



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

AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare



Progetto FFC#17/2021

Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da Micobatteri Non Tubercolari nella fibrosi cistica



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Federico Giannoni

(Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma) sostituisce dal 01/06/2022 Lanfranco Fattorini (Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma)



Partner: Emanuele Borroni

(Unità patogeni batterici emergenti, Ospedale San Raffaele, Milano)



Ricercatori coinvolti: 4



Qual è la durata dello studio: 1 anno

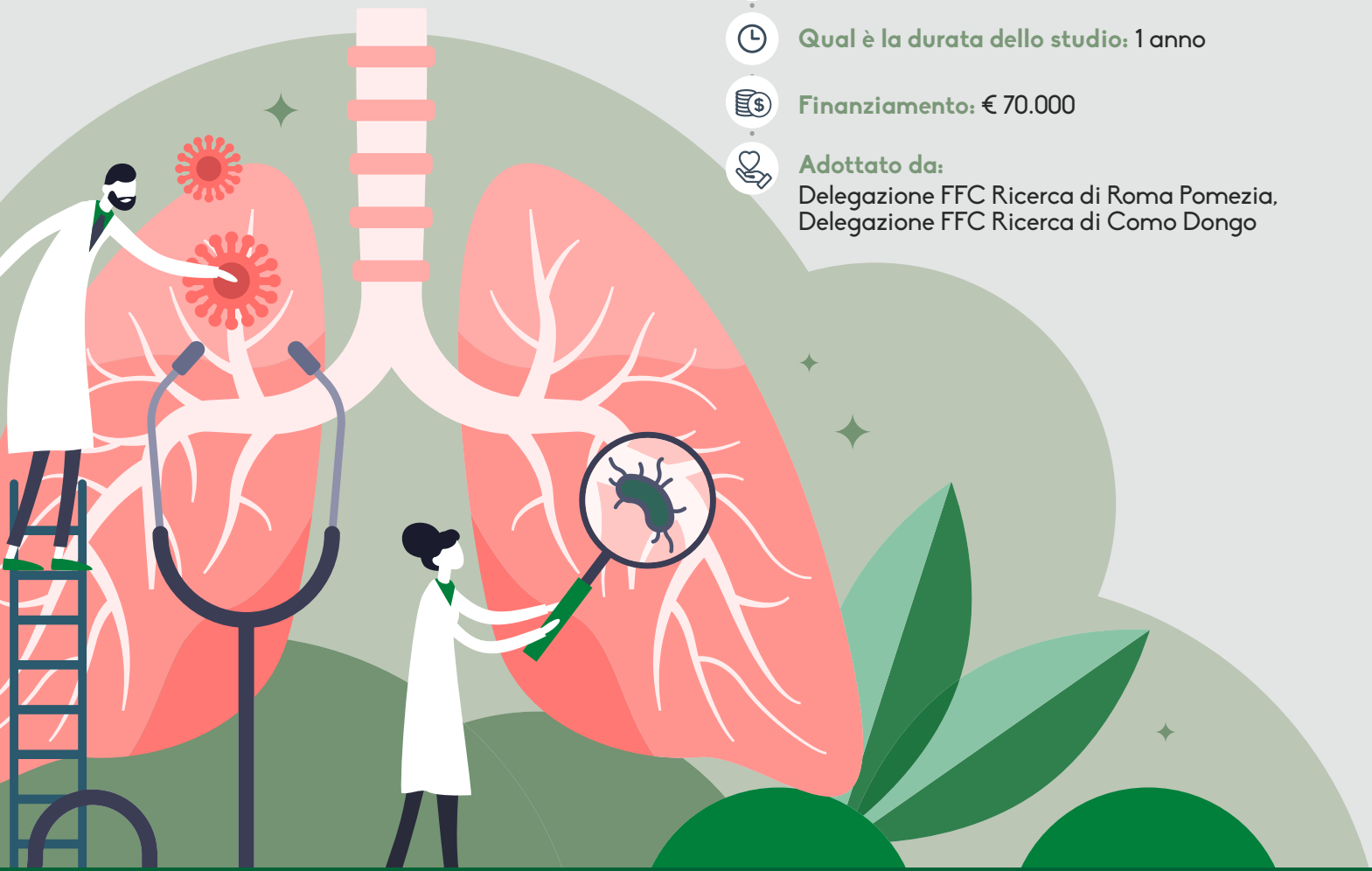


Finanziamento: € 70.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia,
Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo





