Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

XII SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri della ricerca in fibrosi cistica

- **Terapie mutazioni-mirate**
- ***Task force for cystic fibrosis***
- **Infiammazione polmonare**
- **Infezione polmonare**

Verona, 17 maggio 2014

Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello
In copertina: acquerello su carta di Saba Ferrari "Vorrei..." 2014
Grafica e impaginazione: Federica Negroni
Stampato nel maggio 2014 da Tipografia Artigiana - San Giovanni Lupatoto (VR)

Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

XII SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri nella ricerca in fibrosi cistica

Terapie mutazioni-mirate

•

Task force for cystic fibrosis

•

Infiammazione polmonare

•

Infezione polmonare

Verona, Polo Didattico "Zanotto", Università di Verona
17 maggio 2014

Sommario

Presentazione Pag. 3
Graziella Borgo

A che punto siamo con gli studi clinici sulle terapie mutazioni-mirate Pag. 5
Cesare Braggion

***Task Force for Cystic Fibrosis (TFCF)*:**
nuovi correttori e potenziatori di F508del-CFTR Pag. 10
Luis Galietta

Gli aspetti più promettenti degli studi sull'infiammazione polmonare in FC Pag. 15
Luigi Maiuri

Novità nelle strategie di cura dell'infezione polmonare in FC Pag. 20
Giovanni Taccetti

Presentazione

Graziella Borgo
(Vice Direttore Scientifico
Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

I temi scelti per il XII Seminario di Primavera appartengono a tre aree di ricerca fondamentali in fibrosi cistica: la terapia del difetto di base, l'infiammazione polmonare, l'infezione polmonare. Sono temi di ampio respiro, in cui gli avanzamenti ottenuti (soprattutto nel primo caso) sono estremamente importanti. Vogliamo affrontarli per far capire che cosa si muove, quali prospettive si delineano nel mondo della ricerca internazionale e come si colloca il contributo della ricerca FFC in questo percorso.

Il primo tema: **il difetto di base è curabile**, questa è la scoperta sensazionale di questi ultimissimi anni. Si possono progettare farmaci capaci di far funzionare la proteina geneticamente difettosa, purché sia collocata sulla membrana cellulare: il "potenziatore" Kalydeco sta allargando la sua portata d'azione. Non sono molte le mutazioni trattabili, ma importante è la "prova di concetto" che il farmaco ha fornito. Più difficile trattare il difetto quando la proteina CFTR è alterata nelle fasi iniziali di sintesi e maturazione all'interno della cellula: è il caso della più comune mutazione, la DF508. Non abbiamo ancora "correttori" ideali e tutto il mondo scientifico li sta cercando. La competizione è elevatissima, ed è un bene che lo sia perché può accelerare il raggiungimento dell'obiettivo. Si poteva anche stare a vedere e aspettare che "i soliti americani" venissero a raccontarci i loro risultati. FFC ha ritenuto invece opportuno partecipare alla gara con un progetto strategico (*Task Force for Cystic Fibrosis*) dall'obiettivo estremamente mirato: identificare correttori più efficaci e trovare nuovi potenziatori adatti a questa diversa condizione. Le risorse umane e tecnologiche messe in campo sono di elevatissima qualità, i tempi e gli obiettivi del progetto chiari. L'Italia vuole e può esserci, con la qualità della sua ricerca e dei suoi ricercatori.

Il secondo tema è **l'infiammazione polmonare**: un tema complesso, un aspetto fondamentale della malattia FC che soffre della povertà di conoscenze e quindi della mancanza di una terapia "specifica". Da parecchio si discute se l'infiammazione FC sia eccessiva o troppo scarsa e se sia causa o conseguenza dell'infezione cronica da batteri vari che caratterizza questa malattia. Numerosi studi, molti dei quali con il supporto di FFC, hanno identificato alterazioni di segnali all'interno della cellula: da questi partirebbe un'infiammazione "sbagliata", che si attiva anche in assenza di batteri. Ma la cascata degli eventi è così complessa che si fa fatica ad individuare quale sia l'alterazione principale e/o il fattore scatenante capace di dare una spiegazione al tutto: di

recente è stata introdotta una nuova teoria che spiega come il difetto comune possa riguardare l'autofagia, vale a dire la possibilità della cellula FC di eliminare il materiale di scarto. Se CFTR è difettosa la cellula non esercita la sua azione autofagica e accumula composti tossici, che producono infiammazione. Questa sarebbe la connessione tra l'infiammazione e il difetto genetico alla base della malattia. Naturalmente la teoria, alquanto interessante, attende verifica e conferma da altri studi sperimentali. Si sta sviluppando quindi con molto interesse il filone del tutto nuovo della ricerca di farmaci che avrebbero, per lo meno nei confronti di DF508, effetto combinato antiinfiammatorio e facilitante insieme il recupero della CFTR difettosa.

Il terzo tema, **i microbi e gli antibiotici per combatterli**: tema affrontato dai malati FC, dai loro genitori e dai loro medici nel vivere di ogni giorno, a tutte le età. A che punto siamo? Perché la ricerca non produce il "nuovo" antibiotico, l'arma letale capace di eliminare tutti i batteri? E' realistico dire che la scoperta e realizzazione di un nuovo antibiotico da aggiungere al già ricco armamentario FC richiede molto tempo. Le ricerche in questo campo ci sono, hanno prodotto molecole la cui sperimentazione non è ancora arrivata a livello clinico. Però questi batteri li conosciamo di più, e molto più di una volta siamo in grado di controllarli. L'introduzione della via aerosolica come nuova modalità di somministrazione di vari antibiotici di vecchia generazione ha segnato una tappa fondamentale per il miglioramento della malattia polmonare. Di recente la possibilità di inalare polveri di antibiotici, con speciali dispositivi, invece che soluzioni per aerosol, ha più che dimezzato il tempo necessario per la terapia. Ma sempre di più sappiamo che questi microrganismi in FC sono una "comunità" agguerrita, nella quale alcuni giocano ruoli più importanti, per ragioni ancora non chiare. Sappiamo che è vantaggioso aggredirli precocemente: nel caso di Pseudomonas il trattamento precoce ritarda di molto l'insediamento cronico del germe, in modo che il polmone si mantenga per un tempo più lungo in condizioni ottimali.

Con l'augurio di non avere eccessiva paura del tempo che passa, e nutrire invece fiducia nei tempi richiesti dai risultati della ricerca FC, oggi più che mai attivissima e supportata da strade nuove e molto promettenti, benvenuti al XII Seminario di Primavera.

A che punto siamo con gli studi clinici sulle terapie mutazioni-mirate

Cesare Braggion
(Centro Regionale Fibrosi Cistica,
Azienda Ospedaliera Universitaria "Meyer", Firenze)

La ricerca per la fibrosi cistica (FC) esplora diversi ambiti, dai farmaci mirati a ridurre le manifestazioni cliniche della malattia a quelli più specificamente rivolti al difetto di base. Per quest'ultimo versante i risultati più promettenti sono venuti dai farmaci "modulatori" della proteina difettosa (proteina CFTR mutata): farmaci cioè che cercano di superare il difetto della proteina, che è diverso in base alle diverse mutazioni in gioco. Quindi farmaci diversi per le diverse mutazioni del gene CFTR.

"A mutazioni genetiche diverse corrispondono difetti diversi della proteina CFTR "

È utile considerare una classificazione pratica delle mutazioni genetiche FC, suddivise in base allo specifico difetto della proteina CFTR. La Figura 1 riporta questa classificazione, che considera 5 classi di mutazioni. Per quanto riguarda le prime due classi, la proteina CFTR, sintetizzata a livello di speciali organuli (ribosomi) del citoplasma cellulare, non arriva sulla superficie delle cellule (la membrana apicale cellulare), dove invece è rilevabile per le mutazioni delle altre 3 classi, pur non funzionando esse per ragioni diverse. Nella cellula normale, la proteina CFTR, che funziona come canale per il trasporto del cloro, è presente proprio a livello della superficie cellulare: il passaggio del cloro verso l'esterno comporta anche un passaggio di acqua nella stessa direzione e ciò crea una condizione di giusta idratazione delle secrezioni dei vari organi: nelle vie respiratorie tale condizione favorisce il movimento delle "cilia" di cui sono dotate le cellule bronchiali e quindi l'eliminazione del muco bronchiale (clearance muco-ciliare). Il non funzionamento di questo meccanismo è responsabile, a livello respiratorio, dei sintomi della malattia polmonare. La presenza della proteina-canale nella sua sede normale (la superficie della cellula) facilita il trattamento farmacologico della stessa, anche se è difettosa: i farmaci "potenziatori" hanno infatti lo scopo di ripristinarne il funzionamento nel caso delle mutazioni di classe III, IV e forse di alcune di classe V. Nelle prime due classi di mutazioni, invece, occorre combinare farmaci che facilitino la

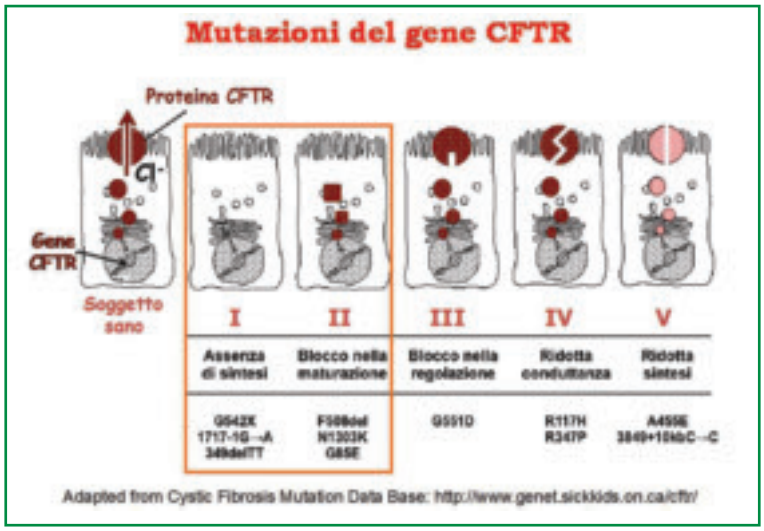


Fig 1. Sulla sinistra è rappresentato il gene CFTR normale che produce una proteina CFTR normale,collocata nella sua sede appropriata sulla superficie della cellula e funzionante come un canale del cloro. Nel caso delle mutazioni di classe I e II non arriva proteina sulla superficie della cellula. Nel caso delle mutazioni di classe III, IV la proteina arriva sulla superficie della cellula ma non è funzionante a causa dei diversi meccanismi indicati. Per le mutazioni di classe V è ridotta la sintesi di proteina normale.

sintesi o il percorso della proteina fino alla superficie cellulare, i cosiddetti farmaci "*correttori*", con farmaci "*potenziatori*", che ne stimolino l'attività, una volta che la proteina CFTR sia arrivata nella sede appropriata.

La chiave vincente per l'avanzamento di questa linea di ricerca è stato il cosiddetto "*high-throughput screening*" (screening ad alta efficienza): si tratta di un sistema automatizzato, che consente di valutare molte migliaia di molecole già note, per identificarne le poche potenzialmente efficaci. Queste sono quelle che "*in vitro*" riescono a far esprimere la proteina sulla superficie cellulare, normalizzandone quindi la funzione. Studi successivi "*in vitro*" o nel modello animale, utilizzando queste molecole come farmaci "*candidati*", ne hanno valutato l'effetto diretto sulla proteina-canale e la dose efficace, misurando di quanto il passaggio di cloro veniva aumentato. Le cellule utilizzate nella fase avanzata dello "*screening*" sono per lo più quelle bronchiali umane contenenti la specifica mutazione in studio: la misura della funzione di canale del cloro viene effettuata misurando le variazioni di corrente elettrica prodotte dal trasporto di cloro e sodio, in condizioni basali (presenza di proteina difettosa senza farmaco) e in condizioni di "trattamento" con il farmaco in studio.

Il secondo passaggio cruciale è stato quello di utilizzare i farmaci così identificati e saggiati "*in vitro*", direttamente nei soggetti con fibrosi cistica, pianificando gli studi clinici. Prima quelli su un piccolo campione di soggetti per verificare l'efficacia clinica, la dose più efficace del farmaco e la sicurezza (studi di fase I e II) e poi quelli su un grande campione di soggetti (fase III) per verificarne soprattutto l'efficacia clinica, attraverso parametri indicativi della malattia polmonare, come la funzionalità respiratoria o i sintomi, e confermare la sua sicurezza e tollerabilità. Questo modo di procedere ha consentito di abbreviare la durata degli studi per la scoperta di nuovi farmaci, fino alla loro commercializzazione.

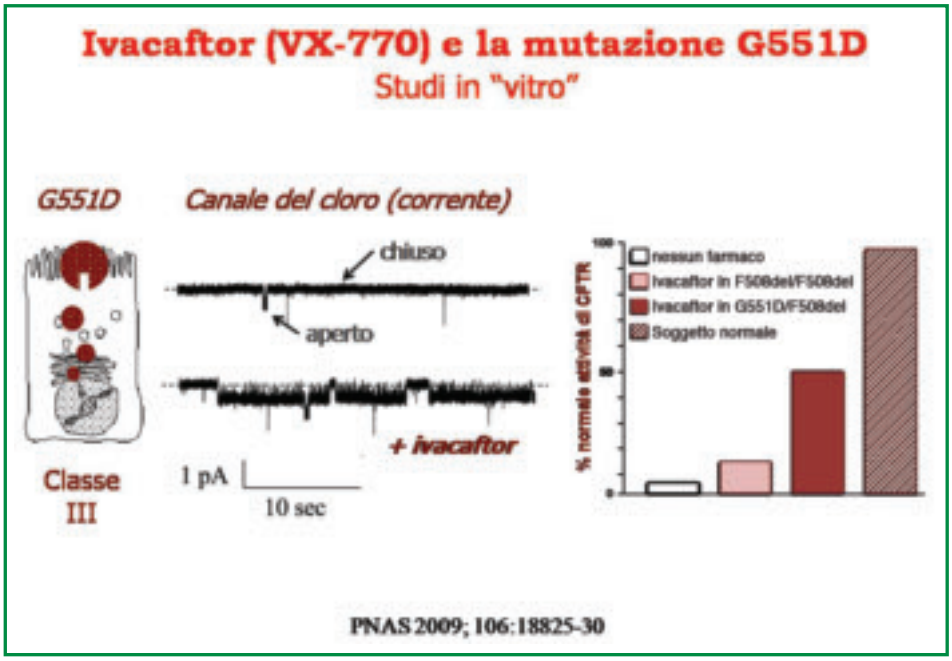


Fig 2. Nella parte centrale della figura si vede come il funzionamento del canale del cloro è misurato come una corrente elettrica: il segnale misurato indica che il canale è chiuso per la maggior parte del tempo in cellule con la mutazione G551D. Quando viene utilizzato il "potenziatore" ivacaftor, il canale si apre per un tempo maggiore. Sulla destra è mostrato che la funzione della proteina CFTR nelle cellule bronchiali di soggetti con almeno una mutazione G551D è aumentata fino al 50% rispetto al normale.

