Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

XIII SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri della ricerca in fibrosi cistica

- *Mutazioni e previsione di malattia*
- *Terapie mutazioni-mirate: oggi e domani*

Verona, 23 Maggio 2015

Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello
In copertina: Illustrazione di Sara Ferrari "Il respiro è nell'aria" 2015
Grafica e impaginazione: Federica Negroni
Stampato nel maggio 2015 da Tipolitografia Artigiana - San Giovanni Lupatoto(VR)

Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

XIII SEMINARIO DI PRIMAVERA

Progressi recenti e sviluppi futuri nella ricerca in fibrosi cistica

Mutazioni e previsione di malattia

•

Terapie mutazioni-mirate

Verona, San Massimo, Centro Congressi CUM
23 maggio 2015

Sommario

Presentazione Pag. 3
Gianni Mastella

La Genetica può dirci quale malattia sarà? Pag. 5
Carlo Castellani

Panorama degli studi clinici sulle terapie mutazioni-mirate Pag. 10
Kris De Boek

Prospettive di ricerca su terapie mutazioni-mirate.
Aggiornamenti sul progetto "*Task Force for Cystic Fibrosis*" Pag. 18
Luis J.V. Galietta

Appendice - Dati essenziali sull'attività scientifica FFC Pag. 22

Presentazione

Gianni Mastella
Direttore Scientifico
(Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

Questo appuntamento di Primavera ritorna ogni anno, da 13 anni ormai, con l'intento di fare il punto su ciò che si sta muovendo più significativamente nella ricerca sulla fibrosi cistica. In 13 anni molte cose sono successe, soprattutto si è aperta la strada per agire direttamente sul difetto che sta alla base dei complessi eventi patologici che caratterizzano la malattia. Per la prima volta è stato scoperto un farmaco in grado di ristabilire la funzione della proteina CFTR, nata difettosa a causa di alcune mutazioni di classe III. Sappiamo che questo rimedio (il potenziatore Ivacaftor), già entrato nei protocolli di cura con grande successo, interessa per ora un limitato numero di persone con fibrosi cistica, non più del 5% di tutti i malati. Ed in questi ci si attende di poterlo impiegare molto precocemente, già nelle prime settimane di vita, con l'intento di impedire qualunque sviluppo della malattia. Ma già si sono aperte interessanti prospettive per abbinare questo potenziatore ad un altro, chiamato correttore, che sia capace di intervenire sulla stessa proteina CFTR generata dalla più comune mutazione DF508 portandola a maturazione nella sua giusta sede di azione per essere qui potenziata da ivacaftor. Sappiamo peraltro che ancora non abbiamo trovato il correttore ideale e che forse non basterà un solo correttore ma ne saranno necessari almeno due per ottenere un recupero più efficace della proteina. Su questo fronte si è aperta una forte competizione a livello mondiale, perché la prospettiva è quella di poter presto trattare efficacemente quasi il 70% delle persone con FC. Questo non è più solo un sogno ma è una realtà che ha già solide basi scientifiche, sulle quali stanno cimentandosi sia l'industria farmaceutica che le organizzazioni come la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica in cui il volontariato sociale si adopera per supportare la ricerca scientifica in questa malattia.

Di questo soprattutto tratterà il Seminario, con il contributo di due ricercatori che hanno dato un forte impulso alla ricerca nel campo. La prof. Christiane de Boeck, di formazione clinica, illustrerà il panorama generale dello stato della ricerca in questo campo, con particolare riferimento agli studi clinici condotti negli ultimi anni. Il dr. Luis Galietta, biologo molecolare, già da anni impegnato nella ricerca di farmaci attivi sul difetto di base FC è attualmente leader di un progetto, su cui la Fondazione Ricerca FC sta molto investendo, progetto mirato a scoprire nuovi correttori e nuovi potenziatori della proteina CFTR in grado di superare i limiti finora riscontrati

con le molecole di prima generazione già sperimentate: egli analizzerà gli aspetti promettenti ma anche quelli critici degli studi finora condotti e riferirà sullo stato di avanzamento del progetto strategico italiano denominato "*Task Force for Cystic Fibrosis*".

Il Seminario darà spazio anche ad un'area molto ricca di nuove conoscenze, quella del ruolo delle diverse mutazioni CFTR e delle loro combinazioni nel determinare la molteplicità delle manifestazioni della malattia. Il tema è in sostanza quello che sta molto a cuore ai genitori di bambini appena diagnosticati: è possibile prevedere in base al genotipo (le mutazioni che il malato porta) quale sarà il decorso della malattia? Il Dr Carlo Castellani, pediatra genetista, molto impegnato da anni in questo campo degli studi genetici, cercherà di dare risposte basate anche sulla enorme raccolta di informazioni relative a decine di migliaia di malati di varie parti del mondo, organizzate in un database consultabile on line e denominato CFTR2, alla cui costruzione e manutenzione egli ha attivamente collaborato.

Naturalmente, gli ambiti della ricerca in fibrosi cistica si estendono ad altre tematiche, che riguardano soprattutto nuove prospettive di cura dell'infezione e dell'infiammazione polmonare. Ed anche su tali aree vi sono state non poche innovazioni negli ultimi anni, anche se per lo più limitate alle fasi pre-cliniche della ricerca. La rete italiana di ricerca FC, supportata dalla Fondazione Ricerca FC, sta ottenendo rilevanti risultati in queste aree: i tempi del Seminario non permettono di affrontarle, ma ci daremo su queste appuntamento al prossimo anno.

Un benvenuto speciale a quanti partecipano all' incontro e particolarmente ai molti volontari che generosamente e con entusiasmo affiancano la Fondazione nel sostegno alla ricerca.

La genetica può dirci quale malattia sarà?

Carlo Castellani
(Centro Fibrosi Cistica,
Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona)

Sin dalla fine degli anni ottanta conosciamo il gene responsabile della fibrosi cistica. È stato chiamato gene CFTR, che sta per Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, dal nome della proteina che l'organismo produce seguendo le istruzioni contenute nel gene stesso. Si tratta di una proteina con funzioni importanti per la regolazione del trasporto di cloro e bicarbonati e la sua assenza od il suo grave malfunzionamento provocano un insieme di conseguenze che siamo abituati a chiamare fibrosi cistica. L'assenza o il malfunzionamento della proteina sono dovuti ad alterazioni nella sequenza di DNA che costituisce il gene CFTR, alterazioni che chiamiamo "mutazioni".

"2000 mutazioni del gene CFTR censite nel cystic fibrosis mutation database CFTR1 (www.genet.sickkids.on.ca)"

Dopo la scoperta del gene CFTR abbiamo gradualmente compreso che esistono molte mutazioni in questo gene: il sito "Cystic Fibrosis Mutation Database" (http://www.genet.sickkids.on.ca) che le censisce ne comprende circa 2.000, la cui distribuzione e frequenza sono molto varie. Si va dalla mutazione più frequente in assoluto, F508del, in precedenza chiamata anche DeltaF508, di cui verosimilmente una persona ogni 50 nelle popolazioni caucasiche come la nostra è portatrice, fino a mutazioni rarissime, chiamate anche "familiari" perché presenti soltanto nell'albero genealogico di una famiglia. Le mutazioni sono inoltre distribuite eterogeneamente nelle varie nazioni e nelle varie etnie. Ad esempio F508del, che comprende nell'Europa settentrionale fino a più dell'80% delle mutazioni identificate nei malati di fibrosi cistica, in Italia non arriva al 50% mentre nella rimanente metà sono rappresentate molte altre mutazioni, spesso più rare in altri paesi.

È anche importante ricordare che non tutte le mutazioni del gene CFTR causano fibrosi cistica: alcune consentono comunque la produzione di una proteina perfettamente funzionante e non danno conseguenze cliniche, altre portano alla sintesi di una proteina parzialmente funzionante che, in funzione di alcune variabili esterne al gene CFTR, potrà o meno portare ad un quadro di fibrosi cistica.

Capire quali mutazioni danno origine a fibrosi cistica e quali no è importante per varie ragioni, tra le quali sicuramente una delle principali è il loro uso per fare diagnosi di malattia. Esistono alcuni criteri universalmente accettati che consentono, nella maggioranza dei casi, di poter capire se una persona è malata di fibrosi cistica. Questi criteri associano a dei sintomi suggestivi per la patologia o ad uno screening neonatale positivo un test del sudore patologico (cioè che misura alti livelli di sale) o la presenza di due mutazioni riconosciute essere causanti fibrosi cistica. L'identificazione delle due mutazioni non è necessariamente indispensabile per fare diagnosi, poichè un test del sudore positivo insieme ai sintomi o allo screening neonatale è sufficiente. Tuttavia esistono situazioni, come un risultato dubbio del test del sudore o la diagnosi prenatale, in cui la

diagnosi dipende dall'analisi genetica, e quindi dall'individuazione di due mutazioni che diano fibrosi cistica.

"Come distinguere le mutazioni che causano malattia da altre innocenti?"

Saper distinguere le mutazioni del gene CFTR che causano effettivamente fibrosi cistica è quindi di enorme importanza, ma è anche meno semplice di quanto si possa pensare. Per evitare di etichettare erroneamente come causante malattia una mutazione riscontrata in alcuni pazienti, e quindi fare potenzialmente delle diagnosi sbagliate in altri, serve sia essere certi che i geni CFTR di quei pazienti non contengano altre mutazioni, non identificate, che potrebbero essere le vere responsabili della malattia, sia compiere complesse analisi di laboratorio che dimostrino che effettivamente la mutazione che stiamo considerando ha un importante effetto negativo sulla produzione delle proteina. La complessità di queste analisi e la relativa rarità di alcune mutazioni hanno fatto sì che fino a pochi anni fa solamente per una ventina di mutazioni esistesse un chiaro consenso sul loro ruolo nel provocare la malattia. Nonostante si trattasse delle mutazioni più comuni, moltissime altre, anche molto frequenti in alcune aree, erano escluse e quindi non potevano essere usate per fare diagnosi di fibrosi cistica.

"Il database CFTR2 (www.cftr2.org) ha raccolto dati genetici e clinici di 40.000 malati fc europei e nordamericani"

Allo scopo di superare questi importanti limiti, nei primi anni 2000 la Cystic Fibrosis Foundation e la Johns Hopkins University hanno dato vita ad un progetto internazionale chiamato CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR) che ha raccolto dati genetici, clinici e di test del sudore di 40.000 pazienti con fibrosi cistica di Europa e Nordamerica. Il grande numero di pazienti coinvolti ha consentito di ottenere informazioni su mutazioni altrimenti rare a livello locale, e di identificarne alcune centinaia con dati clinici sufficienti a valutare se fossero effettivamente causanti fibrosi cistica. Queste stesse mutazioni sono state inoltre sottoposte a complesse valutazioni sperimentali per comprendere se precludessero la produzione di proteina CFTR funzionante. Infine sono state ricercate in più di 2000 genitori di bambini con fibrosi cistica, e quindi portatori. Se identificate nei genitori in aggiunta alla mutazione trasmessa al figlio malato, poteva essere escluso che causassero fibrosi cistica: in caso contrario il genitore sarebbe stato anch'esso malato.