Perché è importante

I Micobatteri Non Tubercolari (MNT) causano infezioni polmonari croniche nelle persone con fibrosi cistica (FC). Tra i MNT, il *Mycobacterium abscessus abscessus* (Mab) è la specie isolata più di frequente. In particolari condizioni, i MNT possono entrare in una fase dormiente, in carenza di ossigeno (ipossica), in cui non si replicano e sono più tolleranti ai farmaci. Il progetto continua lo studio di [FFC#12/2020](#) con l'obiettivo di trovare nuove combinazioni di farmaci attive sia per le forme aerobie (in presenza di ossigeno) sia per quelle anaerobie (in carenza di ossigeno).



Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state testate, in condizioni aerobie e ipossiche, combinazioni di 8 farmaci con attività anti-Mab e 10 nitro-composti, notoriamente attivi verso i batteri anaerobi.

Inoltre sono state studiate sottopopolazioni di batteri intrinsecamente multiresistenti ai farmaci, i cosiddetti *persisters*. Queste forme sono responsabili del fallimento dei trattamenti e anche dell'insorgere della resistenza genotipica.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

Sono state messe a punto colture di *Mycobacterium abscessus*, anche isolati da persone con FC, poi trattate con antibiotici. L'attività battericida è stata valutata mediante la stima del numero di batteri presenti prima e dopo il trattamento. Inoltre è stato estratto e processato l'RNA di Mab in condizioni aerobie e ipossiche.



Che cosa hanno ottenuto

La combinazione di due antibiotici, la bedaquilina e l'amikacina, è risultata molto efficace verso le forme aerobie del batterio, meno verso i batteri dormienti in fase ipossica. Si è pensato perciò di aggiungere un terzo farmaco: alcune combinazioni aumentavano la mortalità verso gli aerobi, altre verso gli anaerobi. Per ottenere una combinazione capace di uccidere entrambe le forme (aerobie e anaerobie) si è reso necessario utilizzare 5 farmaci contemporaneamente. Dati preliminari sui *persisters* suggeriscono che si tratta di batteri dormienti, pur in assenza di ipossia.



Che cosa succederà ora

Gli studi proseguono nel progetto [FFC#6/2022](#) con l'obiettivo di individuare antibiotici capaci di contrastare le infezioni da MNT, aerobi e anaerobi, in meno di un mese. Tale combinazione verrà poi ulteriormente studiata in modelli animali e per possibili studi clinici, in modo da riuscire ad accorciare i tempi delle terapie anti-Mab usate in fibrosi cistica.

Per saperne di più



Obiettivi

Cercare nuove associazioni di farmaci per migliorare le terapie contro i Micobatteri Non Tubercolari (MNT) e approfondire la conoscenza sullo stato di dormienza e ipossia