Il processo sopra descritto può essere ben compreso nel percorso della ricerca per portare all'utilizzo nella pratica terapeutica del Kalydeco™ (ivacaftor) nei soggetti con almeno una copia della mutazione G551D. La Figura 2 riassume i risultati degli studi "*in vitro*" con questo farmaco, pubblicati nel 2009 ma già noti prima per pianificare gli studi clinici (1). Uno studio di fase II, pubblicato nel 2010, ha contribuito ad identificare la dose efficace di 150 mg, da somministrare per bocca due volte al dì: nel periodo di un mese la spirometria migliorava ed il cloro sudorale si riduceva significativamente nei 39 soggetti trattati con ivacaftor (2). Il primo studio di fase III, pubblicato nel 2011, ha portato alla messa a disposizione del

"Tutti gli studi clinici con Ivacaftor (Kalydeco), il primo farmaco mutazione-mirato"

farmaco nei soggetti con questa mutazione (3). La Figura 3 mostra i risultati convincenti raggiunti con questo studio della durata di 1 anno (3). Oltre al sensibile incremento del FEV1 e alla riduzione del cloro sudorale verso valori di normalità, lo studio ha consentito di dimostrare nei soggetti con mutazione G551D trattati con ivacaftor la riduzione del 55% del rischio di esacerbazioni polmonari, la riduzione dei sintomi della malattia polmonare ed un aumento medio di circa 3 kg del peso, in confronto a coloro che assumevano il placebo (*composto privo di effetti farmacologici, ndr*).

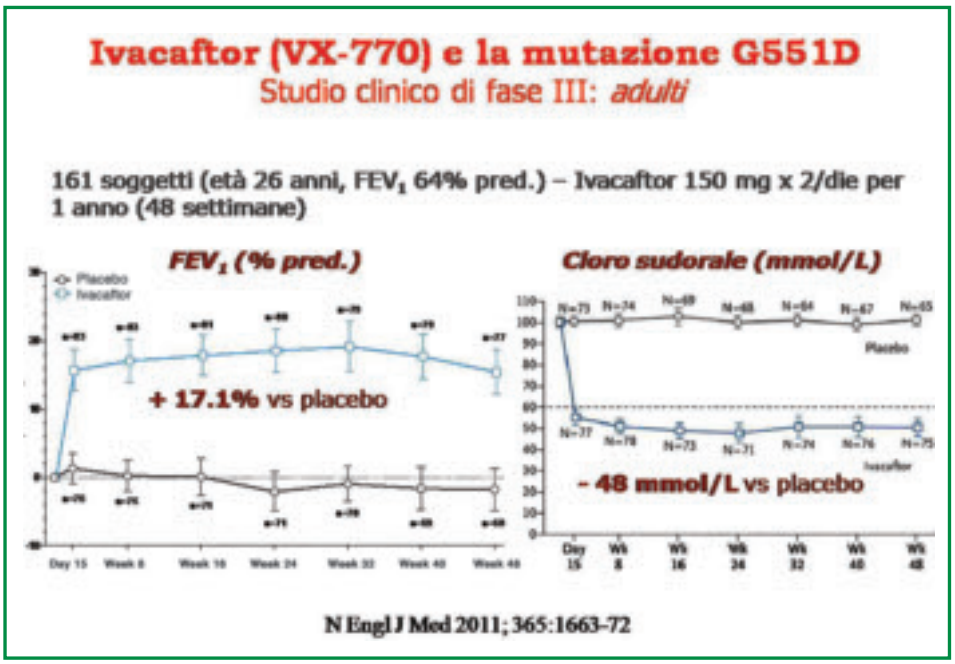


Fig 3. Lo studio di fase III "Strive" ha arruolato 161 soggetti con fibrosi cistica e la mutazione G551D di età superiore ai 12 anni; Kalydeco™ è stato somministrato per bocca per circa 1 anno. Sulla sinistra i risultati rispetto alla FEV1: il farmaco era associato ad un aumento di circa il 17% del FEV1, un parametro della spirometria (ciò corrisponde ad un aumento del 10% del predetto, passando, ad esempio, dal 65 al 75% del predetto). Sulla destra i risultati rispetto al valore di cloro nel sudore: il cloro nel sudore si riduceva di circa 48 mmol/L: in chi assumeva placebo aveva valori patologici di circa 100, mentre in chi assumeva il farmaco era a valori di circa 50 mmol/L.

Questi stessi risultati sono stati ottenuti sia in soggetti di età superiore ai 12 anni (studio "*Strive*") che in bambini di età compresa tra i 6 ed i 12 anni (studio "*Envison*") (3, 4). (*È programmato uno studio di fase II in bambini dai 2 ai 6 anni: NCT 01705145; n.d.r*)

Attualmente lo studio "*Goal*" sta valutando i meccanismi attraverso cui Kalydeco™ ha prodotto questi risultati nei soggetti con mutazione G551D: conosciamo alcuni risultati preliminari, come ad esempio il rilievo di una più efficiente clearance muco-ciliare, che può spiegare il miglioramento della funzione respiratoria; così come un aumento del flusso di ioni bicarbonato a livello delle secrezioni pancreatiche può spiegare il migliore utilizzo degli enzimi pancreatici somministrati per bocca e perciò l'aumento del peso corporeo (5, 6). Siamo a conoscenza anche dei risultati preliminari dello studio "*Persist*": i risultati ottenuti con Kalydeco™, somministrato quotidianamente ai soggetti con mutazione G551D, persistono immodificati per una durata di quasi 3 anni (7).

Occorre tener conto che la mutazione G551D è presente in circa un 4-5% dei soggetti con FC negli USA. In Italia meno di una decina di soggetti ha questa mutazione. Si stanno studiando farmaci "*potenziatori*" e "*correttori*" anche per altre mutazioni? Gli stessi risultati ottenuti con il Kalydeco™ sono stati raggiunti anche per altre mutazioni? Al momento disponiamo di minori informazioni per rispondere a queste due domande.

"Kalydeco potenziatore per altre mutazioni purchè la proteina difettosa sia presente sulla membrana cellulare"

In Italia è stato stimato (dati del Registro Italiano dei pazienti FC) che almeno 120 soggetti con fibrosi cistica abbiano una mutazione di classe III, diversa dalla G551D, suscettibili quindi di trattamento con Kalydeco. Nel caso della Toscana circa un 2-3% dei pazienti ha almeno una di queste mutazioni. Gli studi "*in vitro*" hanno dimostrato per queste mutazioni che, come per la mutazione G551D, il Kalydeco™ aumentava decisamente la funzione della proteina CFTR, almeno del 50%, seppur in modo variabile, in dipendenza dalle diverse mutazioni testate (8). Uno studio di fase III con l'uso del farmaco "potenziatore" in soggetti con FC ed una delle mutazioni di classe III diverse da G551D è stato con-

cluso recentemente. Ne sono stati mostrati i risultati preliminari alla Conferenza Nord-Americana sulla FC nell'ottobre scorso: i risultati ottenuti sono buoni e simili a quelli ottenuti per la mutazione G551D (9).
(*La FDA americana ha approvato la commercializzazione di Kalydeco per altre 9 mutazioni di classe III; n.d.r). (È in corso anche uno studio pilota di fase II con Kalydeco per pazienti con alcune mutazioni di classe IV e V, in cui la proteina CFTR manifesti funzione "residua": NCT 01685801. Inoltre è stato programmato uno studio sempre di fase II con Kalydeco per pazienti con FC clinicamente "lieve": NCT 01784419; n.d.r.*)

Il problema da risolvere per le mutazioni di classe I e II è più complesso perché serve anche un farmaco "correttore" che faccia arrivare la proteina sulla superficie cellulare, dove questa può essere resa più efficiente dall'uso di un farmaco "potenziatore".

"Se CFTR non è sulla membrana cellulare non bastano i potenziatori, occorrono i correttori della proteina"

È questo il caso della mutazione più frequente anche in Italia, la mutazione F508del (classe II) (Figura 1). In presenza di questa mutazione, a causa della mancanza di un aminoacido, la fenilalanina, in posizione 508, la proteina presenta delle anomalie di conformazione: essa viene perciò eliminata dai sistemi di controllo cellulari. Per questo tipo di difetto sono stati valutati diversi farmaci "correttori", come il VX-809 (lumacaftor) ed il VX-661. Negli studi "in vitro" sulle cellule bronchiali dei soggetti con due mutazioni F508del (quindi omozigoti per la mutazione F508del) l'uso combinato del "correttore" VX-809 e del "potenziatore" ivacaftor ha consentito di aumentare la funzione della proteina CFTR fino al 25% del normale (10). Due studi di fase II hanno identificato le dosi più efficaci dei due farmaci, che hanno prodotto una modesta riduzione del cloro sudorale (6-8 mmol/L in media) ma un incremento, rispetto al placebo, del FEV1 di circa il 10% (Figura 4) (11).

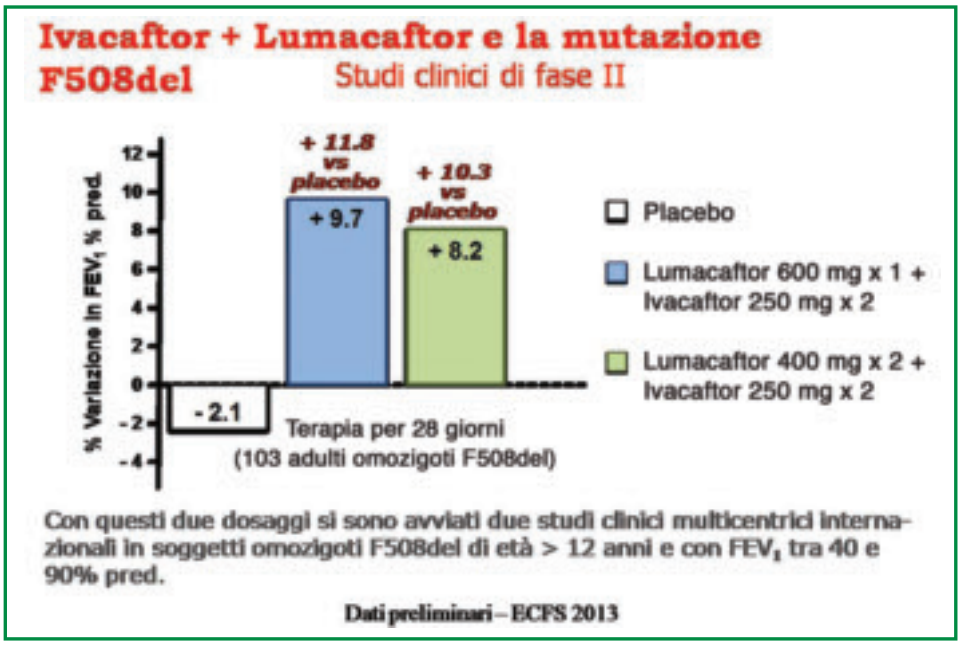


Fig 4. In 103 soggetti adulti omozigoti per la mutazione F508del è stata valutata la combinazione del "correttore" lumacaftor (VX-809) a due dosaggi (600 mg/die e 400 mg x 2/die) con il "potenziatore" ivacaftor ad un dosaggio maggiore che in altri trial (250mg due volte al giorno) somministrati per 1 mese. Il parametro FEV1 della spirometria aumentava di circa il 10% per entrambe le combinazioni, in confronto al placebo.

Ciò ha dato avvio a due studi internazionali di fase III, che hanno arruolato complessivamente circa 1000 soggetti, tutti omozigoti per la mutazione F508del: gli studi sono tuttora in corso e stanno completando la prima fase di 6 mesi. Gli studi prevedono, dopo una fase in cui i soggetti sono stati randomizzati a ricevere l'una o l'altra delle due dosi del "*correttore*" (Figura 4) o il placebo, che i soggetti inclusi ricevessero solo una delle due dosi di "*correttore*" per un periodo di 24 mesi.

[Questi correttori di generazione Vertex non sono ottimali e si ritiene con tutta probabilità necessaria una combinazione di farmaci (almeno 2) per ottenere una efficace correzione di CFTR-F508del. Vi è su questo fronte una vivace competizione tra gruppi di ricerca: in tale competizione è entrata anche la Fondazione Ricerca FC, come da relazione successiva del Dr. Galietta, n.d.r]

Anche le mutazioni di classe I sono abbastanza frequenti in Italia (circa il 10% dei pazienti). Con alcune di queste (mutazioni stop o *missense*) la proteina CFTR viene bloccata nella sua sintesi: il DNA del gene CFTR contiene dei segnali di "*stop*" che interrompono la sintesi della proteina prima del dovuto, la proteina viene così troncata ed eliminata. Gli studi "*in vitro*" hanno mostrato che il farmaco ataluren (PTC124) riesce a far "*saltare*" i segnali di "*stop*" in modo che venga prodotta una proteina normale: ciò si verifica nel topo FC per il 25% rispetto al normale (12).

"Se il difetto di CFTR viene da un segnale di stop occorre un farmaco che faccia superare lo stop"

Gli studi preliminari di fase II con ataluren hanno mostrato una correzione del segnale elettrico della mucosa nasale in circa la metà dei soggetti con queste mutazioni (13-15). È stato completato lo studio di fase III con il farmaco e ne conosciamo i risultati preliminari: considerando tutti i pazienti arruolati, l'incremento del FEV1 era modesto e non significativo (16). Questo incremento diventava più significativo nei soggetti che non assumevano la tobramicina per via inalatoria, facendo ipotizzare un meccanismo di "competizione" tra ataluren e tobramicina. L'azienda produttrice dell'ataluren sta predisponendo una ricerca di fase III, in cui arruolare soggetti con mutazioni stop che assumeranno l'ataluren ed antibiotici per via inalatoria diversi dalla tobramicina.

Credo si possa concludere che disponiamo finalmente di un farmaco incisivo sulla proteina difettosa: ciò è vero, al momento, solo per alcune mutazioni di classe III. Per le altre mutazioni alcuni passi preliminari importanti sono stati già fatti con gli studi *in vitro* e l'avvio di studi clinici anche di fase III: siamo in attesa di conoscerne i risultati e di valutare le proposte di nuovi "correttori" e "potenziatori" che i diversi gruppi di ricerca proporranno.

