimento chiamato "screening ad alta efficienza" ("high throughput drug screening"). Durante questo processo, milioni di potenziali agenti terapeutici sono stati screenati, con il risultato che sono stati individuati da diversi investigatori un buon numero di possibili nuovi farmaci. Attualmente, parecchie compagnie farmaceutiche stanno iniziando a sviluppare terapie con alcuni di questi nuovi composti.

Un "potenziatore" che di recente ha completato la prima parte di un trial di fase II, nel corso del quale sono state usate dosi diverse del farmaco e sono state paragonate agli effetti di un placebo, è il **VX-770**, una piccola molecola che si prende per bocca (6). I risultati preliminari mostrano che il VX-770 migliora il test del sudore, la funzione polmonare e la differenza dei potenziali nasali nei pazienti FC con mutazione G551D. Si è anche notato un effetto dose dipendente, mentre non si sono avuti effetti collaterali sfavorevoli. Mentre questo farmaco somministrato da solo potrebbe essere efficace per le mutazioni di classe III, si sta sviluppando un "correttore", **VX-809**, che potrebbe portare ad una terapia combinata (potenziatore e correttore insieme) per i pazienti con DF508 (Classe II) .

Numerosi altri nuovi "correttori" e "potenziatori" sono in fase di allestimento sia da parte delle industrie farmaceutiche che da parte dei centri di ricerca universitari.

Sebbene queste prime scoperte appaiano promettenti, lo screening ad alta efficienza per trovare nuovi farmaci è ancora in piena attività. Di recente sono state identificate alcune tecniche per la correzione della proteina immatura usando un sistema di screening basato sui lieviti (7). (Il lievito è un sistema di studio ben riconosciuto poiché molte delle proteine e dei meccanismi cellulari nel lievito hanno un corrispettivo simile nell'uomo, n.d.r.). Inoltre, continuano ad essere studiati nei loro effetti in FC composti già esistenti come il 4-fenilbutirrato e la curcumina.

Nella cascata di eventi che portano alla malattia, la correzione della proteina CFTR probabilmente determinerebbe un effetto più precoce rispetto al cambiamento dell'ambiente all'interno delle vie aeree. Però le recenti segnalazioni dei benefici prodotti dall'inalazione della soluzione **salina ipertonica** hanno ulteriormente stimolato la ricerca di modalità alternative per modificare l'ambiente delle vie aeree e aumentare in questa sede la concentrazione dell'acqua. La soluzione salina ipertonica è iperosmolare e si ritiene che migliori la clearance mucociliare richiamando acqua nelle vie aeree (8). Il **mannitolo** inalato dovrebbe agire allo stesso modo e lo si sta studiando in FC. Altri modi per aumentare l'acqua nelle vie aeree dovrebbero passare attraverso l'aumento del cloro o del sodio alla loro superficie e dovrebbero quindi agire stimolando canali alternativi del cloro o inibendo il riassorbimento del sodio. E' in fase di avanzato sviluppo il **Denufosol**, che agisce sui recettori P2Y2 attivando un canale del cloro calcio-dipendente (9). Gli studi in corso suggeriscono che questo farmaco nebulizzato migliora la clearance muco-ciliare, sebbene possa produrre alcuni effetti collaterali sfavorevoli simili a quelli provocati dalla soluzione salina ipertonica. Sono in fase di intenso sviluppo molti altri potenziali farmaci diretti al trasporto del sodio e del cloro, ma anche per questi c'è il problema di eliminare gli effetti sfavorevoli.

L'ostruzione provocata dal muco rimane la caratteristica della malattia polmonare FC. Parecchi farmaci già esistenti, come altri di nuova sintesi, sono diretti a ridurre l'ostruzione provocata dal muco. E' in corso un trial di fase III con il **Tiotropium**, un derivato dell'atropina che dovrebbe diminuire la produzione di muco. Si sta studiando anche il **Nacystelyn**, un derivato della n-acetilcisteina che è stata storicamente usata per fluidificare il muco in FC. Infine c'è da dire che alcuni dei benefici della soluzione salina ipertonica possono essere collegati alle sue proprietà di modificare le caratteristiche del muco FC. E molte di queste terapie dirette contro il muco FC sono aggiuntive o sinergiche a quella che è già disponibile con questi effetti, cioè la terapia con dornase alfa (pulmozyme).

Il terzo punto luce emerso quest'anno nella terapia FC è il completamento della fase III del trial per un nuovo antibiotico antipseudomonas, l'**aztreonam lisato** (10). Questo antibiotico destinato all'inalazione userà un nuovo dipositivo per l'erogazione, il nebulizzatore e-Flow, e gli studi eseguiti hanno riportato non solo un miglioramento della funzione polmonare e una diminuzione delle esacerbazioni respiratorie, ma anche un miglioramento della qualità della vita così come valutata dai malati.

La tappa finale del percorso che porta al danno e alla distruzione delle vie aeree è l'eccessiva riposta infiammatoria con alto contenuto di neutrofili. Parecchie nuove terapie o terapie già esistenti sono rivolte a ridurre questa infiammazione o i livelli dei prodotti dell'infiammazione. L'**acetilcisteina** per bocca, il **metotrexate** a basse dosi, la **simvastatina**, il **pioglitazone**, l'**idrossiclorochina** e il **glutatione** inalato sono solo alcune di queste potenziali terapie. E l'anno scorso c'è stata un'ulteriore conferma di validità di una terapia antiinfiammatoria già esistente.
E' stato dimostrato infatti come l'**ibuprofen** possa ridurre il declino della funzione polmonare in una rassegna basata sui dati del Registro FC degli USA (11). Questi risultati sono simili a quelli visti in precedenti studi clinici controllati e randomizzati. Inoltre, è stata confermata la relativa sicurezza di questa terapia.

Infine, il quinto punto che ho scelto come punto luce è l'attiva ricerca del **miglioramento della qualità delle cure** da parte della comunità dei sanitari che si occupano di FC (12). E' vero che è molto incoraggiante che siano in fase di scoperta così tanti nuovi farmaci, ma non dimentichiamo che i miglioramenti dello stato di salute dei malati FC in passato non sono stati determinati dalle nuove terapie. Inoltre, mano a mano che queste nuove terapie diventeranno disponibili, rimane aperta la realizzazione dell'impresa di come metterle a disposizione e come avviarle in ogni parte del mondo, in modo da portare beneficio ad ogni malato FC. L'obiettivo del miglioramento della qualità perseguito da tutti, sia coloro che provvedono all'assistenza dei malati FC sia i malati stessi, non solo porterà ad un immediato miglioramento in termini di salute, ma avrà anche il significato che le nuove terapie potranno essere iniziate nel più breve tempo possibile e con il massimo beneficio possibile. La recente pubblicazione delle linee guida per il trattamento della malattia FC da parte delle comunità FC degli USA e d'Europa mette a disposizione un orientamento chiaro per tutti coloro che hanno il compito di fornire assistenza ai pazienti FC (13,14). L'applicazione pratica di queste linee guida rimane una sfida, ma può essere vinta con l'ampliamento degli sforzi per migliorare la qualità.

La ricerca attuale in FC riguarda tutti gli aspetti della fisiopatologia polmonare FC e comprende sia farmaci già esistenti che farmaci di nuova sintesi. Le attese per il successo che parecchi di questi farmaci dovrebbero portare, essendo farmaci che usano approcci del tutto diversi dal passato, per curare le anomalie alla base della malattia non sono mai state così grandi come oggi.

Since the discovery in 1989 of the gene responsible for Cystic Fibrosis, patient health and survival has progressively improved (1). However, during these 19 years only two new medications (dornase alfa and tobramycin solution for inhalation) have actually been developed and approved specifically for the care of CF patients. Furthermore, in looking at improvements in survival and overall patient will being, neither of these therapies has dramatically altered outcome. But we are now entering an entirely new period of medication discovery and development for CF. When the gene was identified the door opened to better understand the pathophysiology of CF related lung disease. Identifying the gene lead to the description of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein, and identification of the protein began the process of understanding how lung damage occurs. Now, with a better understanding of the process, new medications designed to alter that process are being developed. To understand the development of new medications we need to first understand some aspects of how a genetic abnormality leads to chronic airway obstruction, infection, and inflammation leading to eventual lung destruction. Additionally, to understand how new medications will improve the health of CF patients we need to understand how patients receive there care and how quality of care can be improved.