"Descritte le caratteristiche cliniche associate a 192 mutazioni del gene CFTR, dalle più frequenti alle rare"

Grazie a questa complessa procedura molte mutazioni (192, *n.d.r.*) si sono potute attribuire ad una di queste tre categorie:

- mutazioni che causano fibrosi cistica: la presenza di due di queste mutazioni in una persona fa sì che essa sia malata
- mutazioni dalle conseguenze cliniche variabili: la presenza di una di queste mutazioni insieme ad una delle precedenti può in alcuni casi portare a fibrosi cistica, in altri a manifestazioni cliniche minori che non giustificano una diagnosi di fibrosi cistica
- mutazioni che non causano fibrosi cistica: la presenza di una di queste mutazioni insieme ad una delle due categorie precedenti può in alcuni casi non avere alcuna conseguenza, in altri portare a manifestazioni cliniche minori che non giustificano una diagnosi di fibrosi cistica.

I risultati ottenuti dal progetto sono visibili su un sito web pubblicamente consultabile (www.cftr2.org), che comprende anche i dati clinici associati alle mutazioni riportate. Per ogni mutazione sono quindi disponibili i dati cumulativi dei pazienti che le portano, comprensivi di valore del test del sudore, sufficienza od insufficienza pancreatica, presenza di *Pseudomonas aeruginosa* nell'ultimo escreato e dati spirometrici in funzione dell'età. Tuttavia il sito raccomanda di non utilizzare questi dati per cercare di comprendere come una data mutazione o combinazione di mutazioni possano determinare il grado di severità della malattia in un singolo individuo.

La correlazione tra mutazioni che caratterizzano un determinato paziente con fibrosi cistica e le caratteristiche con cui si esprime la malattia è detta correlazione genotipo/fenotipo, dove genotipo rappresenta la combinazione delle due mutazioni presenti nel malato e fenotipo l'insieme dei sintomi e segni di malattia. Lo studio della correlazione genotipo/fenotipo ha importanti implicazioni pratiche, poiché è ben noto che la complessità e la gravità con cui si esprime la malattia nei singoli individui sono estremamente variabili, e vanno da situazioni estremamente impegnative fin dai primi anni di vita, per fortuna oggi rare, a quadri clinici così lievi da essere diagnosticati in tarda età. Pertanto, sin da quando si è compreso che le mutazioni del gene CFTR in grado di dare fibrosi cistica sono molte, medici, ricercatori e pazienti si sono chiesti se ad una determinata combinazione delle due mutazioni presenti in un malato si potesse associare uno specifico quadro clinico, e quindi si potesse in una certa misura prevedere l'evoluzione che la malattia avrebbe avuto. Di fatto la risposta alla domanda "una persona con due determinate mutazioni avrà una forma di malattia lieve o grave?" la si può avere solamente per gruppi numerosi di pazienti con le stesse mutazioni o con gruppi di mutazioni che condividono lo stesso meccanismo di compromissione della funzione della proteina, le cosiddette "classi" di mutazioni.

"Come le mutazioni e loro combinazioni influenzano segni e sintomi della malattia (correlazione genotipo/fenotipo)"

Questi meccanismi sono sostanzialmente 6, di modo che le mutazioni possono essere ricondotte, talora con qualche difficoltà, ad una di queste 6 classi. In estrema sintesi, la classe 1 porta alla mancata produzione della proteina, la classe 2 al suo mancato assemblaggio, la classe 3 a tempi troppo brevi di apertura del canale di membrana costituito dalla proteina (mutazioni "gating"), la classe 4 a difetto di conduzione del canale, la classe 5 a proteina normalmente funzionante ma in scarsa quantità, la classe 6 a instabilità della proteina. I pazienti con almeno una mutazione di classe 4 o 5 tendono a mantenere una condizione di sufficienza pancreatica (non usano o usano pochi enzimi pancreatici) ed a manifestare una compromissione polmonare meno marcata (*Avere anche una sola mutazione di classe IV e V è sufficiente per mantenere un residuo di pancreas funzionante, ma non si può dire lo stesso per quanto riguarda il polmone, n.d.r.*)

"Mutazioni CFTR divise in sei classi. Per ogni classe un diverso difetto sulla funzione della proteina CFTR"

All'interno di questi grandi gruppi di mutazioni le differenze individuali vengono attenuate dalla numerosità del campione, ma ciò non avviene nel singolo individuo, che avrà caratteristiche proprie, in aggiunta alle mutazioni nel gene CFTR, che ne influenzeranno l'andamento clinico. Queste caratteristiche hanno a che fare sia col patrimonio genetico complessivo della persona che con numerosi aspetti che contraddistinguono l'ambiente in cui è cresciuto e vive, e comprendono:

- La possibile presenza all'interno dello stesso gene CFTR mutato di ulteriori variazioni della sequenza di DNA, spesso non identificate, che influenzino la sua capacità di produrre almeno parzialmente della proteina funzionante.
- L'efficienza di numerosi geni, chiamati "geni modificatori" (Modifiers Genes, vedi figura 1) che non sono CFTR ma appartengono al patrimonio genetico di quel dato individuo, e che conferiscono caratteristiche rilevanti nello sviluppo della malattia, come ad esempio migliori o peggiori potenzialità di controllo dell'infiammazione e dell'infezione polmonare che si trova in che è malato di fibrosi cistica.
- Ad esempio, chi avrà una migliore efficienza di geni che aiutano a combattere le infezioni potrà verosimilmente contrastare con maggior successo le esacerbazioni infettive polmonari che caratterizzano la fibrosi cistica e contribuiscono alla sua graduale evoluzione peggiorativa. Al contrario chi avrà geni meno efficienti potrà essere penalizzato ed avere una malattia più impegnativa e più velocemente evolutiva.

"Mutazioni di classi differenti correlano in varia misura con malattia differente"

"Ma l'andamento della malattia non dipende solo dalle mutazioni CFTR"

"Fattori influenti: geni modificatori, ambiente, cure, stato socio economico, famiglia"

- Un ambiente poco salubre sia dal punto di vista generale che più specificamente della malattia polmonare che contraddistingue la fibrosi cistica, come nel caso dell'esposizione diretta o indiretta a sostanze nocive quali fumo od inquinanti ambientali e/o lavorativi.
- La qualità del trattamento medico e fisioterapico e la continuità e precisione nella sua esecuzione quotidiana.
- La condizione socio-economica, che renda più o meno accessibili cure di qualità (un fattore fortunatamente poco significativo in Italia, ma rilevante in molte altre nazioni) e lavori che lascino tempo ed energia alla cura.
- L'integrazione in un sistema familiare o sociale che supporti nella cura.

Tutte queste caratteristiche (raggruppate con il termine di "Fattori Ambientali" = *Environmental Factors*, vedi Figura 1) sono ovviamente diverse da una persona all'altra, e spesso neppure facilmente valutabili, come nel caso dei geni modificatori, che sono solo parzialmente noti. Il loro insieme rende a sua volta diversa l'espressione clinica della fibrosi cistica in due malati che abbiano le stesse mutazioni CFTR

"Malati con mutazioni uguali possono avere malattia anche molto diversa"

In altri termini, le caratteristiche (mutazioni) del nostro gene CFTR ci dicono se abbiamo o meno la fibrosi cistica e la rendono più o meno grave, ma a quest'ultimo aspetto contribuiscono, rendendolo impredicibile, molte altre variabili individuali che con CFTR non hanno necessariamente a che fare.

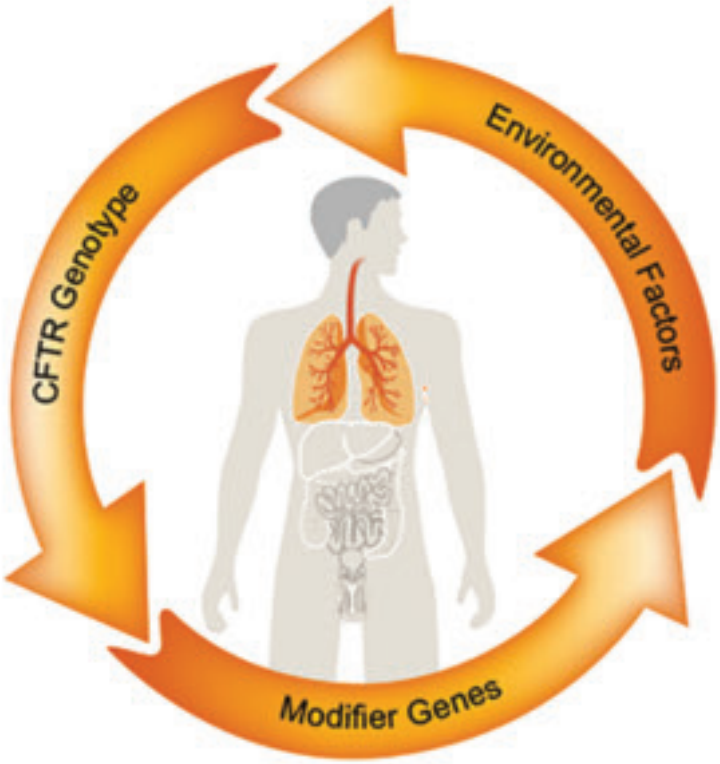

Figura 1 – (cortesemente fornita dal Prof Milan Macek Jr) Mostra l'interazione dei fattori ambientali (Environmental Factors) con il genotipo CFTR (CFTR Genotype) e con altri geni, detti modificatori (Modifier Genes), per determinare la malattia.

A questo quadro molto complesso va aggiunto un ulteriore fattore di variabilità: le mutazioni nel gene CFTR e le caratteristiche non dipendenti da CFTR influiscono sulle manifestazioni e sull'evoluzione della fibrosi cistica esercitando influenza varia su tutti gli organi interessati dalla malattia. Come si vede nella figura 2, l'impatto relativo che le mutazioni nel gene CFTR hanno sull'espressione della malattia a livello del pancreas o, nel maschio, dello sviluppo dei dotti deferenti, è molto rilevante, mentre il contributo dei fattori extra-CFTR è modesto. Al contrario l'espressione polmonare della malattia, anche se determinata principalmente dal genotipo CFTR, è largamente influenzata da geni modificatori e ambiente.