Riferimenti bibliografici

1. *Van Goor F et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. PNAS 2009; 44: 18825-18830*
2. *Accurso FJ et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. New Engl J Med 2010; 363(21):1991-2003*
3. *Ramsey BW et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. N Engl J Med 2011; 365(18):1663-1672*
4. *Davies JC et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187:1219-1225*
5. *Donaldson SH et al. Effect of ivacaftor on mucociliary clearance and mucus rheology in patients with a G551D mutation. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2013. Pediatr Pulmonol 2013; Suppl 36:279 (Abs 209)*
6. *Gelfond D et al. Impact of ivacaftor therapy on the intestinal pH profile in CF subjects with G551D mutation. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2013. Pediatr Pulmonol 2013; Suppl 36:405 (Abs 540)*
7. *McKone E et al. Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the G551D-CFTR mutation: response through 144 weeks of treatment (96 weeks of Persist). Nord American Cystic Fibrosis Conference 2013. Pediatr Pulmonol 2013; Suppl 36:287 (Abs 227)*
8. *Yu H et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. J Cyst Fibros 2012; 11:237-245*
9. *De Boeck K et al. Ivacaftor, a CFTR potentiator, in cystic fibrosis patients who have a non-G551D-CFTR gating mutation: phase 3, part 1 results. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2013. Pediatr Pulmonol 2013; Suppl 36:292 (Abs 241)*
10. *Van Goor F et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. PNAS 2011; 108:18843-18848*
11. *Boyle MP et al. The investigational CFTR corrector, VX-809 (lumacaftor) co-administered with tha oral potentiator ivacaftor improved CFTR and lung function in F508del homozygous patients: phase II study results. Nord American Cystic Fibrosis Conference 2012. Pediatr Pulmonol 2012; Suppl 35:315 (Abs 260)*
12. *Ming D et al. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. PNAS 2008; 105:2064-2069*
13. *Kerem E et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a propsective phase II trial. Lancet 2008; 372:719-27*
14. *Sermet-Gaudelus I et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182:1262-1272*
15. *Wilschanski M et al. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. Eur Respir J 2011; 38:5969*
16. *Rowe S et al. Results of the phase 3 study of ataluren in nonsense mutation cystic fibrosis (NMCF). Nord American Cystic Fibrosis Conference 2012. Pediatr Pulmonol 2012; Suppl 35:290 (Abs 193)*

Task Force for Cystic Fibrosis (TFCF): nuovi correttori e potenziatori di F508del-CFTR

Luis J.V. Galietta
(U.O.C. Genetica Medica,
Istituto Giannina Gaslini, Genova)

La scoperta di nuovi correttori farmacologici per la mutazione F508del è uno degli obiettivi più importanti della ricerca scientifica sulla fibrosi cistica (FC). Nel corso degli ultimi anni diversi laboratori e industrie farmaceutiche hanno lavorato all'identificazione di composti chimici, i cosiddetti correttori, in grado di contrastare gli effetti che la mutazione F508del provoca sulla proteina CFTR (Figura 1). Tra le iniziative che hanno avuto maggior successo c'è lo sviluppo, da parte della compagnia farmaceutica Vertex del correttore VX-809 (1).

"Per F508del già identificati alcuni correttori"

In esperimenti effettuati in laboratorio su cellule bronchiali ottenute da pazienti con la mutazione F508del, VX-809 è in grado di recuperare la funzione della proteina CFTR mutata, seppure parzialmente. Il VX-809 è stato provato in studi clinici su pazienti FC ma i risultati non sono stati soddisfacenti (2). Nuovi studi con VX-809 ed un altro correttore Vertex (VX-661) sono in corso ma non si conoscono ancora i risultati. I motivi della parziale efficacia dei correttori risultano evidenti da studi recenti (3-5).

La mutazione F508del causa difetti multipli

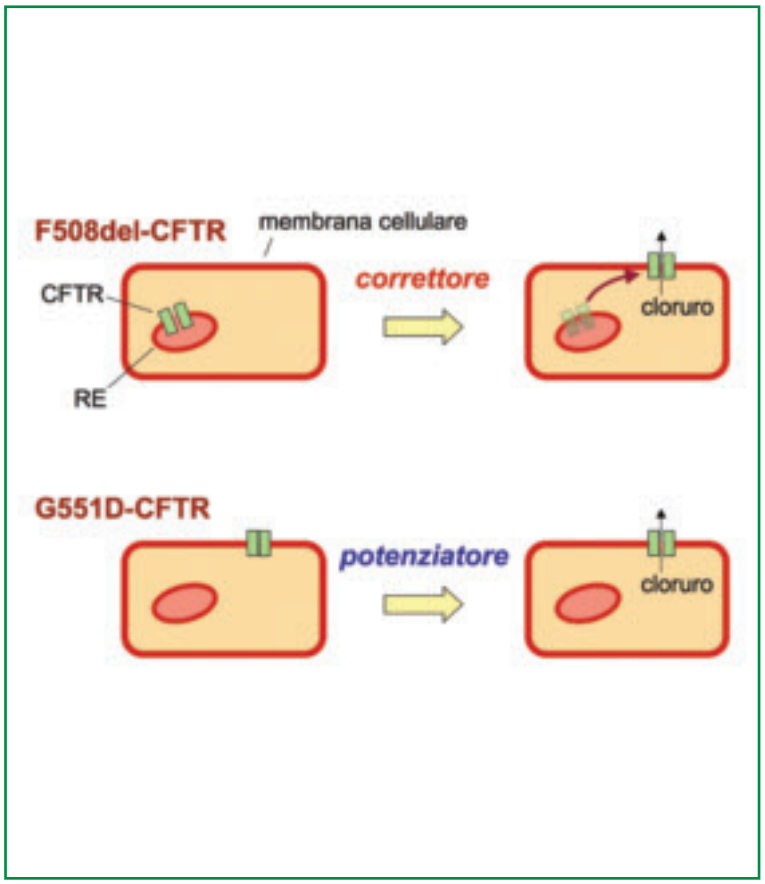
La proteina CFTR ha in tutto 1480 aminoacidi. L'aminoacido fenilalanina in posizione 508 della catena proteica è in una sede critica per la struttura della proteina CFTR. La sua assenza, nei pazienti con la mutazione F508del, provoca difetti multipli di stabilità e di ripiegamento che rendono la proteina CFTR incapace di uscire dal reticolo endoplasmatico (RE) (l'organello cellulare in cui avvengono alcune fasi della sua sintesi e maturazione), e di raggiungere la superficie della cellula (3-5). In effetti, diversi sistemi di controllo cellulari riconoscono CFTR con la mutazione F508del come se fosse un difetto di fabbrica fermandone la maturazione e attivando la sua degradazione.

"Non sono ancora i correttori ideali: è necessario cercarne di più efficaci da usare in combinazione con nuovi potenziatori"

L'efficacia parziale dei correttori identificati finora, ad esempio VX-809, è dovuta al fatto che questi agiscono solo su uno dei difetti causati dalla mutazione F508del.

È stato dimostrato che solo la combinazione di almeno due correttori diversi è in grado di recuperare la proteina CFTR mutata in maniera piuttosto efficace (5). Per questo è molto importante scoprire nuove molecole attive su F508del.

Figura 1 – ***Meccanismi farmacologi per il recupero funzionale della proteina CFTR.***
All'interno del nucleo della cellula, il gene CFTR (composto da una sequenza di DNA) viene trascritto in una molecola intermedia che è l'RNA messaggero (mRNA). L'RNA messaggero ha il compito di portare il messaggio del DNA all'apparato di sintesi di tutte le proteine (il ribosoma, contenuto nel reticolo endoplasmatico= RE, all'esterno del nucleo). Qui il messaggio viene tradotto e avviene la sintesi della proteina, che inizialmente è composta da una sequenza lineare di aminoacidi (struttura primaria immatura). Sempre all'interno del RE la proteina immatura è sottoposta a diversi processi per arrivare alla maturazione. Mano a mano che la maturazione procede, la proteina assume una specifica e caratteristica configurazione, fino a diventare una molecola ripiegata e complessa (struttura secondaria e terziaria). ***La mutazione F508del causa un difetto di stabilità e di ripiegamento della proteina CFTR (in alto, a sinistra). La proteina mutata rimane intrappolata nel reticolo endoplasmatico (RE), non riuscendo quindi a raggiungere la membrana cellulare (difetto di maturazione). L'utilizzo di un composto chimico correttore permette alla proteina CFTR mutata di raggiungere la superficie della cellula, dove può effettuare la sua normale funzione di trasporto di cloruro (in alto a destra), se viene potenziata da un farmaco "potenziatore". Le mutazioni di classe 3 (es. G551D) non alterano la posizione della proteina CFTR nella cellula ma ne compromettono l'attività (in basso a sinistra). Il poro della proteina CFTR rimane chiuso. Tuttavia, il trattamento con un composto chimico potenziatore favorisce l'apertura del poro consentendo il trasporto di cloruro (in basso a destra).***



Il progetto *Task Force for Cystic Fibrosis* (TFCF)

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC) ha voluto partecipare alla ricerca di nuovi farmaci per la FC finanziando un progetto strategico. Il progetto mette insieme il nostro laboratorio, che da anni si occupa di FC presso l'Istituto Giannina Gaslini (IGG), e il dipartimento di Drug Discovery & Development dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) di Genova, che ha notevole esperienza nella scoperta e nello sviluppo di nuovi farmaci.

Il progetto TFCF ha come obiettivo principale lo sviluppo di nuovi correttori e potenziatori per F508del ed eventualmente per altre mutazioni FC. Il progetto, della durata prevista di tre anni e mezzo, è articolato in tre fasi: 1) *Hit identification*; 2) *Hit to lead*; 3) *Lead optimization*. Questa terminologia in inglese è normalmente utilizzata per descrivere tre processi importanti della ricerca farmaceutica.

"Un progetto di ricerca con lo scopo di scoprire nuovi e più potenti correttori e potenziatori per CFTR-F58del"

Nella **prima fase** ("*hit identification*", identificazione dei composti attivi di partenza, *n.d.r,*), che durerà un anno, effettueremo lo screening di composti chimici a massima diversità strutturale.

"La prima fase: identificare il composto di partenza attraverso lo screening di migliaia di molecole"

In particolare utilizzeremo una collezione di più di 11.000 composti disponibili presso l'IIT e scelti accuratamente sulla base di diversi criteri (in particolare, novità della struttura e assenza di gruppi chimici potenzialmente tossici). Per lo screening utilizzeremo un metodo già messo punto da anni nel nostro laboratorio e basato sull'utilizzo di cellule ingegnerizzate. Queste cellule sono state manipolate in laboratorio in modo da esprimere allo stesso tempo sia la proteina CFTR mutata sia un sensore fluorescente chiamato YFP (*yellow fluorescent protein*), una proteina che emette una luce gialla se opportunamente illuminata (Figura 2).

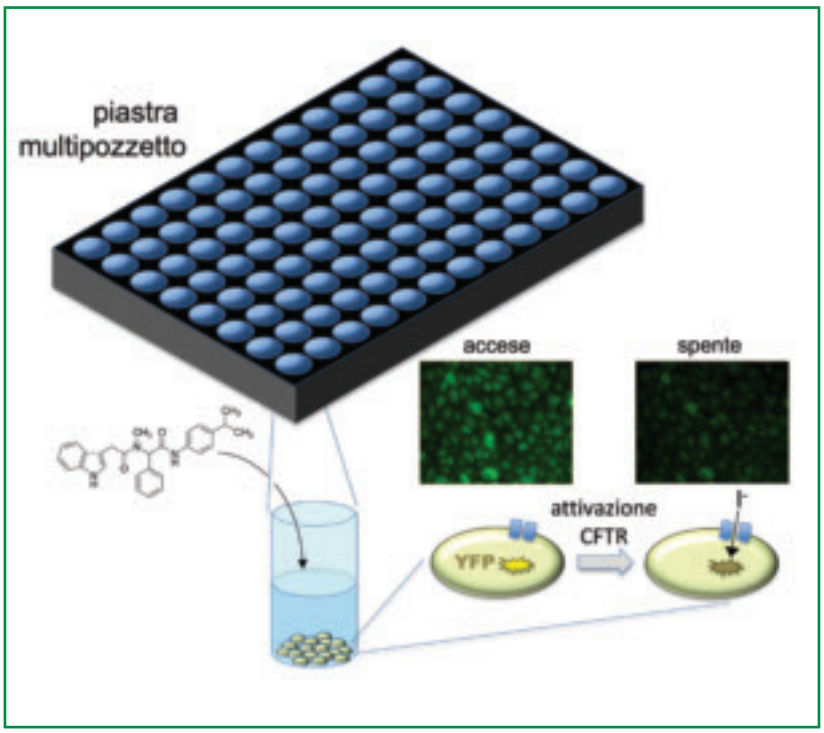


Figura 2 – ***Identificazione di correttori e potenziatori mediante screening di composti chimici ad alto flusso ("high-throughput screening").***
Si utilizzano cellule con espressione della proteina CFTR mutata e di una proteina fluorescente gialla (YFP) particolare perché è sensibile alle variazioni di concentrazione di anioni quali cloruro e ioduro (entrambi trasportati all'esterno dalla proteina canale CFTR). Le cellule vengono seminate in piastre multipozzetto contenenti 96 cellette. In ciascuna di queste viene anche messo un composto chimico diverso (quello da testare per la sua attività correttrice o potenziatrice). Se il composto è attivo determina la maturazione (correttore) o l'apertura (potenziatore) della proteina canale CFTR. La funzione della proteina CFTR viene rivelata aggiungendo ioduro (analogo al cloruro) in ciascun pozzetto. L'ingresso dello ioduro attraverso la proteina CFTR spegne la luce emessa dalla proteina YFP. Quindi, cellule "spente" indicano correzione farmacologica della proteina CFTR.

Le cellule vengono seminate in piastre multipozzetto che, simili ad un alveare, hanno tante cellette. In ciascuna di queste viene messo un composto chimico diverso. Se l'attività della proteina CFTR mutata viene recuperata dal composto con il quale le cellule sono state trattate, il risultato viene letto come uno spegnimento della proteina gialla (Figura 2). Questo tipo di saggio consente la valutazione di centinaia di composti al giorno.

Verranno effettuati tre screening separati.