The gene responsible for CF codes for the CFTR protein which normally sits on the apical surface of epithelial cells and is responsible for many activities, the post obvious of which is the transport of chloride ions into or out of the cell. In respiratory epithelium, CFTR allows chloride to leave the cell and enter the airway lumen. Current theory suggests that when the CFTR protein does not function, an ion imbalance develops across the epithelial surface and sodium in the airway lumen is excessively reabsorbed and water follows sodium into body (2). This excessive reabsorption of water from the airway lumen leads to thickening of secretions and mucous obstruction. Infection of this obstructing mucous develops and becomes chronic. The chronically infected airway becomes chronically inflamed and results in damage to the airway cells and destruction of the airway's integrity. When the airway damage becomes excessive, the only available therapy to potentially delay death is lung transplantation. Therapy to stop, or at least delay the progression of CF lung disease can be directed at any aspect of this progressive pathologic process. However changing the course of disease will be most effective if the therapy influences the early stages of disease, thus preventing downstream lung destruction.

***Gene mutations in CF** impact many aspects of CFTR production and function (3). Five general "classes" of mutations have been described. Class I mutations, such as W1282X, produce mutants that are never expressed. During the reading of the genetic information there is a sudden "stop" reached and the attempt to copy the genetic information is prematurely terminated. Class II mutations, including the most common ΔF508, produce an unstable protein which is degraded before it can reach the cell surface. Interestingly, if the protein does reach the surface, it may function similarly to normal CFTR. Class III mutations, such as G551D, result in protein reaching the epithelial cell surface, but then not responding to the normal activation process of the cell. Class IV mutations, for example R117H, are similar to Class III in that these mutant proteins reach the cell surface but conduct chloride through the cell wall at a much decreased rate. Finally, Class V mutants, such as 3849+10kbC T, can be normally functioning proteins, but are produced in a lower amount and have decreased density on the cell surface. Both Class IV and V mutations lead to enough protein function that patients will be pancreatic sufficient, have lower sweat chloride values, and experience less rapid respiratory damage.*

*Currently there are many new and existing medications that are being looked at in CF patients. Although I will focus on what I feel to be the five **"brightest lights"** during the past year, I will also briefly mention other exciting potential therapies. Many of these approaches involve studies actively supported by the US CF Foundation in their "therapeutic pipeline" and can be reviewed on their website www.cff.org.*

*Obviously **gene therapy** is the first consideration for definitively treating a genetic disease (4). However, early optimism that this would be possible in CF has been dampened by difficulties in delivering the new gene to where it needs to be and by the body's natural defense against outside genetic interference. That being said, the attactiveness of this potential therapy has led to continued research and the development of new, exciting ideas for managing the difficulties experienced so far.*

***Correcting the CFTR protein** is a second attractive option, but multiple classes of mutations leads to potentially needing multiple types of therapy. Generally therapies to treat the protein can be separated into 'correctors' and 'potentiators'. 'Correctors' are therapies that will alter the early degradation of the protein, allowing it to reach the cell surface. 'Potentiators' are therapies that will stimulate chloride conductance once the protein is located on the cell surface. For some mutants only a 'corrector' or a 'potentiator' would be necessary to restore near normal cell function. In other situations, such as the ΔF508, a combination of the two may be necessary to benefit the patient.*

*One exciting new therapy with good potential for success is **PTC-124** (5). Although not officially considered a 'corrector', this orally administered medication promotes the readthrough of nonsense mutations, ie. class I. Early studies have been encouraging and in addition to CF, there are several other genetic diseases, such as Duchenne muscular dystrophy, where this approach may have value. Of concern is that while studies in Isreal showed promise, a similarly designed study involving multiple CF sites in the US did not show the same degree of benefit. The major challenge in these trials has been detecting change in the patient since this therapy will not necessarily result in improvement of lung function, the most commonly used outcome in past studies of CF.*

*The US CFF greatly enhanced the search for **'correctors'** and **'potentiators'** several years ago by providing industry grants to discover medications using high throughput drug screening. During this process millions of potential agents were screened and several potential medications were identified by multiple investigators. Currently several companies are initiating drug development with some of these new medications.*

*One 'potentiator' which recently completed early phase II trials comparing several different doses with placebo is VX-770, an orally administered small molecule (6). Preliminary results show that **VX-770** improved the sweat test, pulmonary function, and nasal potential difference in CF patients with the G551D mutation. A dose effect was present and no significant adverse events were noted. While this single drug therapy might be effective for class III mutations, a 'corrector' **VX-809** is also under development which would lead to combination therapy for patients with ΔF508. Numerous other new 'correctors' and 'potentiators' are being worked*

on at both industry and academic research centers.

Although these early discoveries appear promising, high throughput screening for additional therapies continues. Recently techniques for correcting the misfolded protein have been identified using a yeast based screening system (7). Additionally, existing chemicals such as 4-phenylbutyrate and curcumin continue to be looked at for their impact in CF.

While correction of the protein would impact earlier in the disease pathway then changing the airway surface environment, recent reports of benefits from ***hypertonic saline inhalation*** *has further stimulated research into alternative pathways for altering airway ion and water concentrations. Hypertonic saline is hyperosmolar and believed to improve mucociliary clearance by bringing water into the airway (8).* ***Inhaled manitol*** *should act similarly and is being studied in CF. Other ways of increasing water in the airway by increasing chloride or sodium in the airway would be to stimulate alternative chloride channels or inhibit sodium re-absorption. Furthest along in development is* ***Denufosol****, a P2Y2 calcium-activated chloride channel agonist (9). Ongoing studies suggest that this nebulized drug improves mucociliary clearance, although side effects may be a problem similar to those with hypertonic saline nubulization. Numerous other potential medications directed at sodium and chloride transport are under active development, but again potential adverse effects need to be avoided.*

Mucous obstruction remains the hallmark of CF lung disease. Several existing as well as new medications are directed at reducing mucous obstruction. A phase III trial of ***Tiotropium*** *(a derivative of atropine which decreases mucous production) is underway in CF.* ***Nacystelyn****, a derivative of n-acetylcysteine which was historically used to break-up mucous in CF, is also being studied. Finally, some of the benefit of hypertonic saline may be related to its mucous altering properties. Many of these therapies are additive or synergistic to currently available dornase alfa therapy.*

The third "bright light" in CF therapy this year is the completion of the phase III trial for a new anti-pseudomonas antibiotic, ***Aztreonam lysate*** *(10). This new inhaled antibiotic will use a new delivery platform, the eFlow nebulizer, and successful study results included not only improved pulmonary function and decreased respiratory exacerbations, but also improved patient reported health related quality of life (QOL).*

An over exuberate, neutrophilic inflammatory response in the airway appears to be the final pathway for airway damage and destruction. Several new and existing therapies are aimed at reducing this inflammation or the levels of inflammatory byproducts. Oral ***n-acetylcysteine****, low dose* ***methotrexate****,* ***simvastatin****,* ***pioglitazone****,* ***hydroxychloroquine****, and inhaled* ***glutathione*** *are just a few of these potential CF therapies. During this last year there was additional validation of an existing anti-inflammatory therapy in CF.* ***Ibuprofen*** *was shown to reduce the rate of decline in pulmonary function in a review of the US CFF registry database (11). These results were similar to those seen in previous randomized controlled trials. Additionally, the relative safety of this therapy was confirmed.*

Finally, my fifth choice of a "bright light" is the active pursuit of ***Quality Improvement*** *by the CF community (12). While it is exciting that so much new drug discovery is being done, the improvements in outcomes for CF patients in the past has not been dependent on new therapies. Additionally, as these new therapies become available, how they will be instituted world wide to benefit every CF patient remains a challenge. Quality improvement by all CF care providers and patients will not only lead to immediate improvement in health, but will also mean that new therapies can be started at the soonest possible time and with the greatest potential benefit. Recent publications of treatment guidelines by US and European CF communities provide leadership for all CF care providers (13, 14). Implementation of these guidelines remains a challenge, but this can be solved by expanded quality improvement efforts.*

Current research in CF involves all aspects of the lung disease pathophysiology and involves both existing and new medications. Expectations for success with several new medications using innovative approaches to treating the early abnormalities of CF have never been higher.