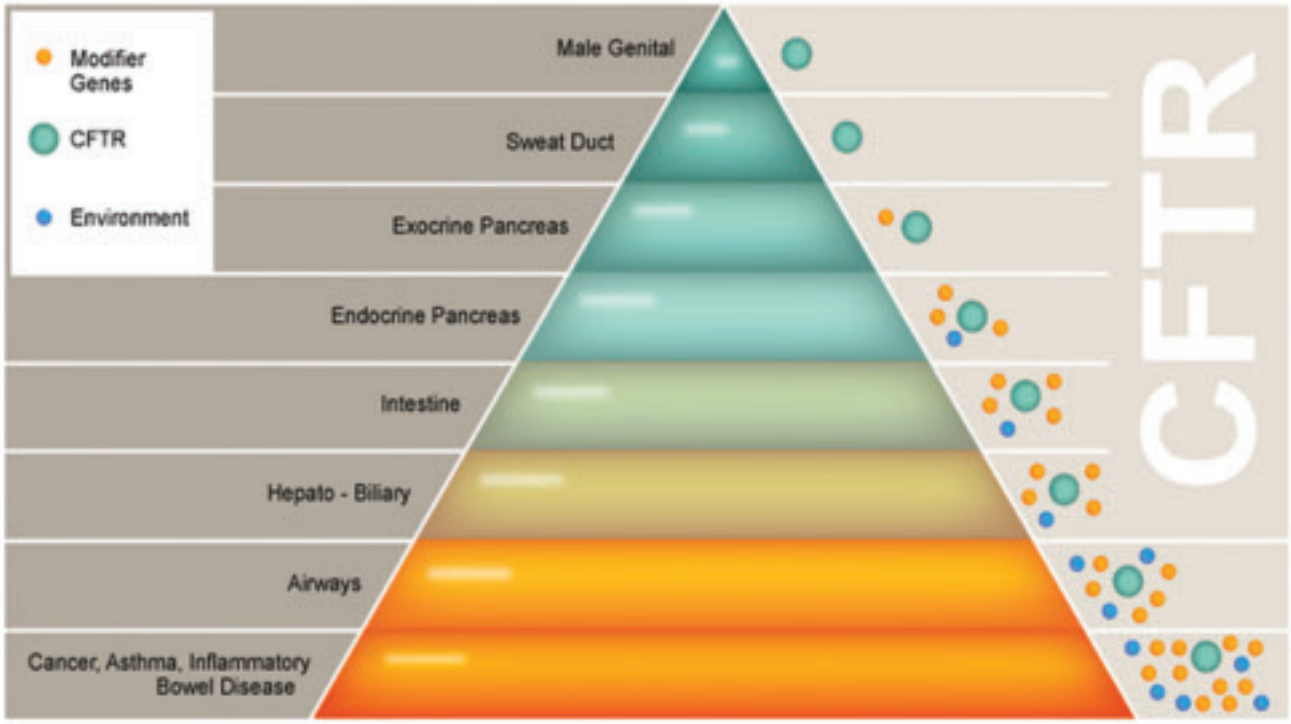

Figura 2 (cortesemente fornita dal Prof Milan Macek Jr) - Alcune manifestazioni della malattia sono determinate quasi esclusivamente dal tipo di mutazioni CFTR a livello di dotti deferenti, ghiandole sudorali, pancreas (apice della piramide), mentre per altre, a livello epatico, polmonare e di altre patologie associate predominano i geni modificatori ed in parte i fattori ambientali.

In conclusione, la risposta alla domanda "se ho queste due mutazioni come sarà la mia fibrosi cistica?" oggi è possibile solo in forma di probabilità, non di certezza sull'evoluzione di malattia nel singolo.

Sappiamo che alcune mutazioni si associano a maggiore o minore espressività di malattia (dati da CFTR2) e che la solidità di questa associazione è maggiore per la malattia pancreatica (pancreas sufficiente o insufficiente), minore per quella polmonare. L'applicazione nel singolo di queste conoscenze va attuata con cautela e con il supporto di un professionista medico o genetista.

"Le previsioni sono possibili per il pancreas, molto meno per il polmone e altri organi"

Bibliografia essenziale

- *American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. Obstet Gynecol 2011;117:1028-1031*
- *Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat 2002;19(6):575–606*
- *Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. J Cyst Fibros 2011;10-Suppl2:S86–102*
- *Castellani C, Cuppens H, Macek M, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros 2008;7(3):179–196*
- *Castellani C. CFTR2: How will it help care? Paediatr Respir Rev 2013;14 Suppl-1:2–5*
- *Cystic Fibrosis Mutation Database: http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr*
- *Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1996;22(6):387–395*
- *Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? N Engl J Med 2002;347(6),439–442*
- *Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245(4922):1066–1073*
- *Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. Ann Hum Genet 2003;67(Pt 5):471–485*
- *Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet 2013;45(10):1160–1167*
- *The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS http://www.who.int/genomics/publicstions/en and WHO Geneva, Human GeneticsProgramme WHO/HGN/CF/WG/04.02*
- *Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genet Med 2004;6:387-391*
- *Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu Rev Genet 1995;29,777–807*
- *Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 2000;67(2):117–133*

Panorama degli studi clinici sulle terapie mutazioni-orientate

Kris De Boeck
(University of Leuven, Belgium)

Nell'ultima decade abbiamo fatto dei notevoli progressi nella cura dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). Fattori come diagnosi precoce, stretto monitoraggio clinico e trattamenti intensivi hanno portato a uno stato nutrizionale migliore, una progressione più lenta della malattia respiratoria, ritardo nello sviluppo di infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa* e aspettativa di vita più lunga. Ad oggi, nei paesi sviluppati, il numero di adulti con FC supera il numero dei bambini. Poiché le nuove terapie che attaccano alla radice la causa della fibrosi cistica, e non solo i sintomi, abbiamo la speranza che queste terapie aumenteranno ulteriormente la durata e la qualità di vita.

Sono oltre 1800 le mutazioni CFTR che sono associate con la fibrosi cistica. Tra esse, solamente una mutazione è molto frequente e si presenta nel 70% degli alleli FC nel mondo (sono chiamati "alleli le due o più forme alternative dello stesso gene che si trovano nella stessa posizione su ciascun cromosoma[*locus genico*], *n.d.r.*). In confronto ad essa, tutte le altre mutazioni sono rare. Nella maggior parte dei paesi, solamente circa 10 mutazioni hanno una prevalenza (sono presenti in soggetti con malattia attualmente viventi, *n.d.r.*) in una percentuale superiore all'1%. Quindi molte mutazioni sono di fatto rare o estremamente rare. Pertanto si sono raggiunti progressi nello sviluppo di farmaci mediante la suddivisione delle mutazioni CFTR in sei categorie, a seconda di come la mutazione del gene altera la sintesi o la funzione della proteina CFTR, canale di trasporto per gli ioni (in particolare lo ione cloro) (Fig.3).

"La proteina CFTR può essere mancante o variamente alterata in relazione alle diverse mutazioni del gene CFTR"

Alla classe numero 1 si attribuiscono le mutazioni che hanno per effetto la mancata sintesi di proteina CFTR; nella classe 2 la proteina CFTR è strutturalmente anormale e quindi viene degradata prima di poter svolgere la sua funzione; nella classe 3, la proteina è collocata sulla membrana apicale della cellula, ma presenta un difetto nell'apertura del canale; nella classe 4, il canale è scarsamente permeabile al cloro (difetto di conduttanza); nella classe 5, è presente meno proteina sulla membrana cellulare; nella classe 6 la proteina non è stabile a livello della membrana cellulare e si degrada rapidamente.

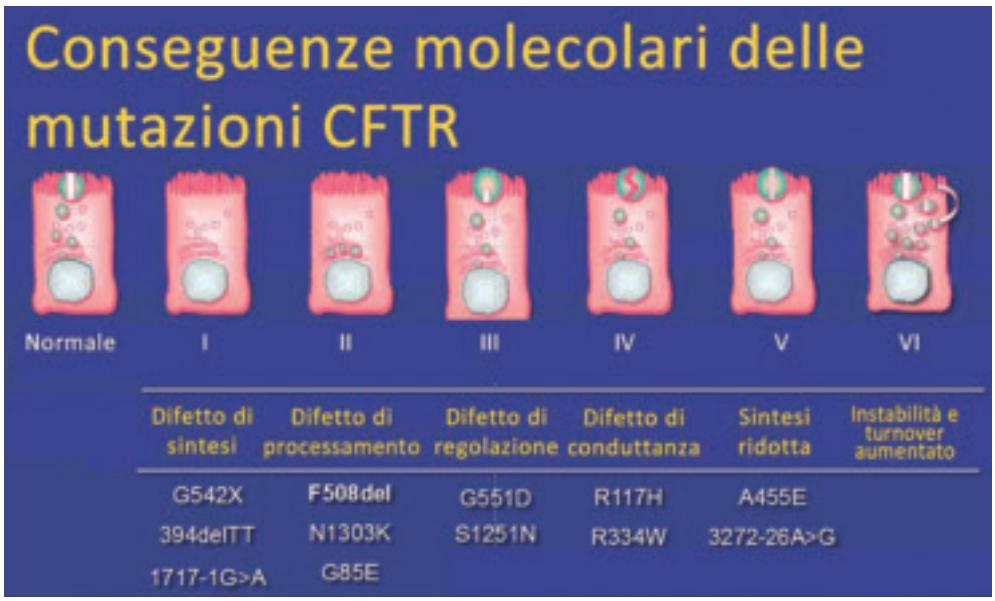

Figura 3 – Le mutazioni del gene CFTR hanno un effetto diverso sulla sintesi, sull'assemblamento o sul funzionamento della proteina CFTR. Se questo effetto è conosciuto la mutazione viene attribuita ad una classe. Mutazioni attribuite ad una stessa classe hanno un effetto finale simile sulla proteina. Sotto ogni classe sono indicate alcune mutazioni appartenenti a quella classe. (Figura adattata dall'originale di Kris De Boeck a pag.15).

Per migliorare la funzione CFTR si può quindi pensare di aumentare il numero di canali CFTR a livello della membrana cellulare oppure di migliorare il funzionamento di CFTR aumentando il tempo di apertura del canale o migliorando il flusso di cloro al suo interno. Per aumentare il numero di canali disponibili si possono sperimentare farmaci chiamati correttori. I correttori possono agire riavviando la sintesi interrotta della proteina (mutazioni "stop" di classe I) o, nel caso di DF508 (mutazione di classe II), "salvando" la proteina dalla degradazione oppure intervenendo direttamente sul suo RNA messaggero. Per migliorare la funzionalità del canale, una volta pervenuto al suo sito di azione, aumentandone il tempo di apertura, vengono usati i potenziatori (Fig.4).