"Due screening per la ricerca di correttori, uno screening per la ricerca di potenziatori"

Due screening saranno dedicati all'identificazione di correttori per F508del e verranno effettuati su due linee cellulari diverse: FRT e CFBE41o- *(in questo tipo di cellule, il primo di derivazione animale, il secondo di derivazione umana, è inserita la mutazione F508del, n.d.r.*). In questo modo puntiamo a massimizzare la probabilità di trovare composti attivi. Il terzo screening sarà invece rivolto alla scoperta di nuovi potenziatori. In effetti esiste già un potenziatore, il farmaco Kalydeco (Ivacaftor), che è stato già approvato per il trattamento di pazienti con la mutazione G551D (6, 7), diversa da F508del perché non altera la maturazione della proteina CFTR ma ne impedisce l'attivazione. Infatti, nelle mutazioni di classe 3, in cui è compresa G551D, il poro di CFTR rimane chiuso (Figura 1). Nonostante la disponibilità di Kalydeco, abbiamo voluto comunque includere nel progetto TFCF anche la ricerca di nuovi potenziatori per due motivi. Il primo motivo è che esistono diverse mutazioni appartenenti alla classe 3 e non è stato dimostrato che Kalydeco sia universalmente efficace per tutte. Il secondo motivo, anche più importante, è che attraverso la ricerca di potenziatori contiamo di identificare nuove classi di molecole con duplice attività, sia potenziatrice che correttrice (*alcune ricerche del gruppo Galietta, hanno già prodotto risultati "in vitro" molto interessanti in questo senso, n.d.r.*). Dopo gli screening, i composti risultati attivi verranno confermati in diversi tipi di esperimenti, che comprenderanno anche test su cellule bronchiali primarie (*cellule derivate da polmoni FC espiantati, n.d.r.*). Alla fine della prima fase, si cercherà di identificare e selezionare dei cosiddetti "*hits*", cioè composti chimici che per il grado di attività ed il tipo di struttura, risultino particolarmente promettenti.

"La seconda fase: modificare chimicamente il composto di partenza perché assuma le caratteristiche del miglior composto possibile"

Nella **seconda fase**, di "*hit to lead*", (*dal composto attivo di partenza al composto leader, n.d.r.*), inizierà il lavoro dei chimici dell'IIT, sotto la direzione del Dott. Tiziano Bandiera.

Per ciascun composto attivo di partenza (hit) verranno generati dei composti analoghi, in cui alla struttura chimica di partenza verranno apportatl vari tipi di piccole modifiche. I nuovi composti, a gruppi di 20-30, saranno saggiati nel nostro laboratorio su cellule per determinare quale delle modifiche ha avuto un eventuale effetto migliorativo sull'attività del composto. Questi risultati saranno importanti per guidare la sintesi di nuovi composti presso l'IIT. Quindi, in questa fase ci sarà una stretta interazione tra IIT e IGG, con cicli ripetuti di sintesi di composti chimici (IIT) e valutazione funzionale (IGG) alla ricerca di correttori e potenziatori dalle caratteristiche progressivamente migliori.

Nella **terza fase**, di "*lead optimization*" (*ottimizzazione del composto leader, n.d.r.*) saranno scelti un solo correttore ed un solo potenziatore, i migliori tra quelli sviluppati nella fase precedente.

"La terza fase: rendere ottimale il composto migliore per testarlo su modelli cellulari e animali"

Questi composti saranno ulteriormente modificati chimicamente in maniera da generare molecole dotate della massima affinità, efficacia, stabilità e sicurezza. A questo scopo si effettueranno test di tossicità in modelli cellulari ed animali. Alla fine di questa fase si conta di ottenere un composto dalle caratteristiche tali da rappresentare un farmaco candidato per lo sviluppo preclinico (PCD: *Preclinical Candidate Development*). A quel punto il composto sarà sottoposto a brevetto e sarà necessario cercare un partner industriale e/o finanziario per passare alla sperimentazione clinica (studio di fase I).

È opportuno notare che il progetto TFCF è stato organizzato in modo che alla fine di ciascuna delle tre fasi ci sia uno stretto controllo sui risultati ottenuti. La continuazione alla fase successiva sarà decisa solo se saranno stati raggiunti gli obiettivi prefissati.

"Ciascuna fase successiva alla prima sarà avviata solo se raggiunti gli obiettivi della fase precedente"

A partire dal 1989, anno della scoperta del gene CFTR, la ricerca scientifica ha prodotto molti risultati importanti per una migliore conoscenza della FC e per lo sviluppo di strategie terapeutiche. L'identificazione delle mutazioni che causano FC ha permesso poi di rivelare il meccanismo con il quale queste causano la perdita di funzione della proteina CFTR. Successivamente è stato dimostrato che per alcune classi di mutazioni è possibile utilizzare un approccio farmacologico che mira a recuperare l'espressione, maturazione e funzione della proteina mutata. Nel corso degli ultimi anni, diversi tipi di molecole (potenziatori per mutazioni di classe 3, correttori per F508del, "*read-through agents*" per mutazioni non senso) sono state identificate. È necessario continuare nella ricerca perchè molte di queste sostanze non hanno caratteristiche di efficacia ideali. Il progetto TFCF si unisce a questo sforzo con l'obiettivo ambizioso di trovare nuovi farmaci per i pazienti FC.

Riferimenti bibliografici

1. *Van Goor et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci USA 108: 18843-18848, 2011.*
2. *Clancy et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTRmutation. Thorax 67: 12-18, 2012.*
3. *Rabeh et al. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore ΔF508 CFTR folding and function. Cell 148: 150-163, 2012.*
4. *Mendoza et al. Requirements for efficient correction of ΔF508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. Cell 148: 164-174, 2012.*
5. *Okiyoneda et al. Mechanism-based corrector combination restores ΔF508-CFTR folding and function. Nat Chem Biol 9: 444-454, 2013.*
6. *Ramsey et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. N Engl J Med 365: 1663-1672, 2011.*
7. *Van Goor et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. Proc Natl Acad Sci USA 106: 18825-18830, 2009.*

Note redazionali

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica ha scelto di investire nel Progetto "Task Force for Cystic Fibrosis" (TFCF) perché convinta dell'opportunità di mettere a frutto le condizioni fortemente presenti nei due centri di ricerca che lo svilupperanno: avanzatissima esperienza nelle ricerche relative al difetto di base e alle sue conseguenze biologiche (Laboratorio di Genetica Molecolare dell'Istituto G. Gaslini di Genova), eccellente competenza nel campo della chimica farmaceutica e della Drug Discovery and Development (Scoperta e Sviluppo di Farmaci) dell'Istituto Italiano di Tecnologia, sempre di Genova. Il progetto è stato attentamente vagliato dal Comitato Scientifico della Fondazione nonché da esperti indipendenti. Sono stati considerati elementi di forza del progetto le competenze dei due istituti e dei ricercatori che vi saranno coinvolti, nonché la metodologia che si intende adottare, sia sul piano tecnico che su quello della strategia step by step. In particolare, questo secondo aspetto implica che sia svolta una valutazione dei risultati scientifici al termine di ciascuna fase, anche con l'aiuto di esperti esterni, valutazione da considerarsi dirimente per l'avvio della fase successiva. Lo stesso metodo si applica per lo stanziamento dei finanziamenti: FFC si è impegnata a finanziare le prime tre fasi del progetto (3 anni e mezzo: marzo 2014 – agosto 2017, vedi figura sotto) con un contributo complessivo di 1.250.000 euro (rispetto al costo complessivo di euro 1.615.000). Il finanziamento da parte di FFC di ciascuna delle fasi successive alla prima è previsto solo a seguito del raggiungimento di ben definiti obiettivi-chiave. Questo permetterà a FFC di impegnare risorse economiche solo a fronte di risultati significativi. C'è piena consapevolezza da parte di FFC, come pure da parte dei ricercatori leader del progetto, della notevole competizione internazionale in cui TFFC si inserisce, ma anche fiducia nelle risorse tecniche ed umane messe in campo e grande motivazione al raggiungimento del risultato.

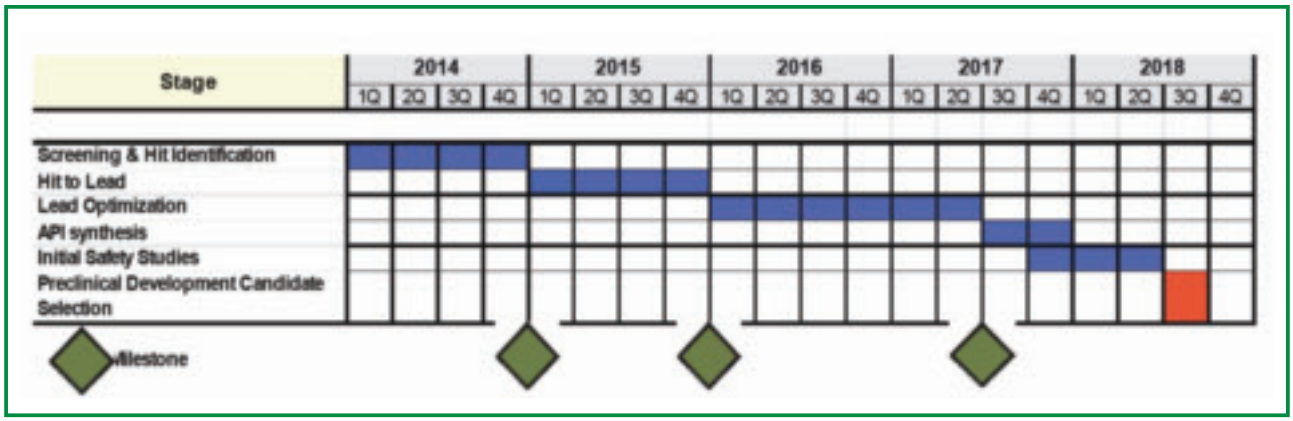


*Figura 3 – **Fasi e tempi del progetto Task Force for Cystic Fibrosis (TFCF)***
Il grafico illustra la tabella di marcia del progetto. I periodi indicati nel grafico vanno spostati di 2 mesi. Infatti, Il progetto ha preso avvio il 1 marzo 2014 (2 mesi dopo quanto indicato nel grafico), si compone di 5 fasi (barre blu) e ha la durata complessiva di 5 anni, fino all'inizio dello sviluppo preclinico (barra rossa). FFC si è impegnata a finanziare al momento le prime tre fasi (1. marzo 2014 - febbraio 2015; 2. marzo 2015 - febbraio 2016; 3. marzo 2016 - agosto 2017). Alla conclusione di ciascuna delle tre fasi è prevista la valutazione dei risultati scientifici e la decisione sulla prosecuzione del finanziamento.

Gli aspetti più promettenti degli studi sull'infiammazione polmonare in FC

Luigi Maiuri[1,2], Daniela De Stefano[1]
([1]Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano; [2]Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia)

L'avanzamento delle conoscenze in Fibrosi Cistica (FC) ha determinato un notevole miglioramento della qualità delle cure, con ricadute positive sulla salute dei pazienti. Il progresso della ricerca ha determinato il sorgere di nuove "aree tematiche" che, sebbene abbiano travasato nella ricerca FC importanti competenze scientifiche "di settore", hanno inevitabilmente reso più complesso per i non-specialisti delle diverse aree il mantenimento di una visione di insieme che ponga il paziente nella sua complessità al centro delle strategie di ricerca.

"L'infiammazione come reazione di difesa alle aggressioni esterne"

L'infiammazione è l'emblema di tale paradigma poiché rappresenta il crocevia di differenti percorsi fisiologici e patologici. L'infiammazione di per sé fa parte della fisiologia, non della patologia. E' un sistema di difesa, indispensabile per la vita, che l'organismo attua nei confronti di probabili aggressori e che quindi provvede a risolvere in una sequenza spazialmente e temporalmente definita. E anche l'infiammazione cronica di basso grado, quando l'aggressione si perpetua, può rappresentare un adattamento locale benefico a diversi stimoli, come avviene per l'intestino, sottoposto costantemente ad una miriade di "aggressioni" che provengono dal lume intestinale. L'infiammazione è in tal caso il prezzo da pagare per garantire l'equilibrio dell'individuo.

Si è dibattuto a lungo se l'infiammazione in FC dovesse essere considerata "eccessiva" o "troppo scarsa" e se fosse causa o conseguenza dell'infezione cronica che caratterizza questa malattia. Evidenze della letteratura suggeriscono da una parte un'eccessiva risposta ai batteri (o a loro prodotti), dall'altra una difettiva capacità di montare una risposta adeguata per l'eliminazione dei batteri. Questo dilemma potrebbe influenzare la scelta della migliore strategia terapeutica in FC. E' quindi logico pensare che la risposta infiammatoria in FC sia semplicemente "sbagliata". Pertanto una corretta terapia dovrebbe combattere l'infiammazione o stimolarla per favorire una risposta adeguata all'eliminazione di fattori aggressivi per l'ospite, come i batteri?

"L'infiammazione FC una reazione sbagliata"

La risposta infiammatoria "locale" in un determinato organo è principalmente demandata a popolazioni cellulari "professionalmente" adibite a questo scopo, quali, ad esempio, i macrofagi. Tuttavia anche altre cellule, quali l'endotelio e le cellule epiteliali diventano "infiammate" in risposta a vari stimoli. Inoltre, in FC le cellule presentano "spontaneamente" un'attivazione della cascata infiammatoria, anche in assenza di stimolazioni batteriche o di altro genere. Cosa induce queste cellule a mantenere uno stato d'allerta apparentemente non finalizzato all'eliminazione di un agente specifico? Numerosi studi della letteratura e progetti in corso anche in Italia, molti dei quali con il supporto della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, hanno identificato numerose alterazioni di se-

gnali intracellulari responsabili dell'inappropriata risposta infiammatoria in "ambiente" FC (1-6). In molte situazioni, la correzione di queste alterazioni in modelli sperimentali, lascia presagire nuove potenziali strategie anti-infiammatorie e nuovi candidati farmaci per la FC che abbiano ricadute positive sul rallentamento della malattia. Tuttavia, non è chiaro se l'intervento su queste numerose vie di controllo dell'infiammazione sia "determinante" per la correzione del fenotipo (come la malattia polmonare) o se l'intervento terapeutico, pur mirato, sia poco risolutivo da un punto di vista clinico. L'infiammazione, infatti, è un fenomeno complesso, che prevede il coinvolgimento di numerosi meccanismi, molti dei quali "ridondanti", cioè vicariabili da altri meccanismi paralleli. Ciò a garanzia della massima efficacia di risposta per l'organismo. Pertanto, candidati farmaci con bersaglio "ristretto" rischiano di essere specifici ma poco efficaci sul piano clinico, mentre farmaci con ampio bersaglio anti-infiammatorio, rischiano di avere effetti collaterali indesiderati. Questo paradigma dovrebbe guidare la ricerca di nuovi farmaci anti-infiammatori in FC.

"Quali farmaci antiinfiammatori?"

Attualmente la terapia anti-infiammatoria nel paziente con FC prevede, oltre agli steroidi, l'uso di farmaci non steroidei (FANS), o molecole antibiotiche, quali l'azitromicina. Fra i FANS, l'ibuprofene ad alte dosi si è rivelato efficace nel rallentare la progressione della malattia polmonare (7,8), a discapito di effetti collaterali che ne limitano un largo uso. Altri farmaci con proprietà antiinfiammatoria, quali inibitori di proteasi (alfa-1 antitripsina, ad esempio), sildenafil, o noti antiossidanti, quali il glutatione, sono in sperimentazione clinica con risultati controversi o con efficacia non ancora provata (2,4). Recentemente è stato dimostrato in modelli sperimentali che una molecola, la trimetil-angelicina (TMA), abbina attività anti-infiammatorie (inibizione di citochine) a potenziali effetti sulla funzione della CFTR attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti. Inoltre, è da definire se queste due attività della TMA siano fra loro funzionalmente correlate (10).