References

1. *Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245:1066–1073*
2. *Boucher RC Airway surface dehydration in cysticfibrosis: pathogenesis and therapy. Annu Rev Med 2007;58:157–170*
3. *Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, CoreyM, Levison H, Durie PR Correlation of sweat chlorideconcentration with classes of the cystic fibrosis transmembraneconductance regulator gene mutations. J Pediatr 1995;127:705–710*
4. *Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. Gene Ther 2006;13:1061–1067*
5. *Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, et al. PTC124 targetsgenetic disorders caused by nonsense mutations. Nature 2007;447:87–91*
6. *Vertex Pharmaceuticals Initiates Phase I Development For VX-770 In Cystic Fibrosis. Medical News Today, 18 May 2006. http://www.medicalnewstoday.com/articles/43611.php*
7. *FoldRx. http://www.foldrx.com/science/drug_screening.shtml*
8. *Donaldson SH, Bennett WD, Zeman KL, Knowles MR, Tarran R, Boucher RC. Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. N Engl J Med 2006;354:241-50.*
9. *Deterding RR, Lavange LM, Engels JM, Mathews DW, Coquillette SJ, Brody AS, Millard SP, Ramsey BW Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulised denufosol tetrasodium in cystic fibrosis for the Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network and the Inspire 08–103 Working Group. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:362–369*
10. *Retsch-Bogart GZ, Burns JL, Otto KL, Liou TG, McCoy K, Oermann C, Gibson RL; AZLI Phase II Study Group. A phase 2 study of aztreonam lysine for inhalation to treat patients with cystic fibrosis and Pseudomonas aeruginosa infection. Pediatr Pulmonol. 2008;43:47-58.*
11. *Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Clinical use of Ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176:1084-9.*
12. *Quinton HB, O'Connor GT. Current issues in quality improvement in cystic fibrosis. Clin Chest Med. 2007;28:459-72.*
13. *Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ Jr, Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176:957-69.*
14. *Smyth A, Elborn JS. Exacerbations in cystic fibrosis: 3--Management. Thorax. 2008;63:180-4.*

I moderatori del Seminario
Seminar's moderators

Prof. Carla Colombo

Direttrice Centro Regionale Lombardo Fibrosi Cistica
Istituti Clinici di Perfezionamento, Università di Milano
Attuale Presidente della Società Italiana Fibrosi Cistica (SIFC)

Director Regional Cystic Fibrosis Center of Lombardia, University of Milan.
Current President of the Italian Cystic Fibrosis Society (SIFC)

Dr. Francesca Pardo

Direttrice Centro Regionale Siciliano Fibrosi Cistica
Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo
Già Segretario del Gruppo di Lavoro Italiano Fibrosi Cistica,
fondatrice della Società Italiana Fibrosi Cistica

Director Regional Cystic Fibrosis Center of Sicily, Children Hospital "G. Di Cristina".
Palermo. Past Secretary of the Italian Working Group for Cystic Fibrosis,
founder of the Italian Cystic Fibrosis Society

Dr. Cesare Braggion

Direttore Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica
Ospedale "Meyer", Firenze
Già Presidente della Società Italiana Fibrosi Cistica

Director Regional Cystic Fibrosis Center of Tuscany, Children Hospital "Meyer",
Florence. Past President of the Italian Cystic Fibrosis Society.

Workshop: Modelli animali nella ricerca CF

Animal models in CF research

Introduzione. Utilità e questioni aperte nell'uso di topi con fibrosi cistica.

Introduction. Cystic fibrosis mice: usefulness and unresolved questions.

Massimo Conese, PhD
Dipartimento di Scienze Biomediche
Università degli Studi di Foggia

Il Dr. Massimo Conese è Professore Associato di Patologia presso la Facoltà di Medicina e Chirugia dell'Università degli Studi di Foggia dal 2005. Ha diretto l'Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis presso l'Istituto Scientifico San Raffaele a Milano dal 2001 al 2007. I suoi principali interessi di ricerca sono: 1) trasferimento genico nell'epitelio respiratorio via vettori virali e non virali; 2) caratterizzazione di cellule staminali ematopoietiche murine e loro homing al polmone; 3) interazione ospite-patogeno in relazione a Pseudomonas aeruginosa e cellule epiteliali respiratorie in modelli in vitro e in vivo; 4) ruolo delle cellule epiteliali respiratorie nella risposta infiammatoria polmonare in Fibrosi Cistica.

Dr. Massimo Conese is Associate Professor of Pahology, School of Medicine, of the University of Foggia since 2005. He has been the group leader of the Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis at the San Raffaele Scientific Institute in Milan from 2001 to 2007. His main research interests encompass: 1) gene transfer to the respiratory epithelium through viral and non-viral vectors; 2) characterization of murine hematopoietic stem cells and their homing to the lung; 3) host-pathogen interaction between Pseudomonas aeruginosa and airway epithelial cells in vitro and in vivo models; 4) role of airway epithelial cells in Cystic Fibrosis inflammatory response in the lung.

Benché il primo modello murino di fibrosi cistica (FC) sia stato creato nel 1992 ed il numero di modelli disponibili ad oggi è di tredici, la loro utilità nella valutazione della biologia della proteina CFTR (CF transmembrane conductance regulator), della fisiopatologia a livello di organo, di indicatori surrogati di malattia e di nuove terapie è ancora controversa (Grubb and Boucher 1999). Tra i vari motivi addotti per spiegare ciò, vanno in primo luogo ricordati quelli che hanno a che fare con l'anatomia e la fisiologia dei topi rispetto a quella umana. L'uomo presenta ghiandole sottomucose in alto numero a livello bronchiale, mentre i topi no, rappresentando un limite alla produzione di muco che costituisce un evento importante della malattia polmonare FC. L'espressione della stessa CFTR è più bassa nelle vie aeree murine rispetto a quelle umane. Infine, dati sperimentali indicano che la secrezione di cloro nei polmoni murini viene effettuata prevalentemente da canali del cloro alternativi rispetto alla CFTR (Rochelle et al 2000). Come conseguenza, nessuno dei diversi modelli murini fino ad ora studiati sviluppa spontaneamente una malattia polmonare simile a quella dei pazienti, benché una certa correlazione con la malattia intestinale sia stata trovata (Davidson and Rolfe 2001).

Comunque, i modelli murini sembrano più promettenti per modellare l'infezione respiratoria da patogeni opportunisti in modo da poter comprendere l'interazione microrganismo-ospite e la eventuale rilevanza di interventi di terapia genica (Koehler et al 2003). D'altra parte, l'utilità dei topi FC nel comprendere il legame tra le mutazioni del gene CFTR e la malattia polmonare sembra più problematica: proprio recentemente risultati perlomeno contrastanti sono stati ottenuti per quanto riguarda il ruolo degli sfingolipidi (Guilbault et al 2008; Teichgraber et al 2008) e dei macrofagi (Di et al 2006; Haggie and Verkman 2007) nella patogenesi dell'infiammazione e della suscettibilità alle infezioni respiratorie. Questi risultati potrebbero essere dovuti a differenti livelli di CFTR residua nelle vie aeree e al background genetico dei topi nei diversi modelli animali impiegati (Guilbault et al 2007).

Un nuovo modello murino è stato recentemente creato mediante la sovra-espressione della subunità del canale epiteliale del sodio ENaC, il quale ricapitola alcune delle caratteristiche patologiche della FC nell'uomo (Mall et al 2004). E' importante però ricordare che i topi in questione hanno una Cftr di tipo "selvatico" e quindi il topo betaENaC dovrebbe essere usato per saggiare delle terapie che mirano a sotto-regolare l'ENaC.

