



21ST CONVENTION OF INVESTIGATORS IN CYSTIC FIBROSIS

**XXI CONVENTION D'AUTUNNO
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA**

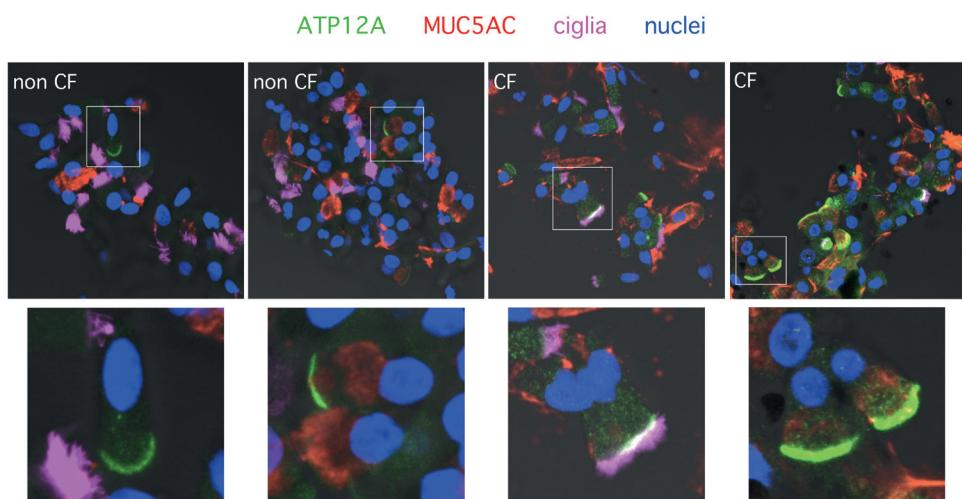
CENTRO CONGRESSI CAMERA DI COMMERCIO
Corso Porta Nuova, 96 · Verona

**VERONA
23-25**
November 2023



***Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - ETS***
italian cystic fibrosis research foundation

On the cover / In copertina: ATP12A expression in the nasal mucosa of people without and with CF / Espressione della proteina ATP12A in cellule nasali derivate da persone senza e con FC



Detection of ATP12A protein in nasal brushings. ATP12A is a proton pump expressed in the apical membrane of airway epithelial cells that is upregulated in the lungs of people with cystic fibrosis (CF). The activity of ATP12A is considered to be pathogenic, since acidification of the airway surface may abolish antibacterial activity and make mucus secretions more viscous. The images show ATP12A protein (green) in freshly fixed nasal brushings derived from non-CF and CF patients. MUC5AC mucin (red) and acetylated tubulin (i.e., cilia, magenta) were also detected. When comparing non CF and CF cells, it was observed that cells from many people with CF have enhanced expression of ATP12A in the apical membrane. Furthermore, many CF samples showed unusual ATP12A expression in ciliated cells. Images were taken with a confocal microscope. At the top, rectangles in the low-magnification images indicate the regions that are magnified in the bottom images.

Espressione della proteina ATP12A in cellule della mucosa nasale. ATP12A è una pompa protonica espressa nella membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree. È sovraespressa nei polmoni delle persone con fibrosi cistica e la sua attività è considerata patogena poiché l'acidificazione della superficie delle vie aeree può abolire la loro attività antibatterica e rendere il muco più viscoso. Le immagini mostrano la proteina ATP12A (in verde) in cellule della mucosa nasale derivate da persone con e senza fibrosi cistica. In rosso la mucina MUC5AC e in magenta la tubulina acetilata, che rappresenta le ciglia. Dal confronto tra le cellule non-CF (persone senza FC) e CF (persone con FC) emerge che le cellule di molte persone con FC hanno una maggiore espressione di ATP12A sulla membrana apicale. Inoltre, nelle cellule ciliate sembra esserci un'inaspettata espressione di ATP12A (terza immagine). Le immagini sono state ottenute al microscopio confocale. I rettangoli in basso mostrano ad alto ingrandimento alcune regioni delle immagini soprasortanti.