Ma quale potrebbe essere il punto nodale di bersaglio dell'intervento per garantire efficacia e limitare la tossicità? La FC è una malattia monogenica causata dal difetto di funzione della proteina CFTR. Pertanto, le alterazioni della risposta infiammatoria in FC sono necessariamente conseguenti al difetto di base della malattia. E' verosimile che il fenotipo FC non sia interamente dovuto allo squilibrio ionico conseguente all'alterata funzione di canale, e che l'assenza della proteina CFTR nella sua sede fisiologica (almeno limitatamente alle classi di mutazioni I e II) e/o la sua difettiva funzione, e/o l'influenza di geni modificatori, possano ripercuotersi sulla funzionalità di altre proteine importanti per la fisiologia cellulare (quali ad esempio il canale ENaC che regola l'assorbimento dello ione Sodio). Tuttavia, è indiscutibile che il quadro infiammatorio in FC, pur nella sua complessità, sia conseguente al difetto di CFTR. È ovvio che la terapia anti-infiammatoria "ideale" per il paziente FC sia quella che corregge innanzitutto il difetto di base (*CFTR-repairing therapy*) e, di conseguenza, l'infiammazione. Infatti, uno degli obiettivi delle terapie di correzione della CFTR è il miglioramento della funzionalità respiratoria che è logicamente conseguente ad un miglioramento del quadro infiammatorio cronico polmonare FC.

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha identificato uno dei possibili denominatori comuni delle variegate alterazioni infiammatorie in FC: il difetto di "autofagia" (11).

"Nelle cellule FC un difetto di autofagia come possibile responsabile della risposta infiammatoria sbagliata"

L'autofagia è un meccanismo di risposta che le cellule adottano in risposta allo stress (di vario genere) tendente ad eliminare materiale intracellulare accumulato impropriamente, per ripristinare l'equilibrio cellulare (12,14). Il difetto di funzione della CFTR genera uno squilibrio fra la produzione e lo smaltimento di specie reattive all'ossigeno, che comporta uno stress ossidativo e un aumento dei livelli di Calcio intracellulare (Fig. 1).

Ciò determina una persistente attivazione di un enzima, la Transglutaminasi 2, che sequestra alcune molecole essenziali, in particolare Beclin 1, per la formazione di "autofagosomi", vescicole essenziali per il processo di autofagia. Lo squilibrio a carico di queste molecole fa

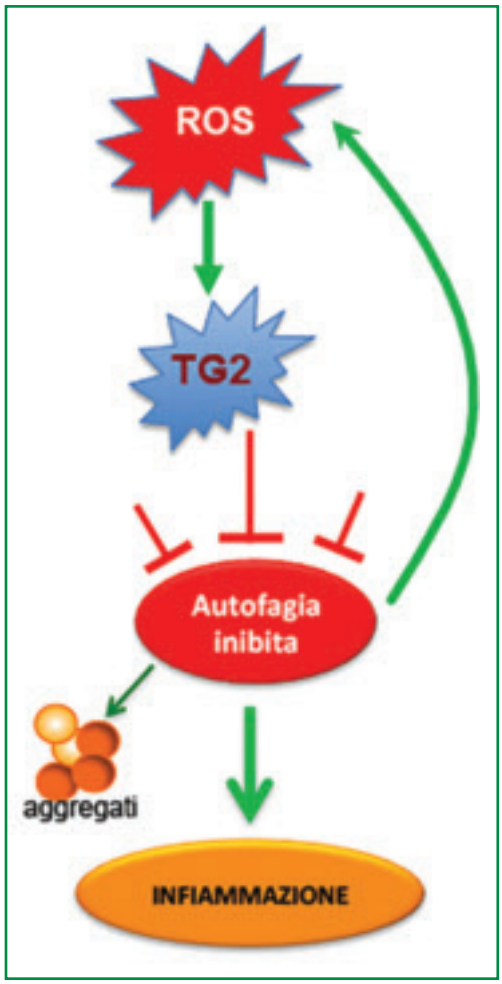


Figura 1 – La difettiva funzione della CFTR induce:
i) aumento dei livelli di ROS (stress ossidativo);
ii) attivazione della transglutaminasi 2 (TG2);
iii) inibizione di autofagia;
iv) accumulo di aggregati intracellulari;
v) infiammazione.
Il blocco dell'autofagia aumenta i livelli di ROS e determina un circolo vizioso che sostiene l'infiammazione.

persistere l'infiammazione. Infatti è sufficiente ripristinare una corretta risposta autofagica nell'animale (topo) portatore della più frequente mutazione (F508del) in omozigosi, sia mediante manipolazioni genetiche che con sostanze, quali la cisteamina, che "liberano" queste molecole necessarie all'autofagia, per avere un effetto importante nel ridurre l'infiammazione polmonare nonchè l'esagerata risposta infiammatoria a prodotti batterici di Pseudomonas aeruginosa (15,16). Inoltre, studi recenti indicano che la mancanza di una risposta autofagica è uno dei fattori importanti nell'ostacolare la rimozione di *Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia* dai macrofagi FC (14).

"Possibile normalizzare il meccanismo dell'autofagia FC?"

Queste piccole molecole, come appunto la cisteamina, non sono "anti-infiammatorie", ma controllano l'infiammazione polmonare in FC, cioè riequilibrano il sistema nelle cellule FC. Inoltre, il loro "effetto" benefico sull'infiammazione nell'animale omozigote per la F508del persiste per alcune settimane dopo la loro sospensione (15). Cosa conferisce a queste molecole queste proprietà e come è possibile che un effetto "farmacologico" duri tanto a lungo a prescindere dalla presenza del "farmaco"? Da quanto detto in precedenza, l'infiammazione in FC è conseguenza della mancanza di funzione della CFTR. E' intuitivo che, se la F508del-CFTR fosse stabilmente in membrana, il quadro infiammatorio sarebbe controllato. E' questo il principio su cui si basano le terapie con correttori e potenziatori della CFTR. I nostri studi dimostrano che, se si ripristina l'autofagia, si consente la correzione del difetto di traffico della proteina F508del-CFTR a livello cellulare a prescindere dall'uso dei correttori e la proteina permane stabile in membrana a prescindere dall'uso di potenziatori.

"Alla ricerca di farmaci per ripristinare la funzione autofagica FC. Potrebbero controllare l'infiammazione attraverso il recupero di CFTR- DF508 mutata"

Tuttavia, molecole come la cisteamina non hanno le proprietà dei correttori ma semplicemente ristabiliscono l'ambiente idoneo perché la proteina F508del-CFTR viaggi spontaneamente verso la membrana cellulare. Pertanto, non è la cisteamina a "correggere" l'infiammazione, bensì la CFTR stessa che, riportata in membrana, svolge la sua funzione (15,16). Infatti, se trattiamo le cellule epiteliali FC o i topi FC con cisteamina e poi sospendiamo la somministrazione, l'effetto a lungo termine sull'infiammazione si annulla se simultaneamente blocchiamo la funzione della CFTR (15). Quindi, in FC (almeno nel caso della F508del-CFTR) si potrebbe controllare l'infiammazione senza l'uso di anti-infiammatori, correggendo il difetto della proteina mutata senza l'uso di correttori (fig. 2).

Perché? Questi dati confermano che la mancanza di funzione della CFTR determina uno squilibrio dell'ambiente intracellulare, cioè altera la normale "proteostasi" (equilibrio del sistema proteico intracellulare) (16). Questi dati sono stati confermati su cellule primarie direttamente

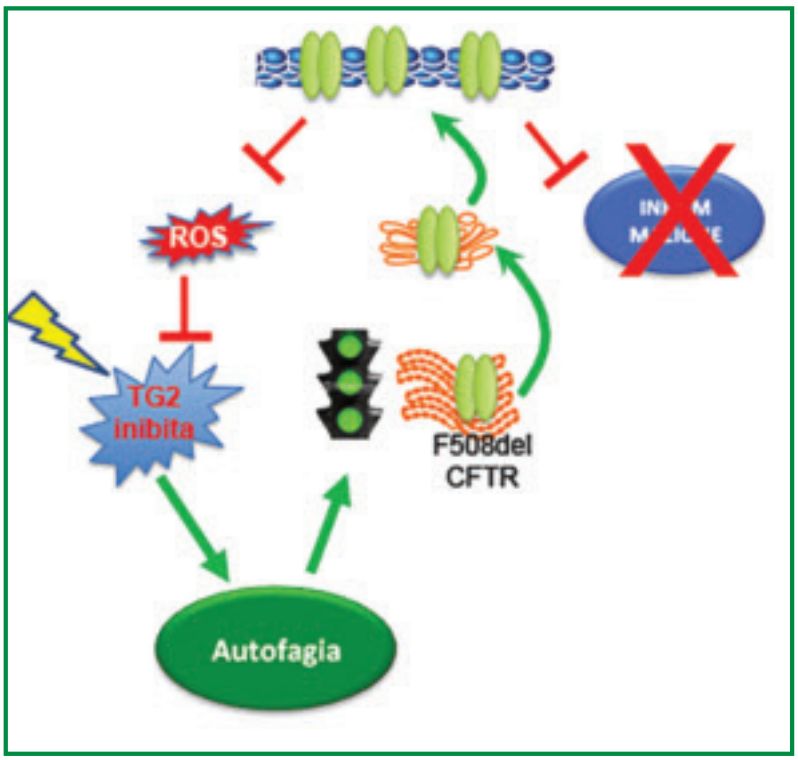


Figura 2 – L'inibizione della TG2 con induzione di autofagia favorisce il traffico della F508del-CFTR sulla membrana cellulare e ne aumenta la stabilità.
La ripristinata funzione della CFTR controlla i livelli di ROS, mantiene una appropriata risposta autofagica e controlla l'infiammazione.

prelevate da pazienti omozigoti per la F508del-CFTR mediante brushing della mucosa nasale, una metodica incruenta e ben tollerata che consente di testare il comportamento di cellule respiratorie direttamente prelevate "a fresco" senza alcuna manipolazione sperimentale. Se questa procedura da un lato può rappresentare un eccellente modello di predittività individuale di risposta ad un ipotetico trattamento farmacologico, e quindi rappresentare anche un test di efficacia di terapia in corso di trials clinici, dall'altro può rappresentare la sede accessibile in vivo in cui monitorare marcatori di "infiammazione" in FC. L'infiammazione FC é spesso un evento "locale" e monitorare l'andamento dell'infiammazione a livello respiratorio potrebbe fornire uno strumento diagnostico di notevole interesse.

Ovviamente sarebbe auspicabile che molti sforzi della ricerca in FC fossero indirizzati verso una standardizzazione di tali procedure per fornire al clinico e al paziente strumenti di monitoraggio adeguati ai percorsi patogenetici della malattia.

Riferimenti bibliografici

1. *Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. Cohen-Cymberknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. Thorax. 2013 Dec;68(12):1157-62. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203204. Epub 2013 May 23. Review.*
2. *Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, Iuliano L, Piroddi M, Dechecchi MC, Cabrini G; Working Group on Inflammation in Cystic Fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2012;1822(5):690-713.*
3. *Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. Clin Rev Allergy Immunol. 2008 Dec;35(3):135-53.*
4. *Modulators of sphingolipid metabolism reduce lung inflammation. Dechecchi MC, Nicolis E, Mazzi P, Cioffi F, Bezzerri V, Lampronti I, Huang S, Wiszniewski L, Gambari R, Scupoli MT, Berton G, Cabrini G. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Oct;45(4):825-33.*
5. *Phospholipase C-β3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. Bezzerri V, d'Adamo P, Rimessi A, Lanzara C, Crovella S, Nicolis E, Tamanini A, Athanasakis E, Tebon M, Bisoffi G, Drumm ML, Knowles MR, Pinton P, Gasparini P, Berton G, Cabrini G. J Immunol. 2011 Apr 15;186(8):4946-58.*
6. *Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies. Dhooghe B, Noël S, Huaux F, Leal T. Clin Biochem. 2013 Dec 29. pii: S0009-9120(13)00605-X. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.12.020*
7. *Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for cystic fibrosis. Lands LC, Stanojevic S. Cochrane Database SystRev 2013:CD001505.*
8. *Clinical use of ibuprofen is associated with slower fev1 decline in children with cystic fibrosis. Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:1084-1089.*
9. *http://www.cff.org/treatments/Pipeline/*
10. *Trimethylangelicin reduces IL-8 transcription and potentiates CFTR function. Tamanini A, Borgatti M, Finotti A, Piccagli L, Bezzerri V, Favia M, Guerra L, Lampronti I, Bianchi N, Dall'Acqua F, Vedaldi D, Salvador A, Fabbri E, Mancini I, Nicolis E, Casavola V, Cabrini G, Gambari R. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;300(3):L380-90. doi: 10.1152/ajplung.00129.2010.*

