



Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - ETS
fibrosicisticaricerca.it

AREA 1

Terapie e approcci innovativi per correggere
il difetto di base, genetica



Progetto FFC#1/2020

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



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Felice Amato**
(Centro CEINGE - Biotecnologie Avanzate,
Laboratorio di ricerca in fibrosi cistica,
Napoli)



Ricercatori coinvolti: 8



Qual è la durata dello studio: 2 anni



Finanziamento: € 85.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di Bologna





Perché è importante

I farmaci modulatori di CFTR hanno bisogno di una proteina CFTR su cui agire. Molte mutazioni alla base della fibrosi cistica (FC) causano la mancata o ridotta produzione di CFTR. La messa a punto di nuove tecnologie e molecole capaci di aumentare la produzione di proteina CFTR offrirebbe a correttori e potenziatori una maggiore quantità di substrato da recuperare/attivare, migliorando così l'efficacia clinica di questi farmaci. Inoltre, si potrebbe compensare la diminuita attività di CFTR causata da alcune mutazioni con un aumento della sua quantità.



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state usate due strategie per agire sull'espressione di CFTR, cioè su quel processo che trasforma le informazioni contenute nel DNA in mRNA (prima) e in proteine (poi). Da un lato si è cercato di attivare e/o aumentare il passaggio da DNA a mRNA; dall'altro di stabilizzare l'mRNA di CFTR, evitando la sua degradazione. Entrambi gli approcci permetterebbero di aumentare la quantità finale di proteina CFTR presente all'interno di una cellula.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

È stato costruito un particolare sistema CRISPR-Cas9 formato da proteine e molecole di RNA per attivare la trasformazione del DNA di CFTR in mRNA, aumentando così le copie di RNA prodotte e di conseguenza di proteina finale. Inoltre, sono state usate delle molecole artificiali chiamate PNA (acidi peptidonucleici o *Peptide Nucleic Acid*) per contrastare l'azione di molecole microRNA responsabili della degradazione dell'mRNA di CFTR. Infine, sono state sviluppate delle nanoparticelle in grado di trasportare i PNA all'interno di cellule primarie nasali di persone con FC.



Che cosa hanno ottenuto

Le nanoparticelle usate riescono effettivamente a raggiungere le cellule dell'epitelio nasale attraversando la barriera di muco e il movimento ciliare, che sono i principali ostacoli per le terapie via aerosol in FC. I PNA si sono dimostrati efficaci nel contrastare l'azione dei microRNA e quindi di regolare positivamente (aumentando) l'espressione della proteina CFTR, anche quando mutata. È stato messo a punto un particolare sistema modificato di CRISPR-Cas9 per attivare e/o aumentare l'espressione del gene CFTR.



Che cosa succederà ora

Il sistema di nanoparticelle sviluppato può essere un valido mezzo per la somministrazione di eventuali terapie a base di PNA o altri tipi di formulazioni. L'uso del sistema CRISPR rappresenta una strategia promettente per aumentare l'espressione della proteina CFTR. I risultati raggiunti sono molto interessanti per le applicazioni cliniche, sia a scopo diagnostico che terapeutico.

Per saperne di più



Obiettivi

Amplificare, mediante speciali acidi nucleici, la sintesi di proteina CFTR mutata, per offrire a correttori e potenziatori più proteina da recuperare, mirando alle mutazioni CFTR con funzione residua

Il progetto intende incrementare l'attività dei modulatori della proteina CFTR mutata, aumentando la sintesi della proteina al fine di fornire una maggior quantità di substrato a disposizione di correttori e potenziatori, per un maggior recupero di proteina e funzione di CFTR normale. Gli studi verranno fatti su cellule respiratorie primarie di persone con FC, portatrici di mutazioni con funzione residua (FR), usando speciali molecole chiamate acidi peptidonucleici (PNA). Queste sostanze possono sia inibire che amplificare la trascrizione del codice genetico dal DNA all'RNA messaggero, che è il mediatore per la produzione della proteina CFTR. Verranno prodotti e testati diversi PNA, selezionando quelli con maggiore attività di amplificazione che potranno diventare candidati a possibili farmaci da sperimentare nell'uomo in associazione con i farmaci modulatori di CFTR noti.



Risultati

Messo a punto un sistema per aumentare *in vitro* la quantità di CFTR prodotta dalle cellule e renderla maggiormente disponibile all'azione dei farmaci modulatori

Lo studio si proponeva di aumentare la quantità di proteina CFTR presente nella cellula, anche se mutata, con lo scopo di compensare la diminuita funzionalità con l'aumento di quantità. Per fare ciò si è pensato di agire su due aspetti dell'espressione di un gene (DNA):

- 1) sul promotore del gene, che è la sequenza di DNA riconosciuta da gruppi di proteine che controllano quante copie del gene CFTR devono essere prodotte (cioè trascritte in mRNA);
- 2) su sequenze specifiche dell'mRNA di CFTR, bersaglio di piccoli RNA (microRNA) che portano di solito a una minor produzione della proteina.