Il topo dovrebbe rimanere il modello animale per uno screening iniziale per testare nuovi approcci terapeutici, grazie alla sua piccola taglia e alla possibilità di ottenerne un gran numero utile per gli esperimenti. Nel modello murino andrebbero testate alcune questioni fondamentali utili per capire la validità terapeutica dei vari approcci, ovvero il numero di cellule dell'epitelio respiratorio che dovrebbero essere corrette e il grado di espressione genica a livello di ciascuna cellula. Il 5% dei livelli normali di CFTR è sufficiente per ottenere una guarigione a livello intestinale in questi animali (Dorin et al 1996). Più recentemente, è stato dimostrato che il trapianto di midollo osseo da un topo Cftr+/+ in un topo Cftr-/-, benché determinasse un basso livello di colonizzazione delle cellule di midollo osseo a livello intestinale (0,01-0,1%) e corrispondentemente una bassa espressione di CFTR, provocava un recupero dell'attività elettrofisiologica CFTR-dipendente sia nel naso che nel retto degli animali trattati (Bruscia et al 2006), suggerendo che un basso livello di Cftr poteva causare un effetto di amplificazione benefico. Infine, è da segnalare che i modelli murini FC sono attualmente usati per comprendere i fini processi regolarori della CFTR a livello cellulare e, di conseguenza, saggiare alcuni prodotti farmaceutici che potrebbero essere usati in futuro nei pazienti FC (Carvalho-Oliveira et al 2007).

In conclusione, i dati a nostra disposizione sottolineano l'utilità dei topi con FC in alcuni aspetti correlati alla fisiopatologia ed alla terapia sperimentale della FC. Si propone che per risolvere alcune delle questioni aperte nel campo, gli studi siano fatti da ricercatori indipendenti in topi congenici (ovvero dello stesso background genetico) con gli stessi marcatori surrogati di malattia. Infine, i risultati ottenuti nei modelli animali sicuramente avranno beneficio nell'essere convalidati in modelli animali FC di grossa taglia, come i furetti (Sun et al 2008) ed i maiali (Rogers et al 2008), i quali posseggono una anatomia ed una fisiologia più prossime a quella umana.

Despite the first cystic fibrosis (CF) mouse models was generated since 1992 and today a total of thirteen CF mouse strains are available, their usefulness in the evaluation of molecular and cellular biology of CFTR (CF transmembrane condcutance regulator), pathophysiology of organ disease, surrogate end points and novel therapies is still controversial (Grubb and Boucher 1999). Anatomical and physiological reasons might be considered first. Human lungs harbor abundant submucosal glands in bronchi which mice do not, which leads to the production of fewer secretions in the murine lung than in human. CFTR mRNA levels are lower throughout murine pulmonary epithelium than in the human lung. Furthermore, experimental data indicate that Cl- secretion in murine lung is performed predominantly by an alternative Cl- channel (Rochelle et al 2000). As a consequence, none of the several mouse models produced thus far was found to develop the lung disease characteristic of CF spontaneously, although they seem to better mimic the human intestinal phenotype (Davidson and Rolfe 2001).

The modelling of respiratory infection in the mouse airways is more promising in order to understand the adaptation of bacteria to the host and the relevance of gene therapy interventions (Koehler et al 2003). On the hand, the usefulness of CF mice in understanding the link between CFTR mutations and lung disease is more problematic: contrasting results have been obtained as to the role of sphingolipids (Guilbault et al 2008; Teichgraber et al 2008) and that of macrophages (Di et al 2006; Haggie and Verkman 2007) in the pathogenesis of inflammation and susceptibility to respiratory infection. These results are likely due to the different levels of residual CFTR in the airways and genetic backgound of mice (Guilbault et al 2007). Even if a new mouse model has been recently created by over-expression of the subunit of epithelial sodium channel (ENaC), which recapitulates some of the pathological features of CF in humans (Mall et al 2004), we should not forget that Cftr is still in its native status. Thus, the beta-ENaC mouse might be considered as a valid model for considering therapies aimed to down-regulate ENaC.

For initial screening of novel therapeutic interventions, the mouse is the preferred animal model, due to its small size and usefulness to obtaining large experimental numbers. CF mice can be used to address specific questions, such as the number of cells in the respiratpry epithelium to be targeted in order to obtain a clinically meaningful therapeutic response, as well as the level of mRNA/protein expression to be attained in each cell. A study using mouse models suggested that 5% of normal levels of CFTR is sufficient to rescue the intestinal phenotype apparent in these animals (Dorin et al 1996). Upon transplantion of Cftr+/+ bone marrow cells into Cftr-/- mice, despite very low levels of engraftment (0.01-0.1%) were observed in the gut, correlating with very low CFTR mRNA expression, the bioelectric profile of CF mice was significantly improved in both gut and nose (Bruscia et al 2006), implying that a very low level of Cftr expression produced an amplified electrophysiological effect. Finally, CF mice are being used to elucidate regulation of cellular processes in CF and consequently test some pharmacological drugs that can later be used in CF patients (Carvalho-Oliveira et al 2007).

In summary, currently available data underline the usefulness of CF mice in selected issues related to pathophysiology and gene and cell therapy. It is proposed that studies with CF mice should be validated in homogeneously genetic background models and using the same surrogate end points by different independent researchers prior to be transferred to humans. Finally, results obtained in CF mice will benefit from the generation of large animal models, such as ferrets (Sun et al 2008) and pigs (Rogers et al 2008), with anatomy and physiology more similar to humans...

References

Bruscia E, Price JE, Cheng E-C, et al. 2006. Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 2965-2970.

Carvalho-Oliveira I, Scholte BJ, Penque D 2007. What have we learned from mouse models for cystic fibrosis? Expert Rev Mol Diagn, 7: 407-17.

Davidson DJ, Rolfe M 2001. Mouse models of cystic fibrosis. Trend Genet, 17: S29-S37.

Di A, Brown ME, Deriy LV, et al. 2006. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. Nat Cell Biol, 8: 933-944.

Dorin JR, Farley R, Webb S, et al. 1996. A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction. Gene Therapy, 3: 797-801.

Grubb BR, Boucher RC 1999. Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. Physiol. Rev., 79: S193-S214.

Guilbault C, De Sanctis JB, Wojewodka G, et al. 2008. Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol, 38: 47-56.

Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, et al. 2007. Cystic fibrosis mouse models. Am J Respir Cell Mol Biol, 36: 1-7.

Haggie PM, Verkman AS 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent phagosomal acidification in macrophages. J Biol Chem, 282: 31422-8.

Koehler DR, Sajjan U, Chow Y-H, et al. 2003. Protection of Cftr knockout mice from acute lung infection by a helper-dependent adenoviral vector expressing Cftr in airway epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 15364-15369.

Mall M, Grubb BR, Harkema JR, et al. 2004. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med, 10: 487-493.

Rochelle LG, Li DC, Ye H, et al. 2000. Distribution of ion transport mRNAs throughout murine nose and lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279: L14-24.

Rogers CS, Hao Y, Rokhlina T, et al. 2008. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. J Clin Invest, 118: 1571-1577.

Sun X, Yan Z, Yi Y, et al. 2008. Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets. J Clin Invest, 118: 1578-1583.

Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, et al. 2008. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. Nat Med, 14: 382-91.

Modelli animali di fibrosi cistica
Infiammazione e rimodellamento tissutale nel topo mutante CF.
Animal models of CF
Inflammation and tissue remodelling in CF mutant mice.

Bob J Scholte[1], MD
with the collaboration of
J. Aarbiou[1], R Buijs-Offerman[1], M Wilke[2]

[1]Erasmus Medical Center,
department of [1]Cell biology,
[2]Biochemistry (Rotterdam, The Nederlands)

Il Dr Bob J Scholte ha una posizione di staff (professore associato/group leader) al dipartimento di Biologia cellulare del Centro Medico Erasmus di Rotterdam. Dal 1988 si è impegnato presso l'Erasmus MC nel campo della fibrosi cistica e della terapia genica, come componente del gruppo di lavoro EMC CF. Tra i contributi generali in questo campo vi sono lo sviluppo e la caratterizzazione di un modello unico di fibrosi cistica basato sul topo *Cftrtm1eur* portatore della mutazione CF più frequente, la F508del. Il gruppo di Scholte è coinvolto nello studio della patologia polmonare CF in questo modello murino e nell'uso della terapia genica in tale contesto. Nel campo della terapia genica il Dr Scholte ed il suo team hanno contribuito allo sviluppo di sistemi di trasferimento genico basati su Lentivirus, in collaborazione con parecchi gruppi sia all'interno che all'esterno dell'Erasmus Medical Center.