Guidone D, Buccirossi M, Scudieri P, Genovese M, Sarnataro S, De Cegli R, Cresta F, Terlizzi V, Planelles G, Crannert G, Sermet I, Galietta L]. Airway surface hyperviscosity and defective mucociliary transport by IL-17/TNF- α are corrected by β -adrenergic stimulus. JCI Insight. 2022 Nov 22;7(22):e164944

In collaboration with / In collaborazione con



AZIENDA OSPEDALIERA
UNIVERSITARIA INTEGRATA
VERONA

With the support of / Con il sostegno di



CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO
AGRICOLTURA VERONA

Editorial staff / Redazione

Luisa Alessio, Federica Lavarini, Ermanno Rizzi

Graphics and layout / Grafica e impaginazione

Porpora ADV - Michela Chesini

Chiara Maccaferri

Cover image / Foto di copertina

Courtesy of Luis J. V. Galietta

Print / Stampa

November 2023, Mediaprint Verona



21st Convention of FFC Ricerca investigators in cystic fibrosis

XXI Convention d'autunno dei ricercatori
in fibrosi cistica

Verona
23 - 25 November 2023
Camera di Commercio, Corso Porta Nuova 96

Work in progress of projects funded by FFC Ricerca (2021-2023)

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti
finanziati da FFC Ricerca (2021-2023)

General Index

Program at a glance	3
Full Index of Abstracts.....	4
Abstracts of oral presentations	8

Appendices

1. Archive of Publications from FFC Ricerca Projects (2013-2023)	68
2. Institutes and Laboratories involved in the projects presented at the 21 st FFC Ricerca Convention	88
3. International Reviewers of FFC Ricerca Projects	89
4. FFC Ricerca Projects (2021-2023) adopted by Supporters	92

Program at a glance

Thursday, 23 November 2023

09:30 - 10:30	Registration and poster display
10:30 - 11:15	Introduction and greetings
11:15 - 12:25	SESSION 1 - ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS AND NEW EXPERIMENTAL MODELS
12:25 - 13:55	Lunch & Poster session
13:55 - 15:00	SESSION 2 - TREATMENTS FOR NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA
15:00 - 16:30	SESSION 3 - NEW CFTR MODULATORS
16:30 - 17:00	Coffee Break
17:00 - 18:15	SESSION 4 - PERSONALIZED THERAPIES

Friday, 24 November 2023

08:30 - 09:40	SESSION 5 - CORRECTING THE CFTR BASIC DEFECT
09:40 - 10:35	SESSION 6 - TREATMENT OF RARE AND ORPHAN MUTATIONS
10:35 - 11:05	Coffee Break
11:05 - 12:40	SESSION 7 - FIGHTING ANTIMICROBIAL RESISTANCE
12:40 - 14:05	Lunch & Poster session
14:05 - 15:25	SESSION 8 - NEW STRATEGIES AGAINST BUGS AND MOLDS
15:25 - 15:55	Coffee Break
15:55 - 16:15	KEYNOTE SPEECH - GENE THERAPY FOR CYSTIC FIBROSIS: CHALLENGES AND PERSPECTIVES
16:15 - 17:15	SESSION 9 - DNA AND RNA EDITING
17:15 - 17:55	SESSION 10 - REACHING OUT: TRAINING AND INFORMING
20:00	Social Dinner

Saturday, 25 November 2023

09:00 - 10:10	SESSION 11 - TRIGGERING THE IMMUNE SYSTEM
10:10 - 11:05	SESSION 12 - CLINICAL STUDIES
11:05 - 11:35	Coffee Break
11:35 - 13:00	SESSION 13 - KAFTRIO UNVEILED
13:00 - 13:10	Closing remarks

Full Index of Abstracts

SESSION 1 - ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS AND NEW EXPERIMENTAL MODELS