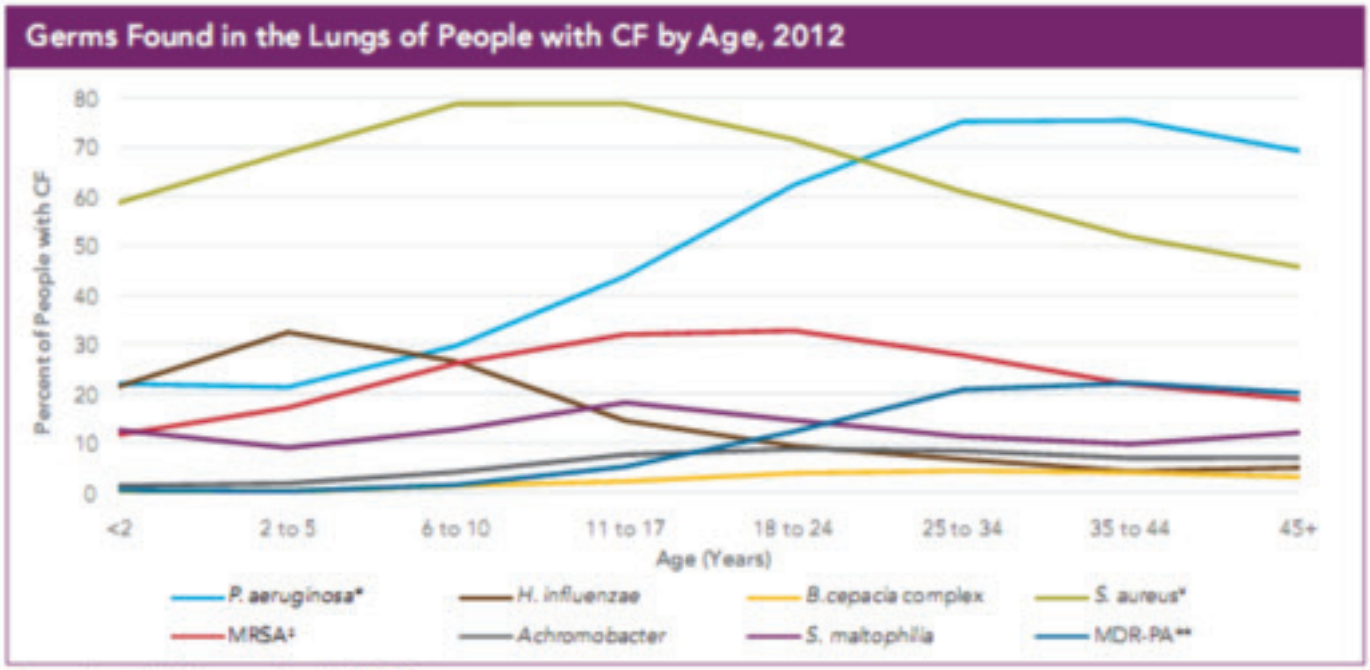
11. *Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. Luciani A, Villella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina D, Settembre C, Gavina M, Pulze L, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, D'Apolito M, Guido S, Masliah E, Spencer B, Quaratino S, Raia V, Ballabio A, Maiuri L. Nat Cell Biol. 2010 Sep;12(9):863-75.*
12. *The emerging potential of autophagy-based therapies in the treatment of cystic fibrosis lung infections. Junkins RD, McCormick C, Lin TJ. Autophagy. 2014;10(3):538-547.*
13. *The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases. Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, Choi AM. Chest. 2012 Nov;142(5):1289-99. doi: 10.1378/chest.12-0809.*
14. *Depletion of the ubiquitin-binding adaptor molecule SQSTM1/p62 from macrophages harboring cftrΔF508 mutation improves the delivery of Burkholderiacenocepacia to the autophagic machinery. Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, Caution K, Tazi M, Hassan H, Zhang Y, Rowland PD, Malhotra S, Aeffner F, Davis IC, Valvano MA, Amer AO. J Biol Chem. 2013;288(3):2049-58.*
15. *Targeting autophagy as a novel strategy for facilitating the therapeutic action of potentiators on ΔF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Luciani A, Villella VR, Esposito S, Gavina M, Russo I, Silano M, Guido S, Pettoello-Mantovani M, Carnuccio R, Scholte B, De Matteis A, Maiuri MC, Raia V, Luini A, Kroemer G, Maiuri L. Autophagy. 2012;8(11):1657-72.*
16. *Disease-relevant proteostasis regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Villella VR, Esposito S, Bruscia EM, Vicinanza M, Cenci S, Guido S, Pettoello-Mantovani M, Carnuccio R, De Matteis MA, Luini A, Maiuri MC, Raia V, Kroemer G, Maiuri L. Cell Death Differ. 2013;20(8):1101-15.*

Novità nelle strategie di cura dell'infezione polmonare in FC

Giovanni Taccetti
(Centro Regionale Fibrosi Cistica,
Azienda Ospedaliera Universitaria "Meyer", Firenze)

Insieme al miglioramento complessivo della qualità dell'assistenza, uno dei fattori responsabili del miglioramento della prognosi dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) è stata l'introduzione nella pratica clinica di nuovi antibiotici (1-3). Ogni volta che un nuovo antibiotico si è reso disponibile per contrastare le infezioni batteriche a livello delle vie aeree è stato osservato un incremento delle aspettative di vita dei pazienti. Le infezioni batteriche continuano a rivestire un ruolo importante nella FC poiché rappresentano ancor oggi la principale causa di morbilità e mortalità.

L'approccio clinico al paziente si basa ancora sulle indagini microbiologiche tradizionali: un'accurata identificazione della flora patogena a livello delle vie aeree è la premessa indispensabile per l'attuazione delle corrette strategie di cura. I germi patogeni più comunemente responsabili delle infezioni polmonari in FC sono *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Altre specie batteriche come *Haemophilus influenzae, Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter xylosoxidans, Stenotrophomonas maltophilia* e micobatteri non tubercolari sono in genere isolate con minor frequenza. L'acquisizione di tali batteri avviene principalmente dall'ambiente ma è ben descritta la possibilità di contagio da altri pazienti FC nel caso non vengano osservate opportune precauzioni (1-5).



*P. aeruginosa includes people with MDR-PA.
**MDR-PA is multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa).
* S. aureus includes people with MRSA.
‡ MRSA is methicillin-resistant Staphylococcus aureus (S. aureus).

Figura 1 – Microbiologia delle infezioni batteriche polmonari per fasce di età. I dati sono tratti dal Registro Nord Americano Fibrosi Cistica 2012 (1). Si sottolinea l'incremento progressivo di Pesudomonas aeruginosa (azzurro chiaro) e la progressiva diminuzione di Staphylococcus aureus (verde) dopo l'adolescenza

Novità sui principali germi patogeni

P. aeruginosa è il germe che colonizza più frequentemente le vie aeree dei pazienti FC, con una prevalenza dell'80% in età superiore a 18 anni (1,3). È ormai noto che l'infezione cronica da parte di questo microorganismo condiziona la prognosi poiché in assenza di cure si verifica un lento e progressivo decremento della funzionalità respiratoria nel tempo (1-5). Dati recentemente pubblicati sottolineano il probabile ruolo dei seni paranasali come sede iniziale d'infezione. È ipotizzabile che a livello di queste cavità si verifichi il progressivo e complesso adattamento genetico di *P. aeruginosa* e quindi la trasformazione del germe da patogeno ambientale a patogeno altamente adattato alle vie aeree dei pazienti FC (6,7). Le modalità di diagnostica microbiologica e di monitoraggio dell'infezione a livello dei seni paranasali sono attualmente aree di ricerca. La chiara dimostrazione del ruolo dei seni paranasali nel favorire l'infezione polmonare da *P. aeruginosa* potrebbe consentire la pianificazione di strategie terapeutiche per la prevenzione dell'infezione polmonare cronica. Una maggiore attenzione nei confronti dei seni paranasali potrebbe inoltre consentire un'ulteriore diminuzione della prevalenza di *P. aeruginosa* a livello polmonare, riducendo la morbilità e mortalità da essa causate (6,7).

"Seni paranasali sede iniziale di infezione da Ps. aeruginosa"

Staphylococcus aureus è in genere il microrganismo isolato dalle vie aeree dei pazienti con FC nei primi mesi ed anni di vita. Le ragioni della propensione di *S. aureus* a colonizzare i fibrocistici sono scarsamente note. I danni causati da questo microorganismo a livello polmonare sembrerebbero favorire la colonizzazione successiva da parte di altri patogeni, in particolare da parte di *P. aeruginosa*. Nell'ultimo decennio è stata segnalata, ed è fonte di preoccupazione, l'emergenza di ceppi di *Staphylococcus aureus meticillino*-resistente (MRSA), oggi ritenuti responsabili di un declino più consistente della funzionalità respiratoria (1,3,8,9).

"Il ruolo di Stafilococco aureo"

Burkholderia cepacia complex è un gruppo di batteri definiti come "gram negativi non fermentanti" (in base ad alcune caratteristiche chimiche e della colorazione che assumono) costituito da sottospecie diverse, dette *genomovar* (3). Le sottospecie di B. *cepacia* più frequentemente descritte sono B. *cenocepacia* e *B. multivorans*. La corretta identificazione del germe è di vitale importanza per evitare la possibilità di infezioni crociate attraverso l'attuazione di idonee misure di segregazione (3,5). Oggi la prevalenza di *B. cenocepacia* si è ridotta per l'attuazione di drastiche misure di controllo delle infezioni (3). I pazienti infettati da *B.cepacia* complex hanno una maggiore tendenza ad un progressivo peggioramento della funzione polmonare rispetto ai non infettati. La presenza di *B.cepacia* complex in fase pre-trapianto può associarsi ad un andamento meno favorevole dopo l'intervento (11).

"B. cepacia: problematica ma in diminuzione"

S. maltophilia è un bacillo gram negativo multiresistente. La prevalenza di *S. maltophilia* varia molto da centro a centro, ed è compresa fra il 3% e il 7%. Nonostante in letteratura esistano segnalazioni di un aumento nella frequenza di isolamento di *S. maltophilia* in pazienti con fibrosi cistica, il ruolo del germe sul decorso della malattia polmonare non è ancora ben definito (12-14). Secondo alcune casistiche l'impatto di *S. maltophilia* sulla malattia polmonare appare modesto. La presenza cronica del germe nelle vie aeree può tuttavia essere ritenuta un fattore di rischio per le esacerbazioni polmonari.

Achromobacter xyloxidans è un bacillo gram negativo. La colonizzazione cronica da questo germe appare infrequente. Talora si associa a un deterioramento delle condizioni respiratorie e di quelle cliniche (15).

"Altri batteri importanti"

I Micobatteri Non Tubercolari (MNT): (*detti così per distinguerli dal micobatterio più "famoso" che è quello responsabile della tubercolosi, n.d.r.*) hanno ampia diffusione. Esistono numerose spe-

cie di MNT, le più frequentemente isolate dal tratto respiratorio di pazienti FC sono *Mycobacterium avium* complex (72%) e *Mycobacterium abscessus* (16%). Non è semplice determinare se il paziente sia solo colonizzato o infettato da micobatteri (*ricordiamo che per colonizzazione si intende la semplice presenza del batterio, per infezione un'azione aggressiva del batterio cui corrisponde una risposta difensiva dell'ospite, n.d.r.*) Molti pazienti hanno solo una colonizzazione transitoria. In base alle indicazioni della letteratura, tali microrganismi devono essere ricercati almeno una volta all'anno (16). Recentemente è stata dimostrata la possibilità di infezioni crociate da *Mycobacterium abscessus* fra pazienti FC (17).

Gli ultimi approcci molecolari hanno evidenziato che nel polmone FC non sono presenti solamente le poche specie batteriche che normalmente si isolano nei campioni respiratori, ma è presente un'intera comunità di batteri, detta "microbiota", costituita da innumerevoli specie batteriche che cooperano con un reciproco vantaggio. La maggior parte di queste specie non possono essere isolate con i normali mezzi di coltura. Questi microrganismi costituiscono una comunità in equilibrio dinamico, i cui membri comunicano tra loro. L'eterogeneità di questa comunità è importante nel mantenere le difese polmonari. È stato osservato che nei pazienti FC, all'inizio della malattia, la comunità batterica a livello polmonare è molto varia mentre il numero delle specie si riduce progressivamente nella fase di cronicità dell'infezione. In attesa che l'impiego di tecnologie molecolari porti a una migliore definizione dei patogeni coinvolti nella malattia polmonare, esiste solo un limitato numero di studi sul microbiota (18,19) in FC e manca ancora una sua validazione sul piano terapeutico.

Novità e prospettive nelle strategie di uso dei farmaci nella fase di cronicità delle infezioni batteriche

Nella fase di cronicità delle infezioni batteriche FC le strategie terapeutiche variano a seconda che si debba affrontare il problema del trattamento degli episodi di esacerbazione infettiva o dell'infezione cronica di per sé.
Esistono schemi ben standardizzati sia per il trattamento delle esacerbazioni che dell'infezione cronica per quanto riguarda *P. aeruginosa*, ci sono minori evidenze e certezze per gli altri batteri.

Esacerbazione polmonare da P. aeruginosa

Nel caso di grave esacerbazione polmonare la terapia antibiotica per via parenterale rappresenta il cardine del trattamento. Di solito viene usata un'associazione fra beta-lattamico (*antibiotico appartenente alla categoria dei betalattamici, il cui capostipite è la penicillina: ne fanno parte ceftazidime, piperacillina, imipenem , meropenem, ed altri, n.d.r.*) e tobramicina. Per quanto riguarda il trattamento per via parenterale il ceftazidime somministrato 3 volte al dì non è meno efficace rispetto all'infusione continua dello stesso antibiotico. La strategia di somministrazione della tobramicina è invece cambiata nel tempo, poiché è stato dimostrato che la somministrazione in monodose (una sola volta al giorno) determina un incremento dei picchi plasmatici, migliora l'efficacia e riduce il rischio di tossicità. Ad oggi la durata ottimale del trattamento antibiotico per via parenterale non è stata definita. Una durata inferiore alle 2 settimane, classicamente usata nella pratica clinica, potrebbe determinare una riduzione dell'incidenza degli effetti indesiderati e dei costi ma non essere sufficiente a determinare la completa risoluzione dell'esacerbazione (2,20,21).

Infezione cronica da *P. aeruginosa* e trattamenti per via inalatoria

In pazienti con infezione cronica da *P. aeruginosa* e in condizioni cliniche stabili la terapia con antibiotici formulati in soluzioni per via inalatoria (terapia cronica soppressiva) rappresenta oggi lo standard del trattamento (24). In passato venivano somministrati per via aerosolica preparati per via parenterale e formulazioni estemporanee, la cui eterogenea composizione rendeva difficile la valutazione della reale efficacia delle terapie e esponeva a effetti indesiderati. Nell'ultimo ventennio l'efficacia di nuovi farmaci e la loro introduzione in terapia è stata supportata da rigoro-

si studi clinici. Con queste basi sono state introdotte nella pratica clinica specialità medicinali idonee alla somministrazione per via inalatoria.
La tobramicina in soluzione per via inalatoria e somministrata a mesi alterni e a cicli ripetuti di 28 giorni si è dimostrata efficace in pazienti con infezione cronica da *P. aeruginosa* di età superiore a 6 anni. L'effetto su FEV1 e la riduzione di mortalità, esacerbazioni, ricoveri ospedalieri sono stati dimostrati da trials clinici (24,25). Il classico schema di trattamento con tobramicina per via inalatoria a mesi alterni è diventato anche il termine di paragone per gli studi finalizzati a valutare l'efficacia di altri antibiotici somministrabili per via inalatoria.

"La grande svolta: antibiotici per via inalatoria nell'infezione cronica da Ps. aeruginosa"

Oggi altre specialità per via inalatoria, come ad esempio l'aztreonam lisina (AZLI), si sono dimostrate efficaci nei confronti dell'infezione cronica da *P. aeruginosa* e sono state più recentemente introdotte nella pratica clinica (vedi Fig.2). Altre formulazioni di farmaci per via inalatoria come l'amikacina, la levofloxacina e l'associazione tobramicina-fosfomicina sono attualmente in corso di studio. L'utilità della colistina per via inalatoria non è stata inizialmente supportata da trial clinici ma l'esperienza è maturata con la pratica clinica.