Obiettivi clinici attualmente oggetto di studio sono la malattia di Crigler-Najiar (difetto di coniugazione della bilirubina, fegato), la malattia di Pompe (malattia dei depositi lisozomici, midollo osseo) e l'epatite C (colpire l'infezione virale attraverso shRNA, perfusione di organi trapiantati) e la fibrosi cistica (applicazioni di vettori lentivirali, RNAj). In collaborazione con il prof Feiters (Università di Nimega, chimica organica), si sta sviluppando e testando su modelli di vie aeree una nuova linea di sistemi di tranfer genico basati su una nuova linea di lipopeptidi. Il Dr Scholte è attualmente contrattista e leader di gruppo del progetto "Migliorata precisione della terapia della CF con acidi nucleici", finanziato da EEC.

Dr Bob J Scholte holds a staff position (associate professor/group leader) at the Cell biology department of the Erasmus Medical Center Rotterdam, the Netherlands (EMC, Institute Head Prof Dr Frank Grosveld). Since 1988 he is involved at the Erasmus MC in the fields of Cystic Fibrosis and gene therapy, as one of the group leaders of the EMC CF workgroup. Among the general contributions in this field, are the development and characterization of a unique mouse model of cystic fibrosis (Cftrtm1eur) that carries the most frequent CF mutation F508del. The group of Scholte is involved in a study of CF lung pathology in this mouse model, and the use of gene therapy in this context. In the field of gene therapy Dr Scholte and his team contribute to the development of lentiviral and non-viral gene transfer systems, in collaboration with several groups inside and outside the EMC.
Clinical targets presently under study are Crigler-Najjar disease (Bilirubin conjugation deficiency, liver), Pompe Disease (Lysosomal storage disease, bone marrow), Hepatitis C (shRNA targeting viral infections, perfusion of transplanted organs) and Cystic Fibrosis (application of lentiviral vectors, RNAi). In collaboration with Prof Feiters (Nijmegen university, organic chemistry), a new line of lipo-peptide based gene transfer systems is developed and tested in airway models.

Dr Scholte is presently contractor and workgroup leader of the EEC funded project 'Improved precision of nucleic acid therapy of CF' (Coordinator J Rosenecker, Muenchen). This work-package involves testing gene- and RNAi transfer to airways in a CF mouse model (2 fte three year). Further he is workpackage leader (WP6 Animal models) of the European concerted action for Cystic Fibrosis (EUROCARECF). Activities include maintenance and distribution of CF mutant mice, organizing training and workshop sessions.

I modelli animali sono stati strumentali allo sviluppo delle nostre conoscenze sulla patologia CF, e rappresentano una utile piattaforma per testare interventi terapeutici sperimentali. Sono disponibili oggi almeno tredici differenti ceppi di topi geneticamente modificati, che portano o l'allele CFTR null (assenza della sequenza genica, ndr) o una delle più rilevanti mutazioni CFTR specifiche (F508del, G551D). Il programma EUROCARECF/Animal models supporta la distribuzione di coppie per la riproduzione derivate dal ceppo murino Cftrtm1eur e dal ceppo null Cftrtm1cam. In aggiunta ai ceppi murini recanti le mutazioni CFTR, il gruppo del North Carolina ha presentato un modello alternativo di patologia polmonare CF che si caratterizza per la sovraespressione della subunità alfa del canale apicale del sodio (tgCC10/ENACa). In questa presentazione mi focalizzerò sull'attivazione cronica delle sequenze infiammatorie nel topo mutante CF e sulla possibile relazione con l'eccesso di rimodellamento tissutale nella malattia polmonare CF a seguito di una lesione.

La malattia polmonare cronica nella fibrosi cistica, e similmente nell'asma, nella COPD e nella IFP, è caratterizzata da un rimodellamento tissutale irreversibile e col tempo fatale. Non è attualmente disponibile un trattamento o un intervento preventivo efficace. La complessa rete molecolare di signaling delle cellule, che porta alla stenosi delle vie aeree, alla metaplasia epiteliale in un adattamento del letto vascolare, e la sua relazione con l'infiammazione è ancora oggetto di intensa ricerca. Nel nostro laboratorio, l'analisi array mediante PCR quantitativa, coadiuvata dall'immunoistologia e dall'ibridazione in situ, ha identificato per la prima volta parecchi geni coinvolti nell'infiammazione e nel rimodellamento tissutale che sono sovraregolati nel topo mutante F508del, sia prima che dopo la lesione. Il tipo di espressione genica osservato nel topo mutante F508del in assenza di insulto polmonare è compatibile con quello dell'infiammazione cronica, molto probabilmente mediato dal sistema infiammasoma/IL-1B. Questo tipo di espressione genica include la sovraregolazione di alcuni morfogeni che si sa essere coinvolti nel meccanismo di danno/riparazione e nella morfogenesi, ma non implicati in precedenza nella malattia polmonare CF. Questo studio supporta l'opinione che la condizione CF comporti di per sé infiammazione polmonare cronica, anche in assenza di patogeni, ciò che di conseguenza promuove nel polmone CF un rimodellamento tissutale a seguito di una lesione, attraverso l'iperattivazione di sequenze correlate di fattori di crescita.

In realtà, mentre i modelli murini si rivelano molto utili, essi tuttavia hanno chiaramente delle limitazioni come modello per la malattia polmonare umana. E' pertanto di grande importanza segnalare i recenti progressi verso i modelli di maiale e di furetto in elaborazione da parte dei gruppi di John Engelhard e di Michael Welsh dell'Iowa.

Animal models have been instrumental in advancing our understanding of CF pathology, and present a useful platform for testing experimental therapeutic interventions. At least thirteen different strains of genetically modified mice are available, carrying either a CFTR null allele or one of the most relevant specific CFTR mutations (F508del, G551D). EUROCARECF/Animal models supports distribution of breeding pairs from the F508del Cftrtm1eur strain, and the Cftrtm1cam null strain. In addition to mouse strains carrying CFTR mutations, the North Carolina group has presented an alternative model of CF lung pathology that features over expression of the apical sodium channel alpha subunit (tgCC10/ENACa). In this presentation we will focus on chronic activation of inflammatory pathways in CF mutant mice, and the possible relationship with excessive tissue remodeling upon injury in CF lung disease.

Chronic lung disease in Cystic Fibrosis, and likewise in Asthma, COPD and IPF, is characterized by irreversible, and eventually fatal tissue remodeling. Treatment or effective preventive intervention is not available. The complex molecular network of cell signaling that drives airway stenosis, epithelial metaplasia en vascular bed adaptation, and its relationship with inflammation is still the subject of intense investigation. Quantitative PCR array analysis supported by immunohistology and in situ hybridization in our lab identified for the first time several genes involved in inflammation and tissue remodeling that are upregulated in F508del mutant mice, both before and after injury. The pattern of gene expression observed in unchallenged F508del mutant mice is consistent with chronic inflammation, most likely mediated by the inflammasome/IL-1B system. This expression pattern includes upregulation of several morphogens known to be involved in tissue injury/repair and morphogenesis, but not previously implicated in CF lung disease. This study supports the view that the CF condition results in chronic lung inflammation, also in the absence of pathogens, which subsequently promotes tissue remodeling upon injury in the CF lung though the hyper activation of specific growth factor related pathways.

While mouse models are very useful indeed, they clearly have limitations as a model for human lung disease. It is of great importance therefore to note the recent progress towards Pig and Ferret CF models by the teams of drs. John Engelhard and Michael Welsh of Iowa.

Infiammazione e risposta all'amiloride nel topo transgenico che esprime in eccesso il gene beta-ENaC.

Inflammation and amiloride response in beta-ENaC overexpressing mice.