1. **Alessandra Bragonzi, Federica Ungaro, Valeria Daccò** (FFC#5/2023).....**8**
Beyond the lung: the gut's role in the pathology of cystic fibrosis
2. **Marco Cafora** (GMRF#1/2023)**9**
Ex vivo pig lung as a new model to study the efficacy of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis
3. **Roberto Plebani** (GMSG#1/2023).....**10**
Developing a new respiratory 3D model as an innovative strategy to study the inflammation pathology in cystic fibrosis
4. **Mario Romano, Mauro Perretti** (FFC#15/2023)**11**
Melanocortins to control cystic fibrosis airway inflammation
5. **Ilaria Lampronti** (FFC#10/2022).....**12**
Towards the development of GY-971a as anti-inflammatory drug in cystic fibrosis

SESSION 2 - TREATMENTS FOR NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

6. **Laurent Robert Chiarelli, Fiorella Meneghetti, Sonia Covaceuszach** (FFC#5/2022).....**13**
Nontuberculous Mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *Mycobacterium abscessus* iron acquisition pathways
7. **Federico Giannoni, Emanuele Borroni** (FFC#6/2022).....**14**
Search for drug combinations killing *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis
8. **Maria Rosalia Pasca, Riccardo Manganelli, Fabio Saliu** (FFC#9/2023)**15**
Evaluation of the efficacy of the “VOMG” new antibiotic against *Mycobacterium abscessus*
9. **Maurizio Fraziano, Daniela Maria Cirillo** (FFC#13/2022)**16**
Fighting *Mycobacterium abscessus* infections by a novel combination therapy

SESSION 3 - NEW CFTR MODULATORS

10. **Enrico Millo, Elena Cichero, Santina Bruzzone** (FFC#9/2021)**17**
Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del-CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis
11. **Fabio Bertozzi** (FFC#2/2022)**18**
Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach
12. **Maria Luisa Mangoni, Arianna Venturini, Mattia Mori** (FFC#4/2022)**19**
Esculetin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease
13. **Paola Barraja, Luis J.V. Galietta** (Molecules 3.0).....**21**
New generation of pharmacological modulators to rescue mutant CFTR protein

SESSION 4 - PERSONALIZED THERAPIES

14. **Onofrio Laselva, Enza Montemitro** (FFC#6/2021).....**22**
Enhancing the prediction of clinical responses to CFTR modulators by in-vitro assays using patient-derived tissues under conditions mimicking native status of CF airways

15. Marco Lucarelli, Adriana Eramo (FFC#8/2021)	23
Therotyping of cystic fibrosis	
16. Nicoletta Pedemonte, Renata Bocciardi (FFC#10/2021)	24
Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs	
17. Renata Bocciardi (FFC#3/2023)	25
Understanding the mechanisms behind the variable efficacy of CFTR modulators on the N1303K mutation on human primary nasal epithelial cells	

SESSION 5 - CORRECTING THE CFTR BASIC DEFECT

18. Giorgio Cozza, Federica Rossin (FFC#4/2021)	27
Oxidative stress and autophagy in cystic fibrosis: novel biochemical characterizations and drug discovery approaches	
19. Carlos M. Farinha, Valeria Tomati (FFC2#/2023)	28
Exploring the cellular pathways to promote rescue of mutant CFTR protein in cystic fibrosis	
20. Luis J. V. Galietta (FFC#9/2022)	29
Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis	
21. Paolo Scudieri, Fabiana Ciciriello (FFC#11/2021)	30
Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect	

SESSION 6 - TREATMENT OF RARE AND ORPHAN MUTATIONS

22. Laura Lentini, Ivana Pibiri (FFC#6/2020)	31
Validation of the biodistribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems	
23. Massimo Aureli, Anna Tamanini (FFC#1/2022)	32
A lipid-based therapeutic approach to rescue F508del-CFTR and CFTR with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis	
24. Emilio Hirsch (FFC#3/2022)	33
Rescuing rare CFTR mutants with a PI3K γ mimetic peptide	