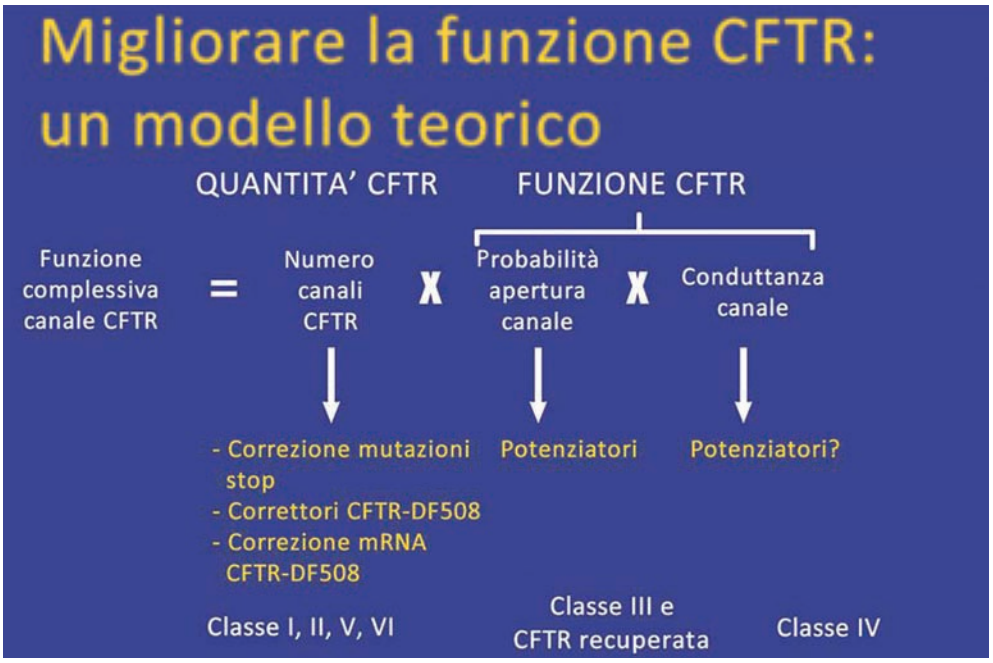

Figura 4 – Questo schema si propone di descrivere i fattori che determinano la funzione complessiva della proteina canale CFTR e i farmaci che possono influenzarla agendo sulle mutazioni implicate nel difetto. Per avere un funzionamento ottimale di CFTR è necessario che sulla membrana apicale della cellula sia presente una quantità sufficiente di canali (Quantità CFTR = Numero canali CFTR) e che questi canali funzionino (Funzione CFTR). Il funzionamento dei canali a sua volta dipende da quanto tempo rimangono aperti (Probabilità apertura canale) e da quanto sono permeabili al passaggio del cloro (Conduttanza). Le mutazioni di classe I, II, V e VI comportano una presenza ridotta di canali sulla membrana apicale. Le mutazioni di classe III influenzano il tempo di apertura del canale, quelle di classe IV alterano la conduttanza. (Figura adattata dall'originale di Kris De Boeck a pag.15)

"Panorama della ricerca di nuovi farmaci mutazione-mirati: i risultati ottenuti sono diversi nelle diverse classi di mutazioni"

Dove siamo ad oggi con queste nuove terapie? In poche parole, possiamo dire che abbiamo fatto buoni progressi con la classe 3 (alla quale appartengono circa il 4% dei pazienti, chiamate anche mutazioni di *gating*) e in qualche modo anche con la classe 4 e la classe 5 (che insieme appartengono a circa il 10-15% di tutti i pazienti). Inoltre, siamo adun punto discreto anche per pazienti che sono omozigoti per la mutazione F508del (circa il 50%, quindi il gruppo più numeroso) (sono quelli che hanno nel genotipo doppia mutazione F508del, *n.d.r.*). Meno bene per ora per i pazienti che sono eterozigoti per F508del (circa il 30% dei soggetti) (sono quelli che hanno nel genotipo la mutazione DF508 combinata con una mutazione di altro tipo, *n.d.r.*). Nel complesso, comunque, ci sono in cantiere buone prospettive per il gruppo F508del. Sfortunatamente, ancora non abbiamo fatto sensibili progressi per i pazienti con mutazioni di classe 1.

A questo punto è necessario sottolineare un aspetto importante: dobbiamo puntualizzare che le terapie correnti e anche quelle in via di sviluppo non significano una "soluzione definitiva" per la fibrosi cistica. Infatti, sono farmaci che rappresentano il meglio disponibile allo stato attuale e devono essere presi per tutta la vita.

Voglio discutere in dettaglio il successo raggiunto con la classe 3, anche se essa rappresenta solo il 4% della popolazione con FC nel mondo. Infatti, aver trovato un trattamento per queste persone significa aver aperto una prospettiva su cosa sia possibile fare in FC. Questo fatto è stato importante, anche perché ha portato grande entusiasmo e molte compagnie farmaceutiche si sono interessate allo sviluppo di farmaci per la fibrosi cistica.

"Risultati ottenuti con il potenziatore Ivacaftor (Kalydeco) per le mutazioni di classe III"

Ivacaftor (Kalydeco) agisce facendo diminuire la concentrazione di cloro nel sudore da un valore medio di 100 mMol/L a circa 50 mMol/L, nei pazienti con mutazione G551D o altre mutazioni di classe 3. Oltre a ciò, determina un miglioramento della funzione polmonare, in media di circa il 10%. Il beneficio notevole è stato osservato in pazienti dall'età di 6 anni in su, e persino in soggetti con G551D che hanno una funzione polmonare basale con FEV1 90% (quindi pressoché normale, *n.d.r.*). Inoltre, non è stato osservato solo un miglioramento della funzione polmonare, ma anche una diminuzione delle esacerbazioni polmonari, un miglioramento nel punteggio BMI (indice di massa corporea) e anche un punteggio più elevato nei parametri usati per valutare la qualità della vita. Il farmaco è stato approvato da FDA (Food and Drug Administration, organo di controllo americano) e EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) per i pazienti di età superiore a 6 anni con una mutazione di classe 3. In uno studio aperto, è stato osservato un miglioramento nel peso e una diminuzione di cloro nel sudore anche nella categoria di età 2-5 anni; in alcuni bambini è stato osservato un miglioramento della funzione pancreatica. Infatti, negli Stati Uniti l'approvazione è stata estesa anche ai bambini dai 2 anni in su. Nel frattempo, sono stati mostrati i benefici a più lungo termine di Ivacaftor: non solo esso è associato con un netto miglioramento della funzione polmonare, ma anche l'annuale declino in FEV1 è risultato circa dimezzato. Ma si è riscontrato anche: meno infezione da *Pseudomonas*, miglioramento nella tolleranza al glucosio, guadagno in peso e crescita migliore dei bambini. Il piano adesso è quello di esplorare il vantaggio di una terapia combinata con Ivacaftor e il correttore VX661 nei pazienti con mutazione di classe 3. Infatti, il beneficio maggiore dato dalla terapia combinata rispetto alla monoterapia con il potenziatore è stato mostrato in vitro e in uno studio pilota, che ha indicato un ulteriore miglioramento di FEV1 quando il correttore viene aggiunto al potenziatore per 4 settimane. Dal momento che i pazienti FC hanno due (spesso diverse) mutazioni, questo miglioramento potrebbe essere dovuto all'effetto sulla seconda mutazione (non di classe 3).

"Ivacaftor (Kalydeco) anche per mutazioni di classe IV e V? Il caso della mutazione R117H "

Ivacaftor è stato anche esplorato su pazienti con mutazione classe 4. Poiché essi hanno una malattia più leggera, potrebbe essere difficile verificare un beneficio sostanziale. È stato eseguito uno studio parallelo in doppio cieco con Ivacaftor, 150 mg due volte al giorno, nei pazienti con mutazione R117H, la mutazione più comune fra quelle di classe IV.I

criteri di inclusione erano: FEV1 tra il 40 e il 90% se sopra l'età di 12 anni, oppure tra 40 e 105% se in una categoria di età tra 6 e 11 anni. In totale hanno partecipato 69 tra adulti e bambini. Nel complesso, non è stato raggiunto lo scopo finale dello studio: c'è stato solo un miglioramento del 2% del valore predetto di FEV1. Tuttavia, in un sottogruppo di 50 adulti lo scopo principale è stato raggiunto: FEV1 è migliorato del 5%. Questi soggetti hanno anche mostrato un miglioramento nel punteggio della qualità di vita in relazione alla malattia respiratoria (l CFQ-R), valutazione peraltro riferita dallo stesso paziente.

"Primo studio su pazienti con mutazioni CFTR rare che comportano funzione CFTR residua"

A causa della rarità delle mutazioni con funzione residua nelle classi 4 e 5, progredire non è facile, anche se gran beneficio è stato mostrato in vitro grazie al potenziatore per diverse di queste mutazioni rare. E' definito "N-of-1" lo studio in cui il paziente viene usato con il controllo di sè stesso. Il paziente riceve alternativamente trattamento attivo e placebo (sostanza priva di principi attivi confezionata in maniera tale da non essere distinguibile dal farmaco vero, *n.d.r.*) durante periodi di tempo variabile. La funzione polmonare, così come altre misure, sono prese ripetutamente ma sia l'investigatore che il paziente non sanno quando il paziente stia assumendo veramente il farmaco (doppio cieco, *n.d.r.*). Nel complesso, è stato evidenziato un miglioramento modesto in FEV1; ed anche un decremento seppur modesto del cloro nel sudore. Questo dimostra la grande difficoltà nello studiare il beneficio di un farmaco in pazienti con mutazioni molto rare.

"Organoidi": modelli sperimentali per testare nel singolo individuo l'effetto di farmaci attivi su CFTR"

Una valutazione *ex vivo* sarebbe in tal senso vantaggiosa: un modello di tal genere è quello costituito dagli "organoidi". Si tratta di piccoli mini-organi, in questo caso mini-intestini generati da cellule staminali presenti nelle biopsie della mucosa rettale. Attraverso la stimolazione del canale CFTR, l'attivatore forskolina induce il rigonfiamento di questi organoidi in soggetti sani, ma il rigonfiamento è assente nei soggetti con fibrosi cistica. Questi organelli possono quindi diventare il modello ideale per studiare gli effetti dei farmaci ex vivo, per una sorta di medicina personalizzata. Naturalmente, deve essere ancora mostrata una buona correlazione tra la risposta degli organoidi e la risposta clinica.

"Per le mutazioni di classe II (F508del) sono necessari più correttori in combinazione con un potenziatore"

Anche per una larga parte dei pazienti classe 2 ci sono buone notizie. La terapia combinata con Lumacaftor (correttore) e Ivacaftor (potenziatore) in circa 1000 soggetti con FC omozigoti per F508del ha ottenuto un piccolo ma significativo miglioramento di FEV1. Tuttavia, alcuni esperimenti in vitro in colture cellulari hanno mostrato che l'esposizione a lungo termine a un potenziatore in combinazione con un correttore peggiora la stabilità di CFTR, ma questo dato di laboratorio non è stato confermato nella sperimentazione clinica, in cui non c'è stata alcuna perdita di efficacia nel periodo di un anno. Allo stesso modo è promettente la riduzione di esacerbazioni polmonari di circa il 30- 35%, osservata nei trial clinici con questa combinazione. Nel frattempo, stiamo incominciando a capire bene perché recuperare la CFTR destrutturata è così difficile. Infatti, la struttura tridimensionale della proteina CFTR è molto complessa. Per far si che essa arrivi correttamente alla membrana cellulare, devono essere "corretti" vari difetti strutturali. Il pensiero corrente è quindi che serviranno una combinazione di correttori con diversi meccanismi di azione, più un potenziatore, per ottenere un recupero robusto della proteina destrutturata. Varie compagnie, oltre a Vertex, hanno al momento sulla loro pipeline dei correttori, incluse Galapagos, Abbvee, Bayer, Novartis. Mentre la olandese ProQr sta andando in tutt'altra direzione.