I Micobatteri Non Tubercolari (MNT) causano infezioni polmonari croniche in soggetti con fibrosi cistica (FC); tra questi, *Mycobacterium abscessus* (Mab) e *Mycobacterium avium-complex* (MAC) sono le specie più isolate. I MNT formano dei biofilm e, quando raggiungono un certo spessore, esauriscono l'ossigeno generando una condizione di ipossia (carenza di ossigeno) che li rende meno sensibili ai farmaci. Per combattere tali infezioni nella FC, occorre trovare nuove combinazioni antibiotiche per uccidere i MNT che vivono nel biofilm ipossico. Queste combinazioni di farmaci verranno testate in condizioni aerobiche, ipossiche e nel biofilm, tutte riscontrate in persone con FC. I ceppi di Mab e MAC, raccolti attraverso la rete SMI-NTM (Studio Multicentrico Italiano - *Non-tuberculous Mycobacteria*), saranno caratterizzati mediante sequenziamento del genoma e saggiati per l'attività dei farmaci. In questo progetto, estensione di FFC#12/2020, verrà valutata l'efficacia di diverse combinazioni di farmaci e le migliori saranno testate contro i MNT isolati da persone con FC. Inoltre, il gruppo di ricerca cercherà di identificare i geni responsabili del passaggio dei MNT alla condizione di ipossia. L'obiettivo del progetto rimane quello di trovare almeno una combinazione di farmaci che uccida i MNT *in vitro*, da approfondire in modelli sperimentali per abbreviare le terapie a lungo termine nella FC.



Risultati

Alcune combinazioni di antibiotici hanno mostrato una promettente attività anti-*Mycobacterium abscessus* anche in fase dormiente e ipossica

I Micobatteri Non Tubercolari (MNT) causano infezioni polmonari croniche in persone con fibrosi cistica. Tra questi, *Mycobacterium abscessus* (Mab) è la specie isolata più di frequente. I MNT possono formare un biofilm, un sorta di pellicola che riveste le pareti degli alveoli e le vie aeree dei pazienti e causa una diminuzione dei livelli di ossigeno. In queste condizioni si innesca una fase ipossica, durante la quale i Mab non si replicano e sono più resistenti al trattamento con i farmaci.

Per combattere i MNT occorre quindi trovare nuove combinazioni di farmaci attive verso le forme aerobie (cioè che vivono in presenza di ossigeno) sia anaerobie (che vivono in carenza di ossigeno).

In questo studio i ricercatori hanno valutato l'efficacia di combinazioni di 8 farmaci attivi contro i Mab e di 10 nitro-composti, sostanze attive verso i batteri anaerobi. La combinazione di bedaquilina e amikacina era molto efficace verso la forma aerobia del batterio, ma meno verso i batteri dormienti. Risultati ancora più interessanti sono stati ottenuti aggiungendo un terzo farmaco: per esempio, l'aggiunta di moxifloxacina o clofazimina ha aumentato la mortalità verso le forme aerobie di Mab, mentre l'aggiunta di farmaci come la claritromicina, la colistina e alcuni nitrocomposti, come il metronidazolo e il nimorazolo, ha incrementato l'eliminazione delle forme anaerobie. Nel complesso, per ottenere una combinazione di farmaci in grado di uccidere sia le cellule aerobie sia quelle anaerobie, è stato necessario usare 5 farmaci contemporaneamente.

Per saperne di più



Inoltre, uno dei problemi più rilevanti dei trattamenti antibiotici è la presenza di sottopopolazioni di batteri multiresistenti, cioè resistenti a più farmaci, chiamati persisters (persistenti). Queste forme sono responsabili del fallimento dei trattamenti e anche dell'insorgere della resistenza genotipica, come evidenziato dai test di sequenziamento del genoma di MNT. Lo studio delle forme persistenti, appena iniziato, suggerisce che si tratta di batteri dormienti anche in assenza dello stimolo che generalmente innesca il blocco della replicazione, cioè l'ipossia. In conclusione, i ricercatori impegnati in questo studio hanno testato l'attività di numerosi farmaci con promettente attività anti-Mab e hanno iniziato a caratterizzare le forme multiresistenti (dormienti e persistenti) che costituiscono il nemico principale durante i trattamenti farmacologici delle infezioni polmonari croniche nelle persone con FC.

Gli studi proseguiranno nel progetto FFC#6/2022 con l'obiettivo di individuare antibiotici capaci di contrastare le infezioni da MNT, aerobi e anaerobi, in meno di un mese. Tale combinazione verrà poi ulteriormente studiata in modelli animali e per possibili studi clinici, in modo da riuscire ad accorciare i tempi delle terapie anti-Mab usate in fibrosi cistica.