SESSION 7 - FIGHTING ANTIMICROBIAL RESISTANCE

25. Fiorentina Ascenzioni, Bruno Botta, Mattia Mori, Stefano Salmaso (FFC#12/2021)	35
Pharmacological inhibition of colistin resistance in Gram-negative cystic fibrosis pathogens	
26. Andrea Battistoni, Luigi Scipione (FFC#4/2023)	36
A Trojan horse strategy to improve the treatment of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infections	
27. Silvia Buroni, Antonio Coluccia (FFC#6/2023)	37
Using a Virtual Screening approach to find new drugs against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	
28. Giordano Rampioni (FFC#10/2023)	38
Drug repurposing to inhibit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> adaptation to the CF lung environment	
29. Barbara Citterio, Massimiliano Lucidi (FFC#7/2023)	39
Evaluation of cefiderocol activity against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in cystic fibrosis lung infections	
30. Natalia Cirilli, Luca Tiano, Rosaria Gesuita (FFC#22/2020)	40
Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting: a translational research	

SESSION 8 - NEW STRATEGIES AGAINST BUGS AND MOLDS

31. Nicola Ivan Lorè, Lisa Cariani (FFC#7/2022)	41
Genomic and phenotypic characterization of <i>Mycobacterium abscessus</i> and detection of host biomarkers to define Mycobacterial infection in cystic fibrosis	
32. Loris Rizzello, Giulia Degiacomi (FFC#11/2023)	43
Resolving <i>Mycobacterium abscessus</i> infections with a phages-inspired therapy	
33. Anna Silvia Pistocchi (FFC#12/2022)	44
Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application	
34. Federica Briani (FFC#16/2023)	45
Facing resistance to therapeutic phages observed in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates from people with cystic fibrosis	
35. Eugenio Notomista, Ivana D'Angelo (FFC#8/2023)	46
Inhalable nanoparticles delivering peptidomimetic/antibiotic combinations for local treatment of CF lung infections	
36. Teresa Zelante (FFC#15/2022)	47
Study on anti-fungal immunoglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis	

SESSION 9 - DNA AND RNA EDITING

37. Giulia Maule (GMSG#1/2022)	48
Development of CRISPR-Cas delivery system for genome editing applications in cystic fibrosis	
38. Anna Cereseto, Daniele Arosio (FFC#2/2021)	49
Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del and 2789+5G>A CFTR defects	
39. Aldo Di Leonardo (FFC#5/2021)	50
<i>In vitro</i> evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript	

SESSION 10 - REACHING OUT: TRAINING AND INFORMING

40. Carlo Castellani (1 out of 30 and You Don't Know It)	51
A campaign for a better comprehension and awareness of the cystic fibrosis carrier test	
41. Michele Gangemi (Experts together)	52
Inclusion and activation of CF Community as partners in the various stages of the research process	

SESSION 11 - TRIGGERING THE IMMUNE SYSTEM

42. Domenico Mattoscio (FFC#11/2022)	53
Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis	
43. Moira Paroni, Clelia Peano (FFC#14/2023)	54
Identification of molecular mechanisms which underpin the activation of pathogenic pulmonary Th1/17 cells in cystic fibrosis	
44. Mauro Piacentini, Valeria Raia (FFC#8/2022)	55
Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis	

45. Edoardo Scarpa, Daniela Maria Cirillo (FFC#12/2023)	57
Fostering pathogen host-mediated clearance to neutralize <i>Mycobacterium abscessus</i> infection	
46. Marco Sette, Mattia Falconi, Marco Rinaldo Oggioni (FFC#13/2023)	58
Building simple molecules containing regions of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to stimulate the immune system against this pathogen	

SESSION 12 - CLINICAL STUDIES

47. Vittorio Scaravilli (FFC#27/2019).....	60
Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation	
48. Gianluca Serafini (FFC#21/2021)	61
Mental health in cystic fibrosis patients: the prognostic role of temperament, personality and attachment styles	
49. Riccardo Percudani, Gianfranco Pasut, Rosaria Casciaro (FFC#14/2022).....	62
Actin-resistant acidic DNase for the treatment of CF pulmonary symptoms	