"Strategia alternativa per correggere CFTR mutata a livello di RNA messagero anziché sulla proteina già sintetizzata o in corso di maturazione"

Infatti questa compagnia ha in sviluppo oligonucleotidi antisenso (corte molecole di acidi nucleici, complementari ad una determinata sequenza di RNA, verso la quale esercitano "antisenso", impedendone quindi la "traduzione") che correggono CFTR a livello di mRNA, inserendo le tre coppie di basi mancanti nel RNA messaggero di F508del. La maggior

parte di queste compagnie hanno incominciato o progettano di cominciare con la fase di sperimentazione clinica del farmaco candidato nel 2015.

"Ataluren probabilmente efficace per mutazioni stop di classe I purchè non sia concomitante terapia aerosolica con antibiotici aminoglicosidici"

Circa il 10% di pazienti nel mondo hanno mutazioni di classe 1 e un grande sottogruppo di essi ha una mutazione stop. In uno studio di 1 anno, in doppio cieco, il decorso di FEV1 nel tempo non differiva tra i pazienti trattati con ataluren rispetto a quelli trattati con placebo. Tuttavia, un sottogruppo che non era in terapia con antibiotici aminoglicosidici per aerosol sembra aver ricevuto beneficio: la loro funzione polmonare è rimasta stabile mentre invece c'è stato un declino nei pazienti che assumevano il placebo. L'importanza dei farmaci "*read-through*" (farmaci che riavviano la sintesi della proteina CFTR, interrotta dalle mutazioni stop, attraverso la lettura completa del codice genetico) è chiara. Infatti questo tipo di farmaci non è specifico della patologia FC ma può, in teoria, aiutare anche pazienti con altre malattie, se sono causate da mutazioni stop. Infatti ataluren ha avuto un'approvazione EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) "condizionata" per i pazienti con distrofia muscolare di Duchenne causata da mutazioni "stop". La ricerca continua: un nuovo studio è in corso con ataluren in pazienti FC che non prendono aminoglicosidi per inalazione; in più, è in fase preclinica una *pipeline* per altri farmaci "*read-through*".
Tutto quanto discusso sinora è stato specifico per alcune mutazioni o per classi di mutazioni. Ma vi sono in corso anche studi che non sono specifici per una singola mutazione o per classi di mutazioni.

"Continua la ricerca su terapia genica: soluzione teoricamente per tutti i pazienti, indipendentemente dalle loro mutazioni"

L'approccio della terapia genica rimane una strada che viene perseguita, perché porterebbe beneficio a tutti i pazienti FC, senza distinzione di mutazione. I risultati del gruppo di ricerca di Londra non sono ancora stati resi pubblici. Finora, le grandi dimensioni del gene CFTR sono state un ostacolo. Vi sono gruppi accademici, come quello guidato da Steven Debyser, presso la mia università, che seguono il seguente approccio: ridurre la dimensione del gene CFTR mentre se ne conserva la funzione così che, con l'utilizzo di un vettore AAV (virus adeno-associato, *n.d.r.*), questa CFTR troncata possa essere transfettata efficacemente in organoidi di topo e umani. I risultati iniziali sembrano piuttosto promettenti.
In conclusione, è chiaro che abbiamo davanti ancora molto lavoro, ma - passo dopo passo - sono in prospettiva medicine migliori e risultati migliori per i pazienti FC.

New therapies for cystic fibrosis

In the last decades we have made great progress in the treatment of patients with Cystic Fibrosis (CF). Early diagnosis, close follow-up and intensive treatment have led to better nutritional state, slower progression of CF lung disease, delay of onset of chronic Pseudomonas infection and improved survival. At present in most developed countries, the number adults with CF now equals or exceeds that of children with CF. Since the new therapies attack the root cause of CF and not just the symptoms, we hope that these new therapies will further increase survival and quality of life.

More than 1800 different CFTR mutations are associated with CF or CF like disease. Only 1 mutation is frequent and occurs in 70% of CF alleles worldwide. In comparison all other mutations are rare. In most countries only about 10 mutations have a prevalence above 1%. Many mutations are thus rare or extremely rare. Therefore progress in drug development has been helped by dividing CFTR mutations in 6 classes according to how the gene mutation disturbs the synthesis or function of the CFTR protein, that functions as an anion channel. In class 1 mutations no protein is made; in class 2 mutations the structurally abnormal protein is degraded; class 3 mutations lead to a disturbance in channel opening; in class 4 the conductance through the channel is decreased; in class 5 less protein is present at the cell membrane; in class 6 the protein is not stable in the cell membrane (Fig.5).

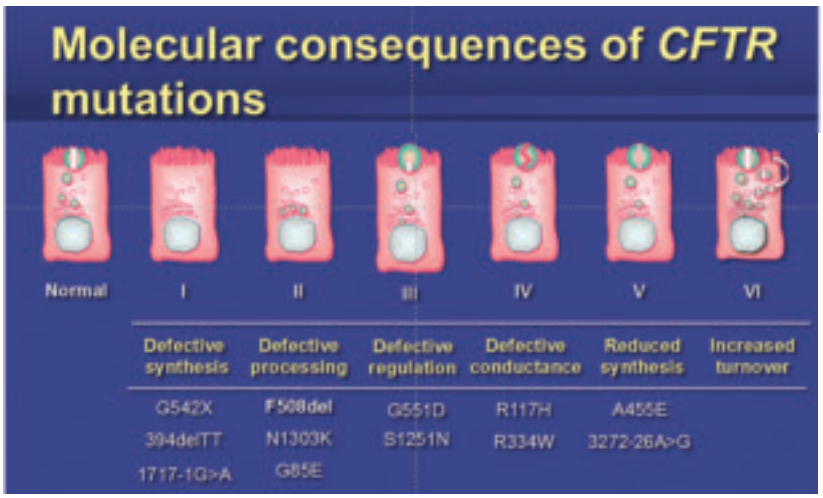

Figura 5

To improve CFTR function one can thus think in terms of increasing the number of CFTR channels at the cell membrane or improving the CFTR function by increasing the channel opening time or improving the flow through the channel. To increase the number of channels read-through drugs, CFTR correctors and mRNA correction can be trialed; to increase the channel function by improving the channel opening potentiators are used (Fig.6).

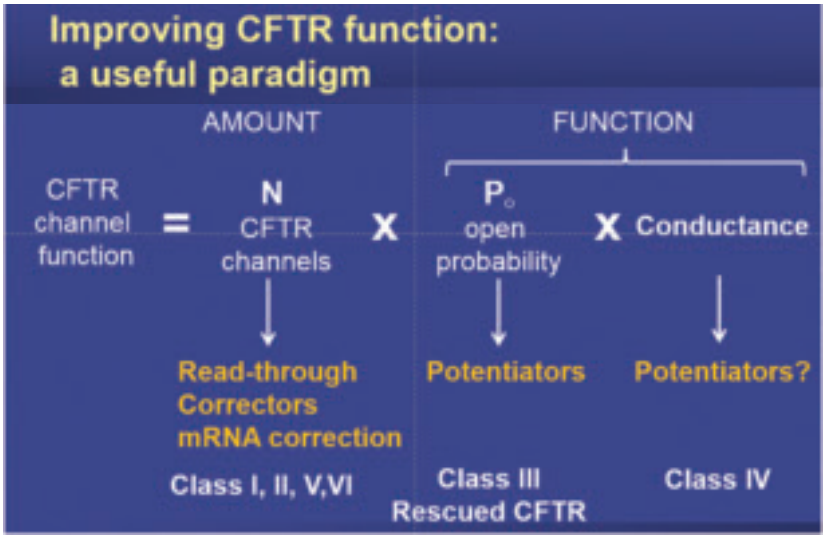

Figura 6

Where are we at present with these new treatments? In a nutshell we can state that we have advanced quite well for class 3 (only 4% of patients) and maybe even class 4 and 5 mutations (together up to 10-15% of patients). We are already somewhere for the patients who are homozygous for mutation F508del (about 50% and thus the largest group of patients), less far for patients who are heterozygous for F508del (about 30% of subjects). Taken together however, there are also great plans for the F508del group. Unfortunately, we have not yet advanced far for patients with class 1 mutations. An important general remark: we need to stress that the current therapies and also those under development do not yet mean a 'cure' for CF. Indeed, these new drugs come on top of current best management and have to be taken lifelong.

I will discuss the successes for class 3 in detail, even though they only represent about 4% of the population with CF worldwide. Indeed, finding a treatment for these subjects opened the perspective of what is possible in CF. This was also important in bringing enthusiasm and many different pharmaceutical companies to the area of drug development for CF. Ivacaftor (R/ Kalydeco) improves sweat chloride concentration from a mean of 100mmol/L to around 50 mmol/L in patients with G551D or another class 3 mutation. This is associated with an improvement in lung function of about 10% predicted. This large benefit has been shown in patients from the age of 6 years on, even in subjects with

G551D who have a baseline lung function above 90% FEV1. Not only improvement in lung function but also less pulmonary exacerbations, improvement in BMI z-score and quality of life score have been demonstrated. The drug has been approved by FDA and EMA for patients from age 6 years with a class 3 mutation. In an open label study, improvement in weight and drop in sweat chloride was seen in the age category 2 to 5 years; in some toddlers there was an increase in stool elastase. In the US, drug approval is now from the age of 2 years on. In the meantime, the longer term benefits of ivacaftor have become apparent: not only is ivacaftor associated with an acute improvement in lung function, also the yearly decline in FEV1 seems about halved; less Pseudomonas infection; improved glucose tolerance, sustained weight gain and better growth in children. The further plan is to explore the advantage of combination therapy with ivacaftor plus corrector VX661 in patients with class 3 mutations. Indeed, an added benefit of combination therapy over potentiator monotherapy has been shown in vitro and in a pilot study that showed a further improvement in FEV1 when a corrector was added to the potentiator therapy during 4 weeks. Since patients with CF have 2 (often different) mutations, this improvement could be due to the effect of treatement on the second (non class 3) mutation.