Zhe Zhou[1], PhD
with the collaboration of
Diana Treis[1], Susanne Schubert[1],
Maria Harm[1], Jolanthe Schatterny[1],
Stephanie Hirtz[1], Julia Duerr[1],
Richard C. Boucher[2], Marcus A. Mall[1]

[1]Pediatric Pulmonology and Cystic Fibrosis Center,
Department of Pediatrics III,
University of Heidelberg, Heidelberg, Germany;
[2]Cystic Fibrosis/Pulmonary Research
and Treatment Center, School of Medicine,
The University of North Carolina at Chapel Hill,
USA

Zhe Zhou, giovane ricercatrice, laureata in biologia all'università di Tuebingen (Germania), ha fatto le sue prime esperienze professionali presso il Beijing Union Hospital in Cina e da alcuni anni è attiva presso la divisione di Pneumologia e Centro Fibrosi Cistica dell'ospedale universitario pediatrico di Heidelberg (Germania). Zhe Zhou ha attivamente collaborato con i gruppi di M. Mall in Heidelberg e di RC Boucher in Chapel Hill (USA) nell'utilizzo di un topo transgenico che sovraesprime il canale epiteliale beta del sodio.

Zhe Zhou is a young researcher graduated at the University of Tuebingen (Germany) working at present with doctor M. Mall at the division of Pulmonology and Cystic Fibrosis Center of the University Children's Hospital of Heidelberg. Zhe Zhou actively collaborated with the groups led by M. Mall in Heidelberg and RC Boucher in Chapel Hill (USA) in the experimental use of a beta-epithelial Na+ channel-overespressing mice.

L'aumentato riassorbimento di sodio è una anomalia caratteristica nella patogenesi della malattia polmonare in fibrosi cistica (CF). Noi abbiamo precedentemente dimostrato che imitando l'iperassorbimento di Na+ con la sovraespressione di betaENaC nelle vie aeree del topo si otteneva una deplezione del volume di liquido di superficie nelle vie aeree, con elevata mortalità da cause polmonari, nonché formazione di tappi di muco, metaplasia delle cellule caliciformi e infiammazione cronica delle vie aeree nei topi transgenici betaENaC (betaENaC-Tg) che sopravviveva [1]. Nel presente studio noi abbiamo usato topi betaENaC-Tg per testare se l'inibizione dell'aumentato assorbimento di Na+ mediante il classico bloccante ENaC, l'amiloride, avesse effetti terapeutici sulla malattia polmonare CF-simile in vivo. Specificamente, abbiamo determinato gli effetti dell'intervento di blocco "precoce" e "tardivo" sulla mortalità, sull'ostruzione da muco delle vie aeree, sull'infiammazione, incominciando il trattamento intrapolmonare con amiloride nei topi betaENaC-Tg sia alla nascita, cioè prima dell'inizio della malattia polmonare, sia dopo che l'ostruzione da muco e l'infiammazione si erano stabilite. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo trattato con instillazione intranasale di amiloride (10 mmol/l; 1 microlitro/g di peso corporeo, tre volte al giorno) o con veicolo soltanto (acqua), per un periodo di 14 giorni, topi betaENaC e topi controllo di tipo selvaggio, neonati, di 5 giorni, o di 4 settimane. Successivamente, i topi venivano eutanizzati, si praticava un lavaggio broncoalveolare (BAL) e i polmoni venivano quindi trattati per gli esami istologici.

Abbiamo così dimostrato che l'amiloride preventiva riduceva significativamente la mortalità da causa polmonare quando la terapia era iniziata nei topi betaENaC-Tg neonati. Inoltre, il trattamento precoce con amiloride riduceva significativamente il contenuto di muco nelle vie aeree, la necrosi epiteliale, il numero di cellule caliciformi

e gli eosinofili nel BAL in comparazione con in topi CF betaENaC-Tg trattati con il solo veicolo. Al contrario, la terapia con amiloride non dava beneficio sull'ostruzione da muco delle vie aeree, sulla metaplasia delle cellule caliciformi o sull'infiammazione, se il trattamento veniva iniziato nei topi betaENaC-Tg al quinto giorno di vita o a 4 settimane di vita con malattia polmonare già stabilita.

Presi insieme, i nostri risultati sono coerenti con precedenti studi sull'uomo, in cui l'amiloride mancava di beneficio terapeutico nei pazienti CF con malattia polmonare già stabilita, e dimostrano che la precoce inibizione dell'iperassorbimento di sodio è una terapia efficace per la malattia polmonare CF-simile in vivo. Questi risultati richiedono una valutazione di derivati dell'amiloride più potenti e di più lunga durata di azione su topi con malattia polmonare cronica ma anche una valutazione clinica della terapia preventiva con farmaci ENaC bloccanti in trial clinici sull'uomo.

Questa ricerca è stata supportata da CFF (MALL04G0) e da EC (MEXT-2004-013666)

Sommario sulle ricerche in corso

La malattia polmonare cronica rimane il principale fattore che contribuisce alla morbilità e mortalità nei pazienti con fibrosi cistica. Ad oggi, nessun trattamento è disponibile per prevenire o trattare efficacemente la malattia polmonare CF. Gli epiteli delle vie aeree nel malato CF presentano un caratteristico difetto di trasporto ionico, che si compone di un aumentato assorbimento di sodio (aumentata attività dei canali epiteliali del sodio, ENaC) e di difettosa secrezione di cloro cAMP-dipendente (mancanza di canali del cloro CFTR). Attraverso una sovraespressione specifica di betaENaC nelle vie aeree dei topi noi abbiamo recentemente dimostrato che l'aumentato assorbimento di sodio nelle vie aeree è sufficiente a causare una malattia polmonare simil-CF in vivo [1]. Nei nostri studi correnti noi usiamo il topo che sovraesprime betaENaC per la valutazione preclinica in vivo di nuove strategie terapeutiche per la malattia polmonare CF. I nostri approcci attuali includono il miglioramento dell'idratazione delle vie aeree attraverso la modulazione del trasporto ionico epiteliale, l'inibizione dell'infiammazione delle vie aeree e l'inibizione della ipersecrezione di muco. Noi stiamo valutando gli effetti di questi trattamenti, con varie modalità, sull'ostruzione da muco e sull'infiammazione delle vie aeree nei topi che sovraesprimono betaENaC. Il nostro obiettivo generale è che i risultati delle nostre ricerche possano essere trasferiti in trial clinici sull'uomo e portino allo sviluppo di una terapia farmacologica efficace per la malattia polmonare CF.

Increased airway Na+ absorption is a characteristic abnormality in the pathogenesis of cystic fibrosis (CF) lung disease. We have previously demonstrated that mimicking Na+ hyperabsorption by overexpression of betaENaC in mouse airways results in airway surface liquid volume depletion and reduced mucus clearance causing a spontaneous CF-like lung disease with high pulmonary mortality, and airway mucus plugging, goblet cell metaplasia and chronic airway inflammation in surviving betaENaC-transgenic (betaENaC-Tg) mice (Mall et al., Nature Med.10:487, 2004). In the present study, we used betaENaC-Tg mice to test if inhibition of increased airway Na+ absorption by the classic betaENaC blocker amiloride has therapeutic effects on CF-like lung disease in vivo. Specifically, we determined the effects of 'early' and 'late' ENaC blocker intervention on mortality, airway mucus obstruction and inflammation by starting intrapulmonary amiloride therapy in ENaC-Tg mice either at birth, i.e. prior to the onset of lung disease, or after mucus obstruction and inflammation had established. To achieve this goal, newborn, 5 day, or 4 week old ENaC-Tg mice and wild-type littermate controls were treated by intranasal instillation of amiloride (10 mmol/l; 1µl/g body weight, tid) or vehicle (H2O) alone for a period of 14 days. Subsequently, mice were euthanized, bronchoalveolar lavage (BAL) performed, and lungs processed for histology.

We show that preventive amiloride significantly reduced pulmonary mortality when therapy was started in newborn ENaC-Tg mice. Further, early amiloride treatment significantly reduced airway mucus content, epithelial necrosis, goblet cell numbers, and BAL eosinophils compared to vehicle treated ENaC-Tg mice CF. In contrast, amiloride therapy had no benefits on airway mucus obstruction, goblet cell metaplasia or inflammation, if treatment was started in 5 day, or 4 week old ENaC-Tg mice with established lung disease.