Publicazioni



Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions

Microorganism, 2022



microorganisms



Article

Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions

Alessio Lanni ¹, Emanuele Borroni ², Angelo Iacobino ¹, Cristina Russo ³, Leonarda Gentile ³, Lanfranco Fattorini ¹ and Federico Giannoni ^{1,*}

- ¹ Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; alessio.lanni@guest.iss.it (A.L.); angelo.iacobino@iss.it (A.I.); lanfranco.fattorini@iss.it (L.F.)
² Emerging Bacterial Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, 20132 Milan, Italy; borroni.emanuele@hsr.it
³ Bambino Gesù Children's Hospital, 00165 Rome, Italy; cristina.russo@opbg.net (C.R.); leonarda.gentile@opbg.net (L.G.)
* Correspondence: federico.giannoni@iss.it; Tel.: +39-06-49902318; Fax: +39-06-49387112

Abstract: Infections caused by *Mycobacterium abscessus* (Mab), an environmental non-tuberculous mycobacterium, are difficult to eradicate from patients with pulmonary diseases such as cystic fibrosis and bronchiectasis even after years of antibiotic treatments. In these people, the low oxygen pressure in mucus and biofilm may restrict Mab growth from actively replicating aerobic (A) to non-replicating hypoxic (H) stages, which are known to be extremely drug-tolerant. After the exposure of Mab A and H cells to drugs, killing was monitored by measuring colony-forming units (CFU) and regrowth in liquid medium (MGIT 960) of 1-day-old A cells (A1) and 5-day-old H cells (H5). Mab killing was defined as a lack of regrowth of drug-exposed cells in MGIT tubes after >50 days of incubation. Out of 18 drugs tested, 14-day treatments with bedaquiline-amikacin (BDQ-AMK)-containing three-drug combinations were very active against A1 + H5 cells. However, drug-tolerant cells (persisters) were not killed, as shown by CFU curves with typical bimodal trends. Instead, 56-day treatments with the nitrocompounds containing combinations BDQ-AMK-rifabutin-clarithromycin-nimorazole and BDQ-AMK-rifabutin-clarithromycin-metronidazole-colistin killed all A1 + H5 Mab cells in 42 and 56 days, respectively, as shown by lack of regrowth in agar and MGIT medium. Overall, these data indicated that Mab persisters may be killed by appropriate drug combinations.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; cystic fibrosis; aerobiosis; anaerobiosis; nitrocompounds; colistin; nimorazole; persisters; drug combinations; drug tolerance



Citation: Lanni, A.; Borroni, E.; Iacobino, A.; Russo, C.; Gentile, L.; Fattorini, L.; Giannoni, F. Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1421. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071421>

Academic Editors: Masaki Fujita

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10071421/s1>, Table S1: MICs of Mab-10. Table S2: drugs tested.

Author Contributions: L.F. and F.G. conceived and designed the experiments; A.L., E.B. and A.I. performed the experiments; C.R., L.G., L.F. and F.G. analysed the data; L.F. and F.G. wrote the manuscript; A.L., E.B., A.I., C.R., L.G., L.F. and F.G. revised the manuscript; L.F. and F.G. acquired funding. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation, Grants FFC#12/2020 with the contribution of Delegazione FFC di Como Dongo and "In memory of Franco Miliotti", and FFC#17/2021 with the contribution of Delegazione FFC of Como Dongo and Delegazione FFC of Roma Pomezia.

Institutional Review Board Statement: This study did not require ethical approval.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Rendiconto economico



AREA 3

Terapie dell'infezione broncopolmonare

Progetto FFC#17/2021

Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da Micobatteri Non Tubercolari nella fibrosi cistica



Responsabile:

Federico Giannoni

(Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma)



Periodo:

01/09/2021-31/08/2022



Grant assegnato:

€ 70.000



Usato per:

- Materiale di consumo

€ 35.222,79

- Borse di studio

€ 28.000,00

€ 63.222,79



Saldo (usato per altri progetti):

€ 6.777,21