SESSION 13 - KAFTRIO UNVEILED

50. Sonia Volpi, Maria Cristina Lucanto, Cesare Braggion (Effetto Kaftrio)	63
Post-marketing studies on effectiveness and safety of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) in Italian people with cystic fibrosis	
51. Andrea Armirotti, Valeria Tomati, Rosaria Bassi (FFC#1/2021, FFC#1/2023)	64
Investigation of Kaftrio secondary effects on sphingolipid synthesis	
52. Cristina Cigana, Daniela Girelli, Ersilia Fiscarelli (FFC#16/2021).....	65
Linking elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease	
53. Alberto Battezzati, Carla Colombo, Maria Cristina Lucanto, Vincenzina Lucidi, Andrea Mari (FFC#24/2019).....	67
Early derangements of glucose tolerance in cystic fibrosis: effect of CFTR modulators	

Abstracts of oral presentations

SESSION 1

Anti-inflammatory compounds and new experimental models

Beyond the lung: the gut's role in the pathology of cystic fibrosis

Oltre il polmone: studiare il ruolo dell'intestino nella fibrosi cistica



From the left: Alessandra Bragonzi,
Federica Ungaro, Valeria Daccò

1

**Alessandra Bragonzi¹, Federica
Ungaro², Valeria Daccò³**

¹ Infection and Cystic Fibrosis Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ² Experimental Gastroenterology Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ³ Cystic Fibrosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Italy (**FFC#5/2023, new**)

Background and rationale

Cystic Fibrosis (CF) research on infection and inflammation has primarily focused on lung-related aspects, with limited exploration of distal organs as contributors to the initiation and progression of lung damage. Emerging data highlight the connection between gut microbiology and respiratory outcomes, yet the gut/lung cross-talk in CF is still poorly defined.

Hypothesis and objectives

*Our hypothesis is that the gut mucosa significantly impacts lung microbiology and immunology in people with CF (pwCF). Our three main objectives are: i) Investigate gut-lung crosstalk mechanisms using novel mouse models with *Pseudomonas aeruginosa* intramucosal gut infection in genetically diverse Collaborative Cross (CC) mice carrying the F508del mutation. ii) Determine whether CFTR mutation and/or dysbiosis are primary factors influencing the gut-lung axis. iii) Translate our findings to pwCF cohorts.*

Essential methods

*Our goals include: i) analyzing gut mucosal immune activation, markers of gut barrier damage, microbiological cultures and their correlation with lung health; ii) investigating the impact of CFTR mutations and dysbiosis by comparing wild-type and CF mice with or without microbiota depletion through antibiotics treatment; iii) assessing the presence of identical pathogens through genotypic and phenotypic characterization of longitudinal bacterial strains from the gut and lungs of pwCF including young patients at first infection and patients infected with *P. aeruginosa* under Kaftrio treatment.*

Preliminary results

Our unique CF mouse model, developed in the genetically diverse Collaborative Cross (CC) line 37 (CC037ΔF508/ΔF508), exhibits severe lethality and failure to thrive due to gut obstruction. This phenotype, distinct from other C57Bl/6 models, is accompanied by early systemic and respiratory inflammation. The increased gut barrier permeability and the presence of enteric bacteria in the lungs of CC037ΔF508/ΔF508 mice indicate a potential gut-lung crosstalk that will be a focal point of investigation in this project.

Conclusions

We will establish whether: i) compromised gut barrier integrity results in microbial translocation within-host from the gut to the lung, and/or trigger cell activation; ii) CFTR mutation and/or dysbiosis are influencing factors; iii) in pwCF, the gut acts as the primary source of infection and inflammation, persistently affecting the lung even during CFTR-modulator treatment.