Taken together, our results are consistent with previous human studies where amiloride lacked therapeutic benefits in CF patients with established lung disease, and demonstrate that early inhibition of Na+ hyperabsorption is an effective therapy for CF-like lung disease in vivo. These results warrant an evaluation of more potent and longer acting amiloride derivatives in chronic lung disease in mice, and a clinical evaluation of preventive ENaC blocker therapy in human trials. Supported by CFF (MALL04G0) and EC (MEXT-2004-013666).

Summary of Current Research:

Chronic lung disease remains the major factor contributing to morbidity and mortality in cystic fibrosis patients. To date no treatment is available to prevent or treat cystic fibrosis lung disease effectively. Cystic fibrosis airway epithelia exhibit a characteristic ion transport defect, which is composed of increased sodium absorption (increased activity of epithelial sodium channels; ENaC) and deficient cAMP-dependant chloride secretion (lack of CFTR chloride channels). By airway-specific overexpression of ENaC in mice we have recently demonstrated that increased airway sodium absorption is sufficient to cause a cystic fibrosis-like lung disease in vivo (Mall M et al. 2004). In our current research, we use the ENaC overexpressing mouse for pre-clinical in vivo evaluation of novel therapeutic strategies for cystic fibrosis lung disease. Our current approaches include the improvement of airway surface hydration by modulation of epithelial ion transport, inhibition of airway inflammation, and inhibition of mucus hypersecretion. We evaluate the effects of these treatment modalities on mucus obstruction and airway inflammation in ENaC overexpressing mice. Our overall goal is that the results of our research will be translated into clinical trials in humans and lead to the development of an effective pharmacotherapy for cystic fibrosis lung disease.

References

1. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na+ absorption
produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med. 2004 May;10(5):487-93.

2. Mall MA, Harkema JR, Trojanek JB, Treis D, Livraghi A, Schubert S, Zhou Z, Kreda SM, Tilley SL, Hudson EJ, O'Neal WK, Boucher RC. Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na+ channel-overexpressing mice. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Apr 1;177(7):730-42.

3. Mall MA. Role of Cilia, Mucus, and Airway Surface Liquid in Mucociliary Dysfunction: Lessons from Mouse Models. J Aerosol Med. 2008 Jan 16

Conclusioni.
Prospettive applicative di modelli animali in ricerca CF.
Practical perspectives on the use of animal models in CF research.

Giulio Cabrini, M

Laboratory of Molecular Pathology
Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology
University Hospital of Verona, Verona

Giulio Cabrini è Responsabile del Laboratorio di Patologia Molecolare presso il Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia della Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, diretto dal Dr. P. Rizzotti. Una larga parte dei suoi interessi scientifici è stato speso nel campo della fibrosi cistica. Oltre ad alcune osservazioni sui modelli di attivazione alternativa della funzione della proteina CFTR, sulla patologia molecolare delle mutazioni nonsenso del gene CFTR, su vettori virali per il trasferimento del gene, il principale campo di interesse è stato la risposta immunitaria innata in modelli respiratori di fibrosi cistica, sia come risultato delle interazioni di patogeni virali o batterici con le cellule respiratorie sia in relazione al difetto di base, anche studiando il segnale transmembrana e la regolazione della trascrizione di geni pro-infiammatori. Attualmente coordina il suo gruppo nella identificazione di nuove molecole rivolte a ridurre gli effetti indesiderati del processo infiammatorio nei polmoni di pazienti affetti da fibrosi cistica, in collaborazione con diversi gruppi di ricerca internazionali.

Giulio Cabrini holds a position of group leader at the Laboratory of Molecular Pathology (Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology of the University Hospital of Verona, Italy). A large part of his scientific interests have been spent in the field of cystic fibrosis. Besides seminal observations on alternative models of CFTR function regulation, on the molecular pathology of CFTR mutations, with special regards to nonsense mutations, on viral vectors for the transfer of the CFTR gene, the major field of interest has been the pulmonary innate immune response in CF, either as a result of viral and bacterial host-pathogen interactions and in relation to CFTR basic defect, also by exploring the membrane signal transduction and the transcriptional regulation of pro-inflammatory genes. He is presently running his group in the identification of novel molecules aimed to reduce the adverse effects of the inflammatory process in the lung of the patients affected by CF, in collaboration with different international research groups.

La disponibilità di modelli animali in grado di estendere i risultati di esperimenti effettuati in cellule coltivate in vitro, prima di passare a verifiche in sperimentazioni cliniche sui pazienti, è tuttora un punto critico nel campo della ricerca sulla fibrosi cistica, sia per la comprensione dei meccanismi della patologia che per identificare nuove terapie. Poiché gli studi in vitro stanno proponendo diverse nuove molecole a potenziale effetto terapeutico (per correggere o potenziare la proteina CFTR mutata, per regolare la funzione di altri canali ionici o trasportatori coinvolti in questa patologia, per eradicare la infezione batterica o per circoscrivere gli effetti dannosi del processo infiammatorio polmonare) la limitata disponibilità di modelli animali rischia di divenire in un prossimo futuro un collo di bottiglia nello svolgimento della ricerca.

Una rassegna della letteratura nel campo della fibrosi cistica evidenzia che sono stati pubblicati negli ultimi 5 anni 409 articoli utilizzanti modelli animali (257 in USA e Canada, 110 in Europa e 42 in altri Paesi). Dei 110 lavori scientifici pubblicati da gruppi europei, 27 erano stati condotti in Germania, 23 in Francia, 20 in Gran Bretagna, 11 in Danimarca, 7 in Italia, 7 in Olanda, 5 in Belgio, 4 in Svezia, 2 in Spagna, 2 in Svizzera, 1 in Polonia ed 1 in Ungheria. Sembra quindi chiaro che i modelli animali non sono molto utilizzati da ricercatori italiani, anche se diverse linee sperimentali su nuove molecole in vitro sono in corso anche in Italia.

Per anticipare le necessità emergenti di risorse per la ricerca sperimentale, la Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica ha chiesto recentemente ai ricercatori italiani di delineare le prospettive di ricerca in corso e formulare raccomandazioni riguardanti risorse e tecnologie necessarie. I risultati di questa inchiesta verranno presentati (vedere appendice).

Si anticipa qui che la necessità di una Struttura Centralizzata sui Modelli Animali è una necessità emergente, che vede nella nostra realtà attuale scarsità sia di strutture che di esperienza. Avvantaggiandosi della presenza in questo Workshop di esperti europei, le conclusioni mireranno a schematizzare i principali aspetti scientifici riguardanti la scelta dei modelli animali appropriati per le differenti necessità sperimentali e a delineare uno schema di lavoro per costituire una Struttura Centralizzata per i Modelli Animali allo scopo di far progredire in maniera ottimale i progetti di ricerca in corso.

The availability of animal models suitable to fill the gap between in vitro experimental approaches and clinical trials in patients affected by CF is still a key issue in CF research, both to understand CF pathology and to test new therapeutic avenues. As novel molecules aimed a) to correct or potentiate the mutant CFTR protein, b) to regulate the function of other ion channel/transporters involved in CF pathophysiology, c) to eradicate lung bacterial infection or d) to modulate the inflammatory process are presently emerging from in vitro studies, the limitation of CF animal models is likely to become in the near future a major bottleneck.

An overview of the literature in the CF field is outlining that, in the last 5 years, 409 papers employing mice as animal model have been published. 257 papers have been published by groups based in USA and Canada, 110 in Europe and 42 in other countries. Of the 110 European papers, 27 studies were carried out in Germany, 23 in France, 20 in the United Kingdom, 11 in Denmark, 7 in Italy, 7 in the Netherlands, 5 in Belgium, 4 in Sweden, 2 in Spain, 2 in Swiss, 1 in Poland and 1 in Hungary. Based on this survey there are few doubts that the use of animal models by Italian investigators on CF is not an integral part of their experimental pipeline, although lines of investigation on candidate therapeutic molecules are ongoing also in Italy.