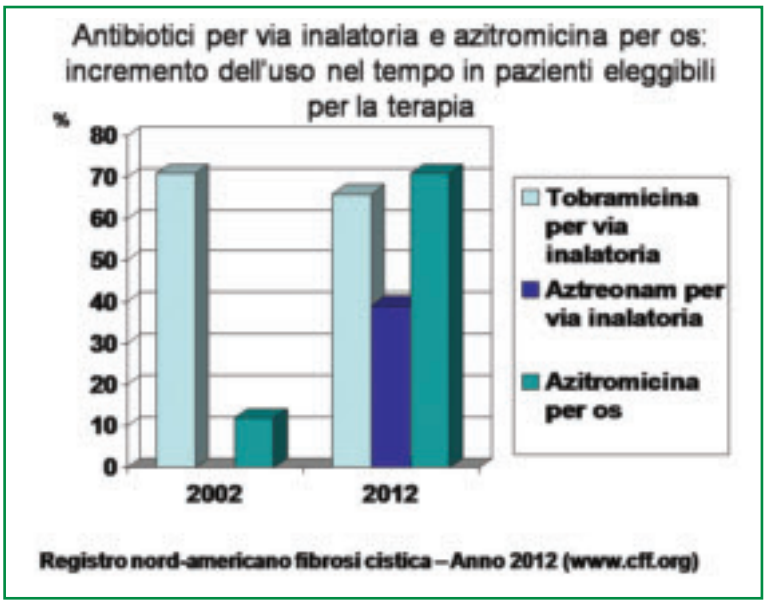


Figura 2 – Nel 2012 sono in trattamento con tobramicina e aztreonam per via aerosolica rispettivamente il 66 % e il 39% dei pazienti con infezione da P. aeruginosa; è in trattamento con azitromicina per bocca il 70% dei pazienti con infezione da P.aeruginosa. Rispetto al 2002 è nettamente cresciuta la numerosità complessiva dei pazienti in trattamento antibiotico aerosolico; assume nuova importanza quella dei pazienti in trattamento con azitromicina per bocca.

La somministrazione di soluzioni per inalazione ha varie problematiche perché il farmaco deve essere conservato in frigorifero e deve essere ricostruito subito prima della somministrazione con appositi nebulizzatori. Una particolare attenzione deve essere riservata alle misure igieniche per evitare la contaminazione batterica ed è necessaria una fonte di energia per la nebulizzazione.
La possibilità di somministrare antibiotici in modo da ridurre il tempo speso per l'intero processo di nebulizzazione, ha rappresentato un significativo avanzamento della terapia poiché la compliance dei pazienti nei confronti del trattamento è migliorata. In questo scenario hanno trovato la propria collocazione le polveri per inalazione (tobramicina e colistina), somministrabili attraverso appositi dispositivi (26,27). Studi clinici condotti in pazienti oltre i 6 anni di età hanno dimostrato una sostanziale efficacia fra soluzioni per via inalatoria e polveri. Le polveri consentono che a livello polmonare vengano raggiunte concentrazioni di farmaco efficaci in un periodo di tempo ridotto rispetto alla somministrazione di soluzioni con i classici apparecchi per nebulizzazione. Anche per questo sono state ben accettate dai pazienti affetti da FC (26,27).

"Tempi più rapidi di terapia con inalazione di antibiotici in polvere"

Recentemente la strategia di somministrazione dei farmaci per via inalatoria a mesi alterni ha cominciato a essere criticata nella pratica clinica (24). È opinione corrente che nel mese "off" venga perso il reale miglioramento della funzione polmonare acquisito nei mesi "on". L'andamento del FEV1 nel tempo ha evidenziato che effettivamente nel mese "off" diminuiscono i valori della funzionalità respiratoria. È nata quindi spontanea la domanda se dovrebbe essere sospeso un trattamento efficace. Inoltre, a distanza di tempo dal suo primo impiego, la sommi-

"Inalazione a mesi alterni o in continuazione?"

nistrazione di antibiotici per via inalatoria si è dimostrata sicura e non sono stati dimostrati nel lungo periodo effetti indesiderati significativi sulla funzionalità renale o ototossicità. Lo sviluppo di resistenze batteriche e la possibilità di isolamento di ceppi di germi naturalmente resistenti non sembrano problematiche clinicamente rilevanti.

La possibilità di avere oggi a disposizione più classi di antibiotici somministrabili per via inalatoria ed efficaci nei confronti di *P.aeruginosa* consente di prospettare la possibilità di un uso continuativo di farmaci per via inalatoria, con piani di trattamento più articolati. L'ipotesi di una maggiore efficacia del trattamento antibiotico continuativo per via inalatoria rispetto al trattamento a mesi alterni rimane da verificare con studi clinici. Studi finalizzati a valutare l'efficacia dell'uso continuativo di farmaci per via inalatoria, alternando mensilmente vari tipi di principio attivo, sono oggi fattibili ma c'è necessità di un alto numero di partecipanti e di una lunga osservazione per poter verificare l'eventuale maggior efficacia di nuovi schemi di trattamento rispetto a quelli attualmente esistenti.

Infezione cronica da *P. aeruginosa* e trattamento con azitromicina per os

Importanti studi clinici hanno sottolineato l'utilità del trattamento con azitromicina per os in pazienti con infezione cronica da *P. aeruginosa*. I pazienti infettati da *P. aeruginosa* trattati con azitromicina soffrivano di un minor numero di esacerbazioni polmonari nel corso di un periodo di osservazione di 6 mesi. L'azitromicina è un antibiotico classicamente non attivo nei confronti di *P. aeruginosa* e gli effetti benefici osservati potrebbero essere attribuibili ad un suo effetto sul biofilm di *P. aeruginosa* oppure ad un concomitante effetto anti-infiammatorio del farmaco. A questo proposito è stato dimostrato che il trattamento con azitromicina determina una riduzione di alcuni markers di infiammazione (28).

"Azitromicina: effetto antinfiammatorio"

Di recente è stato ipotizzato che possa esistere un antagonismo fra azitromicina assunta per bocca e tobramicina per via inalatoria, ipotesi legata ad alcuni studi clinici (29) e saggi su colture di batteri: l'effetto di questo antagonismo sarebbe una riduzione del potere battericida (*capacità di distruggere i batteri, ndr*) della tobramicina da parte dell'azitromicina. Il significato clinico di tali osservazioni necessita di essere attentamente verificato nella pratica clinica. Poiché l'efficacia di ognuno dei farmaci menzionati, quando usati singolarmente, è stata chiaramente dimostrata, non è raccomandabile la sospensione di trattamenti di chiara efficacia, in assenza di verifiche condotte con studi clinici ben disegnati.

Esacerbazione polmonare da *S. aureus* e MRSA

Per quanto concerne *S. aureus* e MRSA nel caso di esacerbazione polmonare grave si ricorre alla terapia parenterale (2). Negli ultimi anni la ricerca medica maturata in aree diverse dalla FC ha portato alla scoperta di nuovi principi attivi efficaci sia nei confronti di *S. aureus* che di MRSA: uno dei nuovi antibiotici messi a punto in questo modo è il linezolid, oggi utilizzato anche in pazienti FC (30).

"S. aureus e linezolid"

Infezione cronica da *S. aureus*

Nella fase di cronicità dell'infezione in pazienti infettati da *S. aureus* o MRSA non è stata ancora maturata una strategia di trattamento supportata da chiare evidenze scientifiche. Gli antibiotici in studio sono la vancomicina, che è oggetto di trials in cui viene sperimentata (attraverso inalazione di polvere) come terapia cronica soppressiva nell'infezione persistente da MRSA (31). Inoltre l'azitromicina: in uno studio randomizzato di 24 settimane in pazienti prevalentemente infettati da *S. aureus* ha portato ad una riduzione delle esacerbazioni. L'uso dell'azitromicina in pazienti infettati da *S. aureus* è stato associato ad una diminuzione della prevalenza di questo patogeno nelle vie aeree ma è stato osservato un incremento della resistenza (28). Il significato di tali osservazioni deve essere verificato in ambito clinico.

Infezione da *B. cepacia*

Anche nei confronti di *B. cepacia*, patogeno altamente resistente agli antibiotici, non è stata ancora maturata una strategia di trattamento supportata da evidenze scientifiche (2, 20). Nel caso di esacerbazione respiratoria viene eseguita una terapia antibiotica per via parenterale sulla base delle prove di sensibilità in vitro. Non esistono tuttavia indicazioni basate su prove di efficacia per quanto riguarda il trattamento cronico soppressivo con farmaci somministrati per via inalatoria. L'AZLI somministrata per via inalatoria non si è dimostrata efficace nell'uso clinico in pazienti con infezione da *B. cepacia* (32).

"Quali antibiotici per B. cepacia?"

Novità e prospettive nelle strategie di uso dei farmaci nelle fasi iniziali dell'infezione batterica.

La somministrazione di antibiotici si è dimostrata altamente efficace anche nel trattamento delle fasi iniziali dell'infezione (2, 20, 33-36). Un tempestivo trattamento al momento dell'isolamento iniziale di *P. aeruginosa* ha significativamente ridotto la possibilità di sviluppare l'infezione cronica, fenomeno classicamente associato a declino più consistente del FEV1 e a incremento della morbilità e mortalità. Nel caso di *P. aeruginosa* lo schema di trattamento eradicante si basa sulla tempestiva somministrazione di un farmaco per via inalatoria associato o meno a terapia orale.

"Trattamento precoce di P. aeruginosa"

Riguardo a *P. aeruginosa* non è ancora noto quale sia il trattamento più efficace. Il paragone fra studi è difficile poiché esistono notevoli differenze per quanto riguarda la definizione di eradicazione, le associazioni di farmaci scelti e la durata del trattamento (33-36). È intuitivo pensare che un trattamento eradicante con 2 farmaci possa essere più efficace nel favorire l'eliminazione di *P. aeruginosa* rispetto a trattamenti con un solo farmaco.

L'esperienza europea si basa effettivamente sull'uso della colistina per via inalatoria associata a ciprofloxacin per os (33-35). Esperienze nord-americane condotte utilizzando associazioni di tobramicina per via inalatoria a ciprofloxacin per os hanno tuttavia evidenziato che l'aggiunta di ciprofloxacin per os non determina ulteriori e sostanziali benefici rispetto alla sola tobramicina per via inalatoria (36).

"Eradicazione di P. aeruginosa: schemi diversi, risultati simili"

Pur in mancanza di uno standard di riferimento per il trattamento eradicante, è interessante notare che i vari schemi finora adottati sembrano avere risultati comparabili, indipendentemente dal tipo di regime scelto. Poiché la prima infezione può verificarsi in età inferiore a 5 anni le soluzioni per via inalatoria appaiono più facilmente somministrabili ma ad oggi non esistono studi clinici volti a valutare l'efficacia dell'uso di polveri nell'eradicazione.

Di recente è stata valutata l'utilità della profilassi antibiotica per la prevenzione dell'infezione iniziale da *P. aeruginosa* (37). La somministrazione di 3 settimane di ciprofloxacin per os e colistina per via inalatoria per un periodo di 3 mesi non ha portato a sostanziali differenze nell'acquisizione di *P. aeruginosa* fra il gruppo di pazienti sottoposti a profilassi e il gruppo di pazienti in osservazione.

Per patogeni diversi da *P. aeruginosa* è ancora da dimostrare l'utilità del trattamento eradicante. Esistono studi in corso sull'efficacia del trattamento eradicante nell'infezione iniziale da MRSA. Tali studi sono condotti utilizzando farmaci somministrati prevalentemente per via non inalatoria. Recentemente è stata suggerita la possibilità di trattare con efficacia le fasi iniziali dell'infezione da *A. xylosoxidans* (15) e *B. cepacia*. Mancano tuttavia ancora dati su larga scala per valutare la reale efficacia della strategia eradicante.

Linee di sviluppo di nuovi antibiotici per la fibrosi cistica

Per quanto riguarda le linee di sviluppo degli antibiotici l'analisi della letteratura evidenzia che manca una linea di sviluppo di antibiotici specifici per la FC per via parenterale. Come è avvenuto per MRSA, è ipotizzabile che le novità nella ricerca in questo settore si verifichino in campi dell'infettivologia che non riguardano esclusivamente la FC. Con queste prospettive è necessario ottenere il massimo dagli antibiotici per via parenterale che oggi abbiamo a disposizione. Un uso coscienzioso degli antibiotici, una prescrizione razionale e un miglioramento delle pratiche di controllo delle infezioni all'interno degli ospedali può aiutare a conservare a lungo l'efficacia degli antibiotici per via parenterale attualmente a nostra disposizione.

"Ricerca di nuovi antibiotici"

Lo sviluppo di antibiotici per via inalatoria ha come campo principale di interesse la fase cronica dell'infezione. In questo settore la linea di sviluppo di antibiotici per via inalatoria è molto più ricca rispetto al passato, ma non è differenziata per il trattamento di patogeni diversi da *P. aeruginosa*. Infatti, nei pazienti infettati da tali patogeni rimane ancora da dimostrare l'utilità del trattamento soppressivo cronico. Non esiste infine una linea di sviluppo di antibiotici specifica per il trattamento eradicante precoce nei confronti di *P. aeruginosa*. Gli antibiotici, una volta usati nella fase di cronicità dell'infezione, finiscono con il guadagnare spazio anche nel trattamento della fase iniziale.

Grazie alla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica sono nate e si stanno affermando in Italia iniziative di ricerca in campo antimicrobico nei confronti dei principali germi patogeni (37). Sono in corso studi preclinici per lo sviluppo di peptidi antimicrobici, brevi sequenze di aminoacidi con funzioni di difesa antibatterica, efficaci in vitro nei confronti di isolati clinici di *P. aeruginosa*. Inoltre sono in fase di studio e di sviluppo polveri che potrebbero essere utili per la somministrazione di peptidi antimicrobici umani. Molecole antibatteriche attive nei confronti del biofilm di *P. aeruginosa* sono oggetto di studio, così come composti con attività antibatterica nei confronti di MRSA.

"Nuove prospettive: peptidi antimicrobici"

Sono inoltre in corso iniziative promettenti verso l'identificazione di nuovi composti attivi nei confronti dell'infezione da *B. cepacia* complex. È stato osservato che microrganismi viventi in ambienti estremi, quali ad esempio i batteri antartici, adottano per la loro sopravvivenza la strategia di produrre molecole dotate di attività antimicrobica. Gli antibiotici prodotti da tali microrganismi sono attualmente oggetto di interesse per *B. cepacia* complex.

Novità nel campo dell'analisi metodologica degli studi clinici

Accanto a una ricerca fatta in laboratorio o in campo clinico, negli ultimi anni si è venuta ad affermare in campo medico una ricerca basata sulla revisione della metodologia con la quale sono stati condotti gli studi clinici in aree omogenee di ricerca. A livello internazionale sono sorte iniziative per raccogliere, valutare criticamente e diffondere le informazioni relative all'efficacia ed alla sicurezza degli interventi sanitari. A questa realtà non si è sottratta la comunità scientifica che si occupa di fibrosi cistica e sono stati prodotti documenti sull'efficacia e sicurezza degli interventi sanitari volti a prevenire e curare le infezioni respiratorie (38).