Razionale dello studio

La ricerca in fibrosi cistica (FC) relativa alle infezioni e all'infiammazione si è principalmente focalizzata sui polmoni, con una limitata esplorazione degli organi distali come contribuenti all'insorgenza e progressione del danno polmonare. Dati emergenti evidenziano la connessione tra la microbiologia intestinale e gli esiti respiratori, ma il rapporto tra intestino e polmoni nella FC è ancora poco studiato.

Ipotesi e obiettivi

La nostra ipotesi suggerisce che la mucosa intestinale abbia una influenza significativa sulla microbiologia e l'immunologia polmonare nelle persone con FC (pFC). I tre obiettivi principali sono: i) studiare i meccanismi di interazione intestino-polmone usando nuovi modelli di topo con infusione intestinale intramucosale da *Pseudomonas aeruginosa* in topi Collaborative Cross (CC) con mutazione F508del; ii) valutare se le mutazioni di CFTR e/o la disbiosi siano i principali fattori che influenzano l'asse intestino-polmone; iii) convalidare i nostri risultati in persone con FC.

Metodi

i) Analizzare l'attivazione del sistema immunitario della mucosa intestinale, i marcatori di danno alla barriera intestinale e le colture microbiologiche in relazione alla patologia polmonare. ii) Studiare l'impatto delle mutazioni di CFTR e della disbiosi confrontando topi wild-type e FC con o senza deplezione del microbiota tramite trattamento antibiotico. iii) Valutare le colture microbiologiche mediante caratterizzazione genotipica e fenotipica di ceppi batterici longitudinali da intestino e polmoni di pFC, inclusi giovani pazienti con la prima infezione e pazienti infettati da *P. aeruginosa* in trattamento con Kaftrio.

Risultati preliminari

Il nostro modello di topo FC nella linea CC037ΔF508/ΔF508 presenta grave letalità dovuta a un'occlusione intestinale. Questo fenotipo, diversamente da altri modelli C57Bl/6, è associato a un'infiammazione sistemica e respiratoria precoce, reversibile con trattamento lassativo. L'aumentata permeabilità della barriera intestinale e la presenza di batteri enterici nei polmoni dei topi CC037ΔF508/ΔF508 indicano un potenziale legame intestino-polmone che sarà al centro dell'indagine in questo progetto.

Conclusioni

Stabiliremo se: i) la compromissione dell'integrità della barriera intestinale comporta una traslocazione microbica all'interno dell'ospite dall'intestino ai polmoni, e/o attiva le cellule; ii) le mutazioni di CFTR e/o la disbiosi siano fattori influenti; iii) nelle pFC, l'intestino agisce come principale fonte di infezione e infiammazione, influenzando persistentemente i polmoni anche durante il trattamento con modulatori del CFTR.

Ex vivo pig lung as a new model to study the efficacy of phage therapy against Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis

Espianti di polmone di maiale come nuovo modello per testare la terapia fagica contro infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica



Marco Cafora (on the right) and his collaborators

2

Marco Cafora¹, Francesca Forti², Freya Harrison³, Federica Briani², Anna Pistocchi¹

¹ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - ² Department of Biosciences, University of Milan, Italy - ³ School of Life Science, University of Warwick (UK) (GMRF#1/2023, new)

Background and rationale

Chronic bacterial infections affect individuals whose normal immune defenses are compromised, including those with cystic fibrosis (CF). Pseudomonas aeruginosa (Pa) colonization of the abnormally thick mucus in the respiratory tract leads to intractable biofilm infections of the lower airways. Despite repeated antibiotic administration, episodes of acute pulmonary exacerbation leading to death from respiratory failure occur. There is the urgent need to develop new therapeutic treatments to counteract this type of infection by using new models for the study of biofilm formation. Indeed, at present, biofilm studies are mainly based on assays on plastic surfaces. The use of mimic models which by recapitulating the in vivo environment reproduce the metabolic state of the pathogen, leading to the formation of bona fide biofilm.