Ivacaftor has been explored in patients with class 4 mutations. Since these have milder disease, it may be harder to prove a substantial benefit. A parallel double blind study was done with ivacaftor 150 mg twice a day in patients with R117H mutation, the most common class 4 mutation. Inclusion criteria were FEV1 between 40-90% if above age 12 or between 40-105% if in the age category 6 to 11 years. In total, 69 children and adults participated. Overall the study endpoint was not met: there was only an improvement of 2% predicted in FEV1. However, in the subset of 50 adults, the primary point was met: FEV1 did improve by 5% predicted. These subjects also had an improvement in CFQ-R respiratory domain, a patient reported outcome measure.

Because of the rarity of mutations with residual function in class 4 or 5, progress is not so easy, even though in vitro great benefit from a potentiator has been shown for several of these rare mutations. "N-of-1" studies mean that the patient is used as his own control. The patient alternatively receives active treatment and placebo during variable periods of time. Lung function as well as other measurements are taken repeatedly but the investigator and the patient do not know when the patient is on active drug. Overall a modest improvement in FEV1 was shown; also a modest decrease in sweat chloride was detected. This demonstrates the complexity of studying the benefit of a drug in very rare mutations. An ex vivo evaluation could have advantages. One such model system is 'organoids'. These are small mini-intestines grown from stem cells present in rectum suction biopsies. By stimulation of the CFTR channel, forskolin induces swelling of organoids from healthy subjects, but the swelling is absent in organoids from patients with CF. These organoids could thus become the ideal model to study effect of drugs ex vivo, as a sort of personalized medicine. Of course a good correlation between organoid response and clinical response still needs to be shown.

For the large proportion of patients with class 2 mutation there is also some good news. Combination therapy with lumacaftor and ivacaftor in about 1000 subjects with CF homozygous for F508del was associated with a small but significant improvement in FEV1. Although in some in vitro data in cell culture, the long term exposure to a potentiator worsened the stability of the CFTR protein, a loss of effect over time was not seen in the clinic over the period of 1 year. Equally promising was the reduction in pulmonary exacerbations of about 30 to 35% observed in the clinical trial. In the meantime we are starting to understand much better why rescue of the misfolded CFTR protein is so difficult. Indeed, the 3 dimensional structure of the CFTR protein is extremely complex. To allow for adequate trafficking to the cell membrane, several defects in the mutated protein structure need to be 'corrected'. The current thinking is therefore that a combination of correctors with different mechanisms of action plus a potentiator will be needed to achieve robust rescue of misfolded protein. Several other companies than Vertex now also have a pipeline of correctors, including Galapagos, Abbvee, Bayer, Novartis. An entirely different strategy is taken by the Dutch company ProQr. They have under development, antisense oligonucleotides that correct CFTR at the mRNA level, by inserting the missing 3 base pairs in the F508del mRNA strand. Most of these companies have planned or are planning to start their clinical drug development phase during 2015.

About 10% patients worldwide have a class 1 mutation and a large subgroup of these have a stopcodon mutation. In a 1 year double-blind study the FEV1 course over time did not differ between subjects treated with ataluren and subjects treated with placebo. However, the subgroup not co-treated with inhaled aminoglycosides seemed to derive a benefit: their lung function remained stable whereas there was a decline in the subjects on placebo. The importance of read-through drugs is very clear. Indeed, this type of drug is not disease specific but - can at least in theory- help patients with other diseases as long as they have a stop codon mutation. The drug has conditional EMA approval for subjects with Duchenne's muscular dystrophy due to a stop codon mutation. Hence, the research continues: a new study is underway with ataluren in patients with CF not taking inhaled aminoglycosides; further, a pipeline of other read through drugs is under preclinical investigation.

All what we discussed so far has been mutation or mutation class specific. But innovative, non mutation or mutation class specific treatments are also under study. A gene therapy approach remains attractive, because it would bring a solution for all patients with CF regardless their CFTR mutation. The results of the London research group have still not been made public. So far, the big size of the CFTR gene has been an obstacle. Academic groups like the one lead by Steven Debyser at my university take the following approach: reduce the size of the CFTR gene whilst still retaining its function so that with the use of an AAV vector this truncated CFTR gene can be transfected effectively in mice and human organoids. The initial results seem quite promising.

In conclusion, it is obvious that a lot of work lies ahead, but -step by step- better medicines and better outcomes for patients with CF are in view.

Bibliografia essenziale (References)

- *Boyle MP, De Boeck k. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. Lancet Respir Med 2013 Apr;1(2):101*
- *Bell SC, De Boeck k, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. Pharmacol Ther. 2015 Jan;145:19-34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.005. epub 2014 jun 14.*
- *Ramsey BW, Davies I, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong G,*
- *Rodriguez S, Yen K, Oordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. N Engl J Med 2011 Nov 3;365(18): 1663-72.*
- *WainwrighT CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, Mccolley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP for the TRAFFIC and TRANSPORT study groups. Efficacy and safety of a CFTR corrector (lumacaftor) in combination with a CFTR potentiator (ivacaftor) in patients with cystic fibrosis who are homozygous for F508del-CFTR: Phase 3 TRAFFIC and TRANSPORT studies. N Engl J Med, 2015, in press*
- *De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, Higgins M. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. J Cyst Fibros, 2014 Sep pii: S1569-1993(14)00216-1. doi: 10.1016/j.jcf.2014.09.005 (Epub adhad of print)*
- *Davies JC1, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, Mainz JG, Rodriguez S, Li H, Yen K, Ordoñez CL, Ahrens R; VX08-770-103 (ENVISION) Study Group. 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 Jun 1;187(11);1219-25.*
- *Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Elborn JS, Melotti P, Bronsveld I, Fajac I, MAlfroot A, Rosebluth DB, Walker PA, McColley SA, Knoop C, Quattrucci S, Rietschel E, Zeitlin PL, Barth J, Elfring GL, Welch EM, Branstorm A, Spiegel RJ, Peltz SW, Ajayi T, Rowe SM, Cystic Fibrosis Ataluren Study Group. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Respir Med. 2014 Jul;2(7):539-47. Doi: 10.1016/S2213-2600(14)70100-6. Epub 2014 May 15*

Prospettive di ricerca su terapie mutazioni-mirate. Aggiornamenti sul progetto "Task Force for Cystic Fibrosis"

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

Quando nel 1989 venne scoperto il gene CFTR (1), non si pensò subito ad un approccio farmacologico per il trattamento dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). In effetti, molti pensarono che la scoperta del gene avrebbe consentito un approccio terapeutico molto diretto basato sulla terapia genica. Sembrava ovvio che il trasferimento del gene sano alle cellule malate avrebbe risolto il problema alla base ed in maniera simile per tutti i pazienti. Purtroppo gli anni successivi avrebbero rivelato che la terapia genica per la FC è una strategia molto difficile. In particolare, i vettori utilizzati inizialmente per trasferire il gene sano (in particolare virus ricombinanti quali gli adenovirus) mostravano scarsa efficacia. Si scoprì che solo parte delle cellule bersagliate esprimeva effettivamente la proteina sana e che il sistema immunitario del paziente reagiva neutralizzando le successive somministrazioni dei virus.

La possibilità di un approccio farmacologico per la FC emerse da ricerche di laboratorio che dimostravano la possibilità di correggere direttamente la proteina CFTR mutata senza necessità di sostituirla con una versione normale (2). Infatti, in molti casi, le mutazioni FC non compromettono la funzione della proteina in maniera irrimediabile. Diversi studi dimostrarono che è possibile "risvegliare" la proteina mutata attraverso opportuni espedienti. Uno di questi è il trattamento con bassa temperatura per la mutazione deltaF508. Nel 1992 si scoprì che il difetto causato dalla mutazione deltaF508 può essere risolto trattando le cellule a 27 gradi centigradi per diverse ore (3). Infatti, deltaF508 rende la proteina CFTR instabile e quindi attaccabile dai sistemi di controllo cellulari che la eliminano velocemente. Il raffreddamento delle cellule stabilizza la proteina permettendole di sfuggire alla degradazione e di raggiungere correttamente la membrana cellulare a livello della quale CFTR espleta la sua funzione di trasporto di ioni cloruro.

"Come si è arrivati alla scoperta dei farmaci potenziatori e correttori di CFTR mutata"

È ovvio che la soluzione per i pazienti non può essere la bassa temperatura ma il risultato del 1992 rivelava una possibile soluzione: la scoperta di un farmaco "stabilizzatore" che legandosi alla proteina CFTR facesse le veci della bassa temperatura. Sappiamo ora che a questo tipo di farmaco è stato dato il nome di "correttore". Un'altra scoperta importante rivelò invece la possibilità di trattare le mutazioni di cosiddetta classe 3 quali G551D (2). Queste mutazioni non destabilizzano la proteina CFTR ma al contrario la rendono fin troppo stabile e rigida, al punto da farla rimanere nello stato chiuso, non funzionale, per un tempo eccessivo. Alcuni ricercatori scoprirono che questo stato di "torpore" della proteina poteva essere superato usando sostanze come la genisteina o le xantine (2). A questo tipo di composti venne dato il nome di "potenziatori". Sarebbe qui troppo lungo spiegare il modo con cui furono scoperti i potenziatori ma basterà ricordare che la scoperta fu abbastanza casuale e inaspettata. In realtà, genisteina e xantine non possono essere utilizzate direttamente sui pazienti, perchè non sufficientemente spe-

cifiche e sicure, ma la scoperta del loro effetto su CFTR indicava una strada: la possibilità di trovare altri potenziatori con caratteristiche migliori.

Negli ultimi 15 anni, la ricerca di correttori e potenziatori è stata affrontata con grande intensità da diversi laboratori di università, istituti di ricerca pubblici e da industrie farmaceutiche (2). Il lavoro svolto ha permesso la scoperta di diversi composti chimici attivi su deltaF508 ed altre mutazioni FC. Sappiamo che il composto che ha avuto maggiore successo è il potenziatore Ivacaftor, anche conosciuto come VX-770, sviluppato dalla compagnia Vertex (4). In studi clinici effettuati su pazienti con la mutazione G551D, l'Ivacaftor ha mostrato grande efficacia migliorando la funzionalità respiratoria ed altri parametri clinici (5). L'Ivacaftor è ora il principio attivo di Kalydeco, un farmaco approvato per il trattamento dei pazienti con G551D e altre otto mutazioni di classe 3. La ricerca di correttori efficaci è stata invece più ben più difficile.

"Difficile la ricerca di correttori di CFTR DF508-mutata: modesti i risultati finora ottenuti"

La stessa Vertex ha sviluppato due composti VX-809 (6) e VX-661 che però in studi clinici su pazienti con la mutazione deltaF508 non hanno prodotto gli stessi risultati eccezionali ottenuti dal potenziatore sui pazienti di classe 3. Sono in corso altri studi clinici in cui i due correttori Vertex sono somministrati ai pazienti in combinazione con il potenziatore Ivacaftor. In questo modo si spera che il potenziatore aumenti l'effetto dei correttori. Tuttavia, due studi recenti effettuati in laboratorio su cellule in coltura hanno evidenziato un possibile problema causato dall'associazione tra correttori e potenziatori. In pratica è stato dimostrato che il potenziatore Ivacaftor aumenta l'instabilità intrinseca associata alla mutazione deltaF508 contrastando quindi l'effetto correttivo di VX-809 e VX-661 (7,8).