Sul punto 1, i ricercatori hanno costruito un particolare plasmide, cioè una piccola molecola aggiuntiva di DNA capace di conferire alla cellula particolari caratteristiche. In questo caso il plasmide è stato pensato per produrre un complesso di proteine e molecole di RNA capaci di legarsi al promotore di CFTR e attivare la sua trascrizione, aumentando così le copie di RNA prodotte e di conseguenza di proteina finale. Questo complesso proteine-RNA è costituito principalmente da una proteina Cas9 modificata in modo che sia incapace di tagliare il DNA e fusa a una proteina che attiva la trascrizione dei geni; e un RNA guida per posizionare Cas9 sul promotore di CFTR.

Per quanto riguarda il punto 2, sono state usate delle molecole artificiali (PNA – *Peptide Nucleic Acid*) simili al DNA ma modificate nella sequenza per specifici aminoacidi che le rendono particolarmente stabili. Lo scopo di queste molecole è contrastare l'azione dei microRNA, stabilizzando in qualche modo l'RNA di CFTR ed evitando la sua degradazione.

Sebbene da punti di vista diversi, questi due approcci hanno permesso di aumentare la quantità di espressione del gene CFTR, aprendo la strada allo sviluppo di molecole capaci di rendere maggiormente disponibile la proteina CFTR, anche mutata, all'azione degli attuali farmaci modulatori, migliorandone l'effetto clinico.



Per saperne di più



Un ulteriore importante risultato è stato quello di aver messo a punto un sistema di trasporto dei PNA all'interno delle cellule nasali. Il sistema è basato sull'uso di nanoparticelle di PLGA (acido poli lattico-co-glicolico), capaci di veicolare piccole molecole anche in forma aerosol e già in uso clinico.

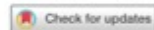
Publicazioni



Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles

Scientific Reports 2021

scientific reports



OPEN

Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles

Marika Comegna^{1,2,7}, Gemma Conte^{3,7}, Andrea Patrizia Falanga⁴, Maria Marzano⁵, Gustavo Cernera^{3,2}, Antonella Miriam Di Lullo⁶, Felice Amato^{1,2}, Nicola Borbone⁴, Stefano D'Errico⁴, Francesca Ungaro⁴, Ivana d'Angelo^{3,2}, Giorgia Oliviero^{1,2} & Giuseppe Castaldo^{1,2}

Acknowledgements

This study was supported by the Italian Cystic Fibrosis Foundation, FFC#1/2020 grant awarded to FA.

Author contributions

M.C. and F.A. performed and analyzed the cell experiments, Gemma Conte synthesized and characterized the nanoparticles, Gustavo Cernera acquired fluorescence microscope images; A.M.D.L. contributed to primary nasal cell collection, G.O. conceived and coordinated the project, G.O., A.P.F., F.A. and F.U. designed the experiments, A.P.F., M.M. and S.D. performed PNA synthesis and HPLC experiments, N.B. discussed the results and contributed to the final manuscript, Giuseppe Castaldo helped in critical commentary, G.O. and I.d'A. wrote the manuscript with input from all the authors and oversaw the research. All authors reviewed the manuscript.

Pubblicazioni



Patient-derived cell models for personalized medicine approaches in cystic fibrosis



Journal of Cystic Fibrosis • <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.11.007> 2023



Journal of Cystic Fibrosis
Volume 22, Supplement 1, March 2023, Pages S32-S38



Patient-derived cell models for personalized medicine approaches in cystic fibrosis

Anabela S. Ramalho^{a 1}, Felice Amato^{b 1}, Martina Gentsch^{c 1}  

^a Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Leuven, Belgium

^b Department Of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies and CE.IN.GE –
Biotechnologie Avanzate, University of Naples Federico II, Naples, Italy

^c Marsico Lung Institute - Cystic Fibrosis Research Center, University of North Carolina,
Chapel Hill, NC 27599, USA

Received 15 August 2022, Revised 23 November 2022, Accepted 28 November 2022, Available online
16 December 2022, Version of Record 27 February 2023.



Abstract presentati a congressi scientifici



- **Esposito Speranza, Targeting Cystic Fibrosis with CRISPRa to enhance CFTR mRNA level.**

XVIII Congresso Nazionale Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica 2022

Rendiconto economico



AREA 1

Terapie e approcci innovativi per correggere il difetto di base, genetica

Progetto FFC#1/2020

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



Responsabile:

Felice Amato

(Centro CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Laboratorio di ricerca in fibrosi cistica, Napoli)



Periodo:

01/09/2020-31/08/2022



Grant assegnato:

€ 85.000



Usato per:

- Materiale di consumo € 63.007,84
- Borse di studio € 11.003,18
- Spedizioni € 173,40
- Pubblicazioni scientifiche € 1.757,60
- Equipment € 4.440,80

€ 80.382,82



Saldo (usato per altri progetti):

€ 4.617,18