To anticipate these resource needs for research, the Italian CF Research Foundation asked scientists around the country to identify scientific trends and make recommendations concerning resources and technologies. The results of this census will be presented. It is anticipated here that the availability of an Animal Core Facility is an emerging need, which faces in our country a scarcity of both expertise and lab structures. Taking advantage of the European experts that will introduce and attend the Workshop, conclusions will focus on the major scientific issues relevant to choose the appropriate animal model for the different research plans (advantages, limitations and suitability of the different animal models available in the International CF community) and on sketching a practical working agenda to build an Animal Core Facility for CF aimed to help ongoing research projects.

Appendice

INCHIESTA SULL'IMPIEGO DI MODELLI ANIMALI TRA I RICERCATORI ITALIANI IN FIBROSI CISTICA

(Condotta da Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel febbraio 2008)

Risultati censimento
Al censimento hanno risposto 47 ricercatori su 68 interpellati (69%). I ricercatori interpellati erano principal investigators di uno o più progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica negli ultimi 7 anni.

I risultati evidenziano che in passato il 91% (43/47) dei ricercatori non ha fatto uso di modelli animali, mentre solo il 9% (4/47) ha utilizzato modelli animali per gli studi. Il 53% (25/47) dei ricercatori prevede di utilizzare modelli animali in futuro per i loro studi, mentre il rimanente 47% (22/47) non ha in previsione l'utilizzo di animali.

Strutture e mantenimento animali
Il censimento evidenzia che in Italia esistono 16 gruppi di ricerca, attivi in fibrosi cistica, che hanno strutture per l'utilizzo di modelli animali. Nella maggior parte dei casi (14 strutture) si tratta solo di stabulari per mantenimento di animali in SPF (pathogen free conditions). Solo due gruppi di ricerca (Bragonzi, Di Bonaventura) sottolineano la presenza di una stanza P2 necessaria per la manipolazione di patogeni opportunisti (P. aeruginosa) ed idonea per condurre infezioni in modelli animali. Un gruppo (Loi) possiede topi transgenici CF nel proprio stabulario e documenta una specifica esperienza con questi animali (5 papers). Un gruppo (Bernasconi) ha stabilito una collaborazione con un gruppo esterno (Maiuri) che dichiara di avere topi CF e beta-ENaC ma non possiede alcuna documentata esperienza con questi animali (non papers).

Esperienza
Il 91% (43/47) dei ricercatori in Italia non ha nessuna esperienza nell'utilizzo di modelli animali e solo il 9% (4/47) hanno esperienza. L'esperienza nell'utilizzo di animali è documentata da 3 ricercatori su 4 (Bragonzi, Conese, Loi) e spazia nel campo dell'infezione (9 papers), terapia genica (11 papers), stem cells (3 papers) e infiammazione (2 papers).

Questo risultato sottolinea che non tutti i ricercatori che hanno possibilità di accesso ad uno stabulario (16 ricercatori) ne fanno uso (4 ricercatori). Per 4 ricercatori (Ballerini, Del Porto, Guarino, Romano) il mancato utilizzo della struttura è dovuto al fatto che i loro progetti non prevedono l'utilizzo di modelli animali mentre 8 (Battistoni, Bernasconi, Castaldo, Gambari, Melloni, Quaglia, Venturi, Visca) non hanno esperienza nel gestire modelli animali. 25 ricercatori prevedono in futuro di utilizzare modelli animali per i loro progetti ma solo 4 hanno stabulario ed esperienza. Dei rimanenti 21 ricercatori, 3 (Bernasconi, Bertoni, Bevivino) hanno stabilito collaborazioni con gruppi che hanno accesso a stabulari e modelli animali, i rimanenti 18 ricercatori non hanno al momento stabilito collaborazioni ufficiali con strutture che possano eseguire gli esperimenti.

Suggerimenti
13 ricercatori sottolineano l'esigenza di una struttura centralizzata che possa fornire modelli animali e competenze per operare su di essi.

Pubblicazioni basate su modelli animali CF - ultimi 5 anni
Parallelamente all'inchiesta, è stata condotta una breve ricerca bibliografica per verificare l'utilizzo di modelli animali in fibrosi cistica negli ultimi 5 anni da parte di ricercatori attivi in diversi paesi (Europa, USA, Canada ed altro).

Negli ultimi 5 anni sono stati pubblicati 409 lavori che includono l'utilizzo di modelli animali CF.
257 lavori (63%) sono stati pubblicati in Canada ed USA, 110 lavori (27%) in Europa e 42 lavori (10%) in altri paesi.
Delle 110 pubblicazioni europee, 27 studi (24,5%) sono stati condotti in Germania, 23 studi (21%) in Francia, 20 studi (18,1%) in UK, 11 studi (10%) in Danimarca, 7 studi (6,4%) in Italia, 7 studi (6,4%) in Olanda, 5 studi (4,6%) in Belgio, 4 (3,6%) in Svezia, 2 (1,8%) in Spagna, 2 (1,8%) in Svizzera, 1(0,9%) in Polonia e 1 studio (0,9%) in Ungheria. In base a questi risultati si evidenzia che l'utilizzo di modelli animali per la ricerca sulla fibrosi cistica non sia una parte integrante della ricerca italiana in fibrosi cistica.

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

presso Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona
Codice fiscale: 93100600233

Consiglio di Amministrazione
Presidente Vittoriano Faganelli
Vicepresidente Matteo Marzotto
Consiglieri: Luigi Bozzini, Donato Bragantini, Paolo Del Debbio, Sandro Caffi, Giuseppe Ferrari, Annamaria Giunta, Gianni Mastella, Gianluca Rana, Sergio Ricciardi, Michele Romano, Luciano Vettore

Direzione scientifica
Direttore scientifico Gianni Mastella

Comitato di consulenza scientifica
Presidente Antonio Cao
Consulenti: Giorgio Berton, Roberto Buzzetti, Gerd Doering, Lucio Luzzatto, Nello Martini

Presidente
VITTORIANO FAGANELLI

Vicepresidente
MATTEO MARZOTTO

Direttore Scientifico
GIANNI MASTELLA

Presidente Comitato Scientifico
ANTONIO CAO

SERVIZI FFC

Segreteria (G. Cadoni)
Tel. 045 8123438 - Fax 045 8123568
fondazione.ricercafc@azosp.vr.it

Amministrazione e Tesoreria (E. Fabietti)
Tel. 045 8123597

Direzione Scientifica (G. Mastella)
Tel. 045 8123567 - Cell. 347 6287890
gianni.mastella@azosp.vr.it

Comunicazione
(T. Zarantonello, M. Cevese)
Tel. 045 8123599-3438 - Cell. 348 6868753
comunicazione.ffc@azosp.vr.it
Divulgazione scientifica (G. Borgo)
Tel. 045 8123605 - documentazione.ffc@azosp.vr.it
Ufficio Stampa (P. Adami)
patrizia@clabcomunicazione.it

Eventi/Fund-raising
(S. Aldrighetti, J. Bianchetti)
Tel. 045 8123604-3599 - marketing.ffc@azosp.vr.it

Rapporti con Delegazioni e Gruppi FFC
(M. Giacopuzzi, A. Milanesi)
Tel. 045 8123604-3605 - marketing.ffc@azosp.vr.it

Sito internet:
www.fibrosicisticaricerca.it

PER DONAZIONI E VERSAMENTI

- **c/c postale n. 18841379**
- **Bonifico Unicredit Banca: IT 03 N 02008 11718 000009465517**
- **Bonifico Banco Popolare di Verona: IT60V0518811708000000048829**
- **On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it**

Le donazioni sono deducibili fino al 10% del reddito complessivo e comunque non oltre 70.000 euro/anno (art. 14 legge n. 80/2005)

Progetto grafico: Federica Negroni
Disegno copertina: Saba Ferrari *"Cogli i frutti della ricerca"*
Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello
Stampato in maggio 2008 da Tipolitografia Artigiana - S. Giovanni Lupatoto (VR)

fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus

Italian Cystic Fibrosis Research Foundation

www.fibrosicisticaricerca.it