È quindi necessario trovare nuovi tipi di composti attivi, sia correttori sia potenziatori, particolarmente mirati verso la mutazione deltaF508 che costituisce, data la frequenza e gravità, un bersaglio terapeutico molto importante. In questo ambito si inquadra il progetto strategico "Task Force for Cystic Fibrosis" (TFCF) finanziato dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC). Il progetto TFCF, che prevede la collaborazione tra Istituto Giannina Gaslini (IGG) e Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), è articolato in tre fasi della durata complessiva di tre anni e mezzo (Fig. 7).

Figura 7 – Organizzazione del progetto "Task Force for Cystic Fibrosis" (TFCF). Il progetto è articolato in tre fasi ("hit identification", "hit to lead", "lead optimization") della durata complessiva di tre anni e mezzo.

Nella prima fase, che si è da poco conclusa, sono stati valutati più di 11.000 composti chimici in tre screening separati. Due screening sono stati dedicati all'identificazione di correttori su due tipi cellulari diversi. Il terzo screening è stato invece rivolto verso la scoperta di nuovi potenziatori. Complessivamente i tre screening effettuati in duplicato hanno comportato l'esecuzione di circa 80.000 test.

"Risultati preliminari promettenti del progetto FFC "Task Force for Cystic Fibrosis""

I risultati sono stati particolarmente interessanti. Sono stati trovati diversi composti attivi che sono stati poi valutati in test di secondo livello che mirano a confermare l'attività e a valutare efficacia ed affinità (Figura 2).

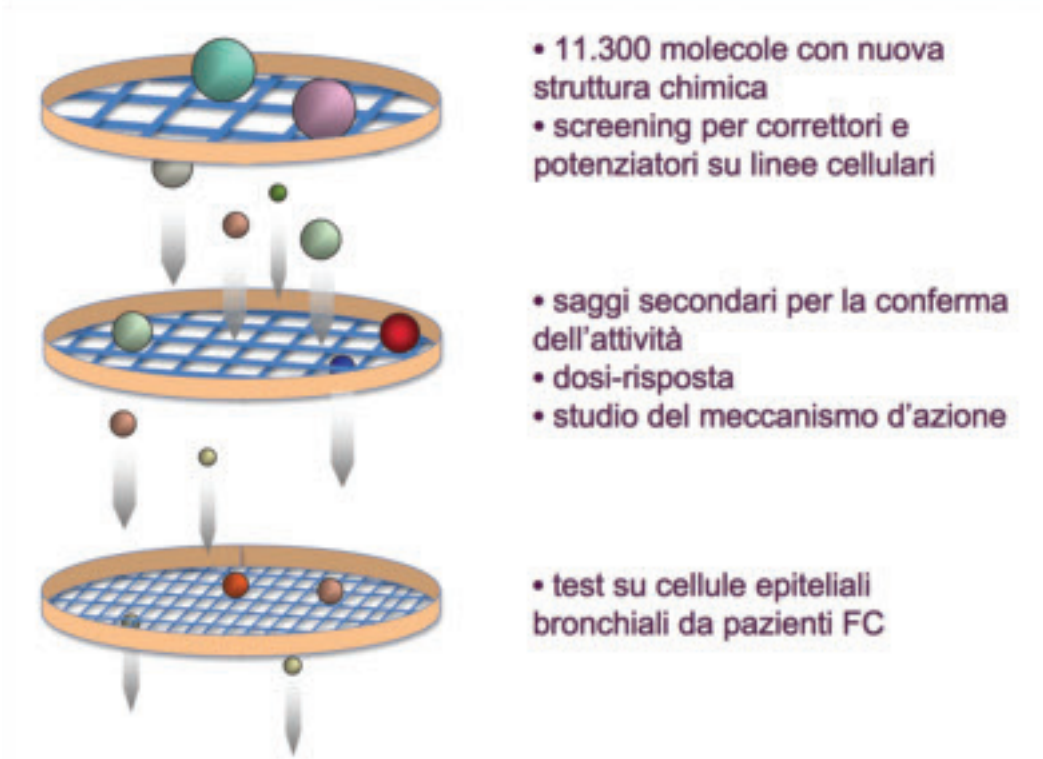

Figura 8 – Organizzazione della prima fase ("hit identification"). Partendo dallo screening di una collezione di 11.300 composti chimici sono stati trovati composti attivi che sono stati ulteriormente vagliati in saggi funzionali e biochimici di secondo livello. I composti che hanno superato questi test sono stati infine saggiati su cellule epiteliali bronchiali da pazienti FC. I composti che vengono confermati attivi a tutti i livelli ricevono la definizione di "hits".

Particolarmente importanti sono stati i test su cellule epiteliali bronchiali ottenute da pazienti FC. I test hanno permesso di effettuare una scrematura che ha evidenziato i composti dotati delle caratteristiche migliori. Alla fine del processo sono stati identificati due correttori e una famiglia di potenziatori dotati di nuova struttura chimica e di particolare efficacia. È da notare che il correttore migliore induce nelle cellule bronchiali un livello di correzione che non si discosta da quello indotto da VX-809.

Nella seconda fase del progetto TFCF si partirà dai composti più promettenti identificati nella prima fase per effettuare un processo di "ottimizzazione". In pratica, la struttura chimica del composto attivo sarà modificata in maniera sistematica dai chimici dell'IIT sostituendo e/o aggiungendo pezzi in modo da generare un gran numero di analoghi che verranno poi saggiati su linee cellulari e cellule primarie presso l'IGG (Fig. 9).

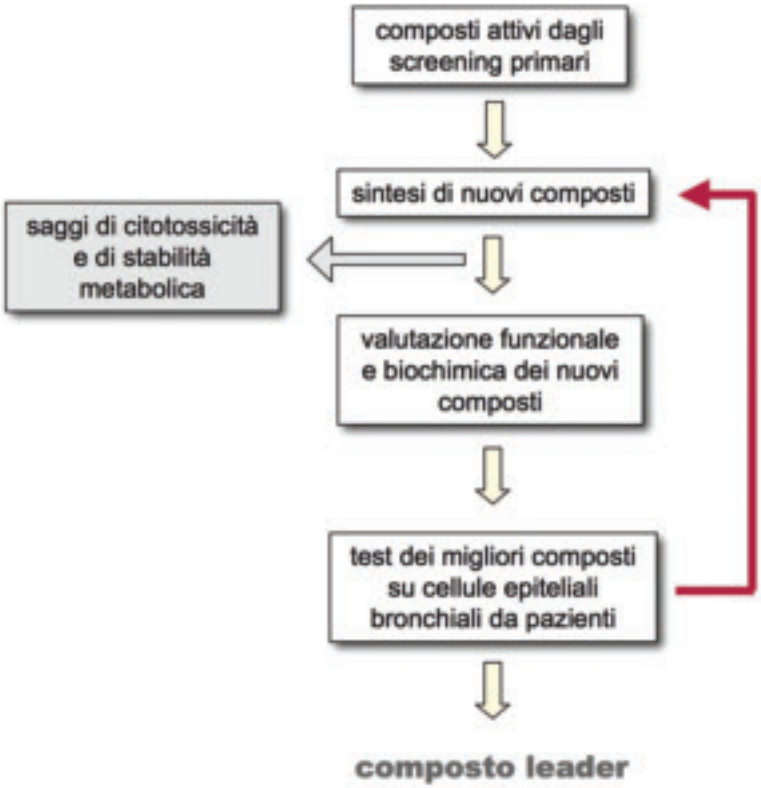

Figura 9 – Schema della seconda fase ("hit to lead"). I composti attivi confermati nella prima fase ("hits") servono da punto di partenza per la sintesi di pannelli di composti con struttura chimica modificata. Questi vengono poi vagliati su linee cellulari e su cellule epiteliali bronchiali primarie (da pazienti FC). I composti più attivi vengono prescelti per la sintesi di nuovi analoghi che vengono di nuovo valutati come correttori o potenziatori. Il processo viene ripetuto più volte fino ad ottenere un composto leader ("lead compound") dalle proprietà farmacologiche ottimizzate.

"La via per ottenere correttori e potenziatori ottimali (progetto TFCF, II e III fase)"

Il lavoro è organizzato in cicli, in cui il composto più attivo alla fine di ogni ciclo torna al punto di partenza per ulteriori modifiche della struttura chimica. Lo scopo è di migliorare progressivamente sia l'efficacia sia l'affinità. Questo secondo parametro è particolarmente importante perchè è associato alla forza con la quale il composto attivo si lega al suo bersaglio, in questo caso la proteina CFTR. Maggiore è l'affinità del composto correttore o potenziatore, minore è la dose del composto da somministrare per avere lo stesso effetto terapeutico. In questo modo si ottiene un aumento di specificità con conseguente diminuzione di possibili effetti collaterali. Alla fine della seconda fase si conta di avere un composto leader su cui concentrare gli sforzi per ottenere il risultato finale: un farmaco candidato dotato delle migliori proprietà di efficacia, selettività, biocompatibilità e sicurezza per la sperimentazione in vivo.

Bibliografia essenziale

1. *Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem 77: 701-726, 2008*
2. *Galietta LJ. Managing the underlying cause of cystic fibrosis: a future role for potentiators and correctors. Paediatr Drugs 15: 393-402, 2013*
3. *Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. Nature 358: 761-764, 1992*
4. *Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 18825-18830, 2009*
5. *Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. N Engl J Med 365: 1663-1672, 2011*
6. *Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 18843-18848, 2011*
7. *Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Jr., Das J, Dokholyan NV, Randell SH, Boucher RC, Gentzsch M. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of deltaF508 CFTR in cystic fibrosis. Sci Transl Med 6: 246ra96, 2014*
8. *Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, Phuan PW, Bagdany M, Apaja PM, Borot F, Szollosi D, Wu YS, Finkbeiner WE, Hegedus T, Verkman AS, Lukacs GL. Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. Sci Transl Med: 246ra97, 2014*

APPENDICE

Dati essenziali sull'attività scientifica FFC

Forniamo di seguito alcune informazioni, tradotte in grafici essenziali, su alcuni aspetti concernenti l'attività di ricerca della Fondazione dal 2002 al 2015. I dati sono aggiornati ad Aprile 2015

Figura 10

Figura 11

Le aree (o linee) di ricerca dei progetti sono :

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

Il Comitato Scientifico della Fondazione si riunisce dopo che i revisori internazionali hanno valutato i progetti di ricerca, compone il parere dei revisori internazionali con la valutazione interna, recepisce il parere del Consiglio di Amministrazione sull' investimento complessivo possibile per la ricerca e decide quali progetti sono da finanziare e l'entità del finanziamento per progetto.