"Terapie con prove di efficacia"

Ad oggi le aree in cui sono state meglio documentate le prove di efficacia sono la somministrazione di tobramicina per via parenterale in dose singola giornaliera, il trattamento eradicante dell'infezione precoce da *P. aeruginosa*, il trattamento con azitromicina e la terapia cronica di mantenimento con antibiotici per via inalatoria nell'infezione cronica da *P. aeruginosa*. Molte altre aree della fibrosi cistica hanno attualmente necessità di andare incontro a revisione critica e ad aggiornamento periodico in base ai risultati degli studi attualmente in corso.

Novità nell'ambito della standardizzazione di metodologie e di definizioni relative allo status microbiologico dei pazienti.

Nel corso dell'ultimo decennio la comunità scientifica a livello internazionale ha lavorato per uniformare procedure laboratoristiche per la corretta identificazione dei patogeni respiratori e per standardizzare le definizioni relative allo status microbiologico dei pazienti. È stata inoltre creata una rete per la partecipazione agli studi clinici e per fornire standard di cura da adottare in tutti i Centri FC (39).
L'organizzazione eterogenea delle strutture sanitarie ha necessità di un attento monitoraggio per continuare nel lento ma complessivo miglioramento nell'approccio alla diagnostica e al trattamento delle infezioni respiratorie in fibrosi cistica.

Ringraziamento. *Si ringrazia la dott. Silvia Campana (Centro Regionale Fibrosi Cistica,Azienda Ospedaliera Universitaria "Meyer", Firenze) per la revisione critica del manoscritto.*

Riferimenti bibliografici

1. *Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2012 Annual Data Report. Accessed April, 12th, 2014 at http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2012-Patient-Registry.pdf.*
2. *Döring G, Flume P, Heijerman H, et al. for the Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. J Cyst Fibros 2012 ;11:461- 479.*
3. *Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2010;23:299-323.*
4. *Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168:918-951.*
5. *Saiman L and Siegel J. Infection and control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission . Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: S6-S52.*
6. *Aanæs K.Bacterial sinusitis can be a focus for initial lung colonisation and chronic lung infection in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12 Suppl 2:S1-20.*
7. *Aanaes K, Johansen HK, Skov M, et al. Clinical effects of sinus surgery and adjuvant therapy in cystic fibrosis patients - can chronic lung infections be postponed? Rhinology. 2013 ;51:222-230.*
8. *Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M et al. Persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 178: 814-821.*
9. *Taccetti G, Neri AS, Festini F et al. Methicillin resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2008;43:309*
10. *Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M et al. Occurrence of multiple genomovars of Burkholderia cepacia in cystic fibrosis patients and proposal of Burkholderia multivorans sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 1188-1200.*
11. *Olland A, Falcoz PE, Kessler R, et al. Should cystic fibrosis patients infected with Burkholderia cepacia complex be listed for lung transplantation? Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2011;13:631-634.*
12. *Colin AA, Rabin HR. Stenotrophomonas maltophilia in cystic fibrosis: guilty or innocent? Am J Respir Crit Care Med. 2011 ;183:564-566.*
13. *Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML et al. Association between Stenotrophomonas maltophilia and lung function in cystic fibrosis. Thorax. 2004 ;59 :955-959.*
14. *Hansen CR. Stenotrophomonas maltophilia: to be or not to be a cystic fibrosis pathogen.*
15. *Curr Opin Pulm Med 2012;18:628-631.15. Wang M, Ridderberg W, Hansen CR, et al. Early treatment with inhaled antibiotics postpones next occurrence of Achromobacter in cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2013; 12:638-643*
16. *Oliver K, Weber Dj, Wallace RJ jr et al. Non tubercoulous Mycobacteria: Multicenter Prevalence Study in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167: 828-834.*
17. *Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet. 2013;381:1551-1560.*
18. *Mounier J, Gouëllo A, Keravec M, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to characterize the bacterial and fungal airway microbiota of cystic fibrosis patients. J Microbiol. 2014;52:307-314.*
19. *Twomey KB, Alston M, An SQ, et al. Microbiota and metabolite profiling reveal specific alterations in bacterial community structure and environment in the cystic fibrosis airway during exacerbation. PLoS One. 2013;8:e82432.*
20. *Doering G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European Consensus. J Cyst Fibros 2004; 3: 67-91*

21. *Cystic Fibrosis Trust Infection Control Group. Pseudomonas aeruginosa infection in people with cystic fibrosis: suggestion for prevention and infection control. Cystic Fibrosis Trust 2001.*
22. *Hubert D, Le Roux E, Lavrut T, et al. Continuous versus intermittent infusions of ceftazidime for treating exacerbation of cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:3650-3656.*
23. *Smyth A, Tan KH, Hyman-Taylor P, et al. Once versus three-times daily regimens of tobramycin treatment for pulmonary exacerbations of cystic fibrosis--the TOPIC study: a randomised controlled trial. Lancet. 2005;365:573-578.*
24. *Mogayzel PJ Jr, Naureckas ET, Robinson KA, et al.Pulmonary Clinical Practice Guidelines Committee. Standard of care Cystic fibrosis pulmonary guidelines. Chronic medications for maintenance of lung health. Am J Respir Crit Care Med. 2013 ;187:680-689.*
25. *Lo D, VanDevanter DR, Flume P, Smyth A. Aerosolized antibiotic therapy for chronic cystic fibrosis air way infections: continuous or intermittent? Respirastory Medicine 2011; 105: S9-S17*
26. *Konstan MW, Flume PA, Kappler M, et al. Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. J Cyst Fibros. 2011 ;10:54-61.*
27. *Schuster A, Haliburn C, Döring G, et al. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. Thorax. 2013;68:344-350.*
28. *Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, et al. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev 2012 Nov 14;11:CD002203.*
29. *Nick JA, Moskowitz SM, Chmiel JF, et al.Azithromycin may antagonize inhaled tobramycin when targeting Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Ann Am Thorac Soc. 2014 Mar;11:342-350.*
30. *Ferrin M, Zuckerman JB, Meagher A, et al.Successful treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus pulmonary infection with linezolid in a patient with cystic fibrosis.Pediatr Pulmonol. 2002 Mar;33:221-223.*
31. *ClinicalTrials.gov. Website. Efficacy and Safety Study of AeroVanc for the Treatment of Persistent MRSA Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients http://clinicaltrials.gov/show/NCT01746095*
32. *Tullis DE, Burns JL, Retsch-Bogart GZ, et al. Inhaled aztreonam for chronic Burkholderia infection in cystic fibrosis: A placebo-controlled trial. J Cyst Fibros. 2014;13:296-305.*
33. *Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, et al. Early antibiotic treatment for Pseudomonas aeruginosa eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. Thorax. 2012 ;67:853-859.*
34. *Hansen CR, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. J Cyst Fibros. 2008;7:523-530.*
35. *Ratjen F1, Munck A, Kho P, et al. Treatment of early Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. Thorax. 2010;65:286-291.*
36. *Treggiari MM, Retsch-Bogart G, Mayer-Hamblett N, et al. Early Pseudomonas Infection Control (EPIC) Investigators. Comparative efficacy and safety of 4 randomized regimens to treat early Pseudomonas aeruginosa infection in children with cystic fibrosis. Arch Pediatr Adolesc Med. 2011;165:847-856*
37. *Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica. XI Convention d'autunno dei ricercatori in fibrosi cistica. Verona 28-30 novembre 2013. Website. Accessed April, 12th, 2014 at http://www.fibrosicisticaricerca.it/Ricerca-e-Formazione/Brochures-seminari-convention/*
38. *The Cochrane Collaboration. Website. Accessed April, 12th, 2014 at http://www.cochrane.org/*
39. *European Cystic Fibrosis Society. Clinical Trial Network. Website. Accessed April, 12th, 2014 at https://www.ecfs.eu/ctn*

Consiglio di Amministrazione
Presidente Vittoriano Faganelli
Consiglieri Eugenio Bertolotti, Luigi Bozzini, Sandro Caffi, Paolo Del Debbio, Giuseppe Ferrari, Anna Maria Giunta, Matteo Marzotto, Gianni Mastella, Giulio Pedrollo, Michele Romano, Luciano Vettore

Direzione scientifica
Direttore Gianni Mastella
Vicedirettore Graziella Borgo

Comitato di consulenza scientifica
Presidente Lucio Luzzatto
Consulenti Giorgio Berton, Paola Bruni, Roberto Buzzetti

SERVIZI FFC
Presidenza e Segreteria
(V. Faganelli, G. Cadoni, F. Lavarini)
Tel.: 045 8123438-3597 – Fax 045 8123568
Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani 1
37126 Verona
fondazione.ricercafc@ospedaleuniverona.it
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it
Direzione Scientifica (G. Mastella)
Tel. 045 8123567
gianni.mastella@ospedaleuniverona.it
Vicedirezione Scientifica (G. Borgo)
Tel. 045 8127027 – 346 5126013
borgograziella@gmail.com
Direzione di Gestione (G. Zanferrari)
Tel. 045 8127028 – 333 3665597
giuseppe.zanferrari@gmail.com
Amministrazione (E. Fabietti, G. Cadoni)
Tel. 045 8123597 – 7029
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
Comunicazione
(M. Zanolli, R. Perbellini, S. Chignola)
Tel. 045 8123599 – 7026 – 7025
comunicazione.ffc@ospedaleuniverona.it
Ufficio stampa (P. Adami)
Tel.: 045 581893
patrizia@clabcomunicazione.it
Eventi/fund raising (G. Buemi, L. Fratta)
Tel. 045 8127033 – 7032
giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it
346 5121780
laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it
346 5122996
Coordinamento delegazioni, Gruppi, Volontari FFC (J. Bianchetti, M. Giacopuzzi, A. Chevalier, F. Cabianca)
Tel. 045 8123605 – 3604
jessica.bianchetti@fibrosicisticaricerca.it
marina.giacopuzzi@fibrosicisticaricerca.it
fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it
Sito internet:
www.fibrosicisticaricerca.it
Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica

ISTITUTO ITALIANO DONAZIONE
DONARE CON FIDUCIA

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

Presidente
VITTORIANO FAGANELLI

Direttore Scientifico
GIANNI MASTELLA

Presidente Comitato Scientifico
LUCIO LUZZATTO

Delegazioni della Fondazione

Avellino	349 3940749
Bari - Molfetta	349 6384907
Belluno	0437 943360
Bergamo - Trescore Balneario	338 4276716
Bergamo - Villa D'almè	335 8369504
Biella	331 9028525
Bologna	348 1565099
Cagliari	329 6241193
Catania	340 7808686
Catanzaro - Soverato	347 5283975
Cecina e Rosignano	340 6113886
Cosenza	349 0519433
Cosenza 2	347 9041138
Cuneo - Alba	333 6301943
Fermo	339 4758897
Ferrara	347 4468030
Foggia	320 4848190
Genova	348 1634818
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	328 8957499
Livorno	0586 808093
Lodi	347 0969534
Lucca	340 3436289
Mantova	335 7077280
Matera Montescaglioso	329 6016214
Messina	349 7109375
Milano	335 456809
Napoli	338 8099917
Napoli - Pompei	081 679151
Novara	331 7287449
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	334 5300531
Parma	0521 386303
Pavia	338 3950152
Pesaro	347 0191092
Pescara	347 0502460
Ragusa - Vittoria - Catania 2	338 6325645
Reggio Calabria	0965 787225
Reggio Emilia	0522 874720
Roma	339 7744458
Roma - Monterotondo	349 6500536
Rovigo	349 1252300
Salerno	320 4229443
Siena	349 3599497
Sondrio - Valchiavenna	338 3133275
Taranto "A Carmen La Gioia"	320 8715264
Teramo	349 6067242
Torino	328 8352087
Trapani - Marsala	333 7240122
Treviso - Montebelluna	335 8413296
Treviso - Trevignano	340 6749202
Varese	347 8347126
Varese - Tradate Gallarate	347 2441141
Venezia	346 1479674
Verbania e V.C.O.	338 2328074
Verona	347 8480516
Verona - Bovolone	348 3395278
Verona - Bussolengo Pescantina	328 2316828
Verona - Cerea "Il Sorriso di Jenny"	339 4312185
Verona - Lago di Garda	348 7632784
Verona - Minerbe	328 7140333
Verona - Valdadige	340 6750646
Verona - Valpolicella	339 3316451
Vibo Valentia San Costantino Calabro	388 7767773
Vicenza	333 8877053
Viterbo	339 2107950

Gruppi di sostegno della Fondazione

Alessandria - Acqui Terme	366 1952515
Alessandria - Valle Scrivia	347 3095778
Ancona Falconara	347 3329883
Arezzo	331 3700605
Bari - Altamura	349 0846868
Barletta	0883 519569
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bologna - Monte S. Pietro	051 6760729
Bolzano - Ass.Ne FC Alto Adige	338 5320380
Bolzano - Val Badia	0474 520127
Brindisi - Latiano	329 7027837
Brindisi - Torre	327 2056244
Cagliari - Isili	345 1442597
Como - Dongo	333 6846302
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Foggia - Manfredonia	347 50125780
Foggia - San Severo	334 9370137
Genova - Cavi di Lavagna	349 3152910
Genova	010 3538371
Gorizia - Grado	328 6523404
Imperia - Ospedaletti	335 5881657
Imperia	333 2163849
La Spezia - Sarzana	388 6036651
Matera - Marconia "Roberto"	338 9573904
Messina - Tremestieri	328 5541071
Milano - Brugherio	039 2873024
Milano - Bussero	340 5327647
Milano - Seregno	338 4848262
Napoli - Cicciano	335 6551613
Oristano - Riola Sardo	349 2550467
Perugia - Città di Castello	320 9273469
Pisa	347 4235635
Ravenna- Faenza	0546 44310
Roma Est	331 3633978
Rovigo - Adria	347 8497842
Sassari – Castelsardo	338 8437919
Savona - Spotorno	338 8775863
Torino - Chivasso	011 9172055
Torino - Ivrea	335 7716637
Trento - Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica	340 5228888
Varese - Samarate "Terremoto Team"	345 2287044
Venezia	349 8707627
Verona "Rita"	347 6064471
Verona - Val d'Alpone	328 9688473
Vicenza - Sarcedo	333 2679212

PER DONAZIONI E VERSAMENTI

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

Le donazioni effettuate a favore di Onlus comportano il diritto di usufruire di alcune agevolazioni fiscali, così come previsto dal nostro sistema tributario. Per approfondire: www.fibrosicisticaricerca.it/Sostieni-la-ricerca/Donazioni/ nella sezione benefici fiscali

ffc
Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation
www.fibrosicisticaricerca.it