Le CoreFacilities sono servizi di supporto alla ricerca che la Fondazione ha avviato e sostiene mettendoli al servizio di tutti i ricercatori. Le Facilities attualmente operative sono:

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

Figura 12

I progetti di ricerca vengono selezionati anno per anno a seguito di:

1) Bando Pubblico
2) Prima valutazione del Comitato Scientifico FFC
3) Valutazione secondo il metodo "Peer Review" (2-3 esperti internazionali per progetto)
4) Selezione e approvazione finale del Comitato Scientifico FFC

Nella colonna del 2015 manca il numero dei progetti selezionati perché ad Aprile 2015 erano ancora in fase di selezione attraverso i revisori internazionali

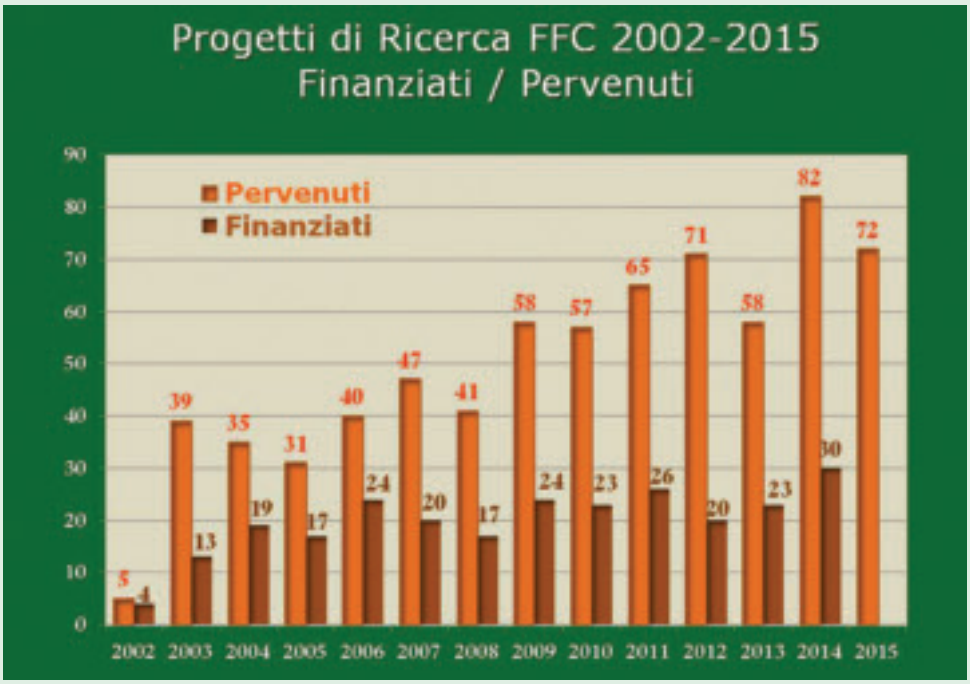

Figura 13

Il numero di progetti pervenuti attraverso bando è progressivamente aumentato, così come è aumentato nel tempo (vedi Fig. 12) l'investimento finanziario. Però la selezione si è fatta sempre più stretta: nel periodo 2002-2007 è stato approvato il 48% dei progetti pervenuti, nel periodo 2008-2014 il 37%.

Nei progetti 2015 manca la colonna di quelli finanziati perché ad Aprile 2015 era ancora in corso il processo di selezione.

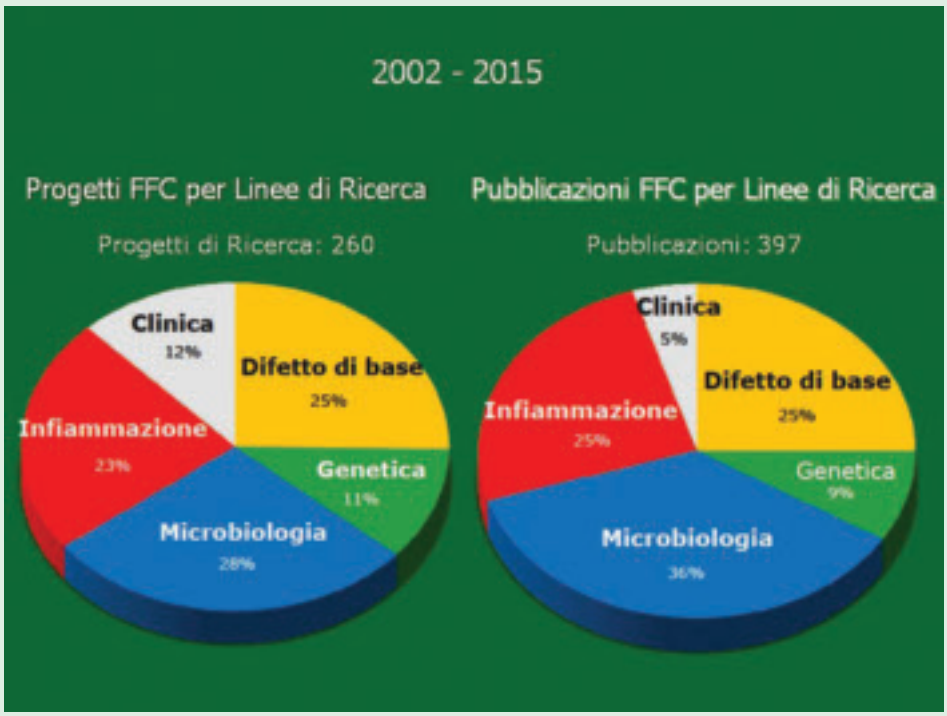

Figura 14

Distribuzione percentuale rispetto alle aree di ricerca nel numero di progetti e nel numero di pubblicazioni originate dai progetti. La distribuzione dei progetti di ricerca e delle pubblicazioni che essi generano è fortemente sovrapponibile. Questo sta ad indicare che in tutte le aree di ricerca (in minor misura nell'area della ricerca clinica) i progetti finanziati portano a risultati scientifici che sono oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali.

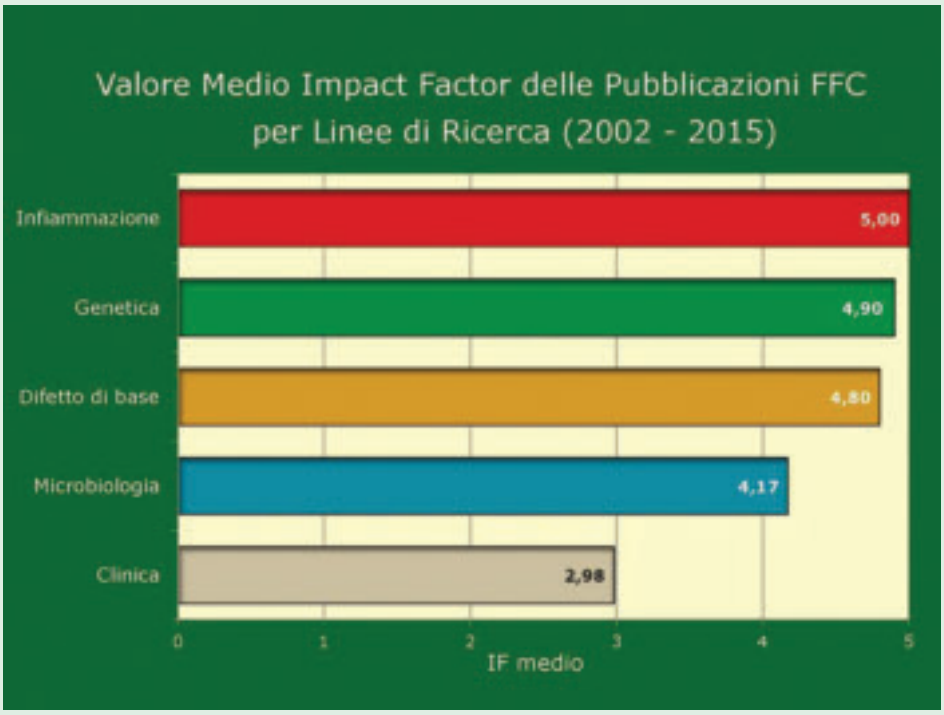

Figura 15

Le barre rappresentano il valore medio di Impact Factor (IF) delle pubblicazioni FFC per aree di ricerca nel periodo 2202-2015. L'IF è una misura dell'importanza della rivista scientifica su cui i risultati dei progetti di ricerca vengono pubblicati. Più elevato è l'IF della rivista, maggiore la sua importanza nel mondo scientifico internazionale, più rigorosamente selezionati e quindi di valore gli articoli pubblicati. Le pubblicazioni originate da progetti di ricerca nel campo dell'Infiammazione, della Genetica e della Terapia del Difetto di base sono quelle che ad Aprile 2015 hanno valore di impatto più elevato.

Presidente
VITTORIANO FAGANELLI

Direttore Scientifico
GIANNI MASTELLA

Presidente Comitato Scientifico
LUCIO LUZZATTO

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

Direzione scientifica
Direttore Gianni Mastella
Vicedirettore Graziella Borgo

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

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 (G. Cadoni, M. Bergamaschi, M. Giacopuzzi, E. Fabietti)
Tel. 045 8123597 - 7029 - 7034
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
Comunicazione
(M. Zanolli, R. Perbellini, S. Chignola, F. Malvezzi)
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, 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

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

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
Brescia	030 5233919
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
Grosseto – Manciano	333 8221877
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	388 3498587
Livorno	0586 808093
Lodi	347 0969534
Lucca	340 3436289
Mantova	335 7077280
Matera Montescaglioso	329 6016214
Messina	349 7109375
Milano	335 456809
Napoli	338 8099917
Napoli - Pompei	081 679151
Novara	331 7287449
Olbia Tempio	334 6655844
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	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
Trieste	348 4959691
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
Benevento	347 4722532
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bologna - Monte S. Pietro	051 6760729
Bolzano - Ass.Ne FC Alto Adige	338 5320360
Bolzano - Val Badia	0474 520127
Brindisi - Latiano	347 6350915
Brindisi - Torre	327 2056244
Cagliari - Isili	345 1442597
Como - Dongo	333 6846302
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Firenze – Reggello	328 7043136
Foggia - Manfredonia	347 5012570
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 "Natalina"	349 7665757
Matera - Marconia "Roberto"	338 9573904
Messina - Tremestieri	328 5541071
Milano - Brugherio	039 2873024
Milano - Bussero	340 5327647
Milano – Lainate	348 3807009
Milano – Magenta	339 4887552
Milano - Seregno	338 4848262
Modena - Sassuolo	347 3398413
Napoli - Cicciano	335 6551613
Oristano - Riola Sardo	349 2550467
Perugia - Città di Castello	320 9273469
Pisa	347 4235635
Ravenna- Faenza	0546 44310
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 DONARE

- 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

Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

www.fibrosicisticaricerca.it