Hypothesis and objectives

The present project aims to use the ex vivo pig lung (EVPL) CF model, a powerful system that mimics the physicochemical environment of the human CF airways allowing for in vivo biofilm-like growth, to validate the efficacy of phage therapy against Pa biofilm-associated infections. This ex vivo platform could enhance testing combined phages and antibiotics assay.

Essential methods

We are setting up the EVPL CF model to study infections from different strains of Pa (i.e. laboratory strains as PAO1, or strains derived from individuals with CF treated with modulators) and the antimicrobial effects of new or already characterized phages, alone or in combination with antibiotics. In addition, the results obtained on the EVPL CF model will be validated using the CF human primary bronchial epithelial cells.

Preliminary results

*In previous projects, we isolated and characterized new phages specific for Pa. We demonstrated their antimicrobial potential both in vitro, using planktonic culture and biofilm, and in vivo, on *Galleria mellonella*, mouse and wild-type or CF zebrafish acute infection models.*

Conclusions

The present study aims to demonstrate the potency of a new CF model to test the efficacy of phage therapy against Pa biofilm, in order to address an unsolved issue of phage therapy. The topic is of absolute importance for individuals with CF as this pathogen is difficult to eradicate due to its high mutational adaptation rate and its ability to switch to a biofilm lifestyle. In addition, the new CF model, once developed, will be available for FFC Ricerca projects testing antimicrobial agents.

Razionale dello studio

Le infezioni batteriche croniche hanno particolare incidenza sugli individui con difese immunitarie compromesse, come le persone con fibrosi cistica (FC). La colonizzazione del tratto respiratorio da parte di *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) causa l'insorgenza di infezioni caratterizzate dalla presenza di biofilm. Nonostante somministrazioni ripetute di antibiotici, si verificano episodi di esacerbazione polmonare acuta che portano spesso alla morte per insufficienza respiratoria. Per contrastare questo tipo di infezione, c'è la necessità di sviluppare nuovi trattamenti terapeutici attraverso l'uso di nuovi modelli per lo studio del biofilm che, a oggi, è studiato principalmente tramite saggi svolti su supporti in plastica. Al contrario, modelli che ricapitolano l'ambiente *in vivo*, possono riprodurre lo stato metabolico del patogeno, portando alla formazione di un biofilm autentico.

Ipotesi e obiettivi

Il progetto mira all'uso del modello FC di espianto di polmone di maiale (EVPL), un efficace sistema che mima l'ambiente chimico-fisico delle vie aeree umane FC permettendo la formazione di un biofilm simile alla situazione *in vivo*, per validare l'efficacia della terapia fagica contro infezioni da Pa con presenza di biofilm. Inoltre, tramite questa piattaforma *ex vivo* verrà testata l'efficacia dei fagi in combinazione con antibiotici.

Metodi	Il modello FC EVPL verrà usato per studiare le infezioni da diversi ceppi di Pa (di laboratorio o derivati da persone con FC in trattamento con i modulatori) e le proprietà antimicrobiche di fagi nuovi e già caratterizzati, anche in combinazione con antibiotici. Infine, i risultati ottenuti verranno verificati usando modelli di cellule epiteliali bronchiali umane FC.
Risultati preliminari	Sono stati isolati e caratterizzati nuovi fagi specifici per Pa e dimostrato il loro potenziale antimicrobico <i>in vitro</i> , su colture planctoniche e su biofilm, e <i>in vivo</i> , su diversi modelli animali quali topo e zebrafish.
Conclusioni	Questo studio vuole dimostrare il potenziale di un nuovo modello FC per testare l'efficacia della terapia fagica contro il biofilm di Pa, una delle questioni irrisolte in fibrosi cistica. L'argomento è di assoluta importanza per la comunità FC, data la difficoltà di eradicazione di questo patogeno, dovuta all'alta capacità adattativa e di crescita in biofilm. Inoltre, questo nuovo modello sarà a disposizione per lo studio di agenti antimicrobici nell'ambito dei progetti FFC Ricerca.
Developing a new respiratory 3D model as an innovative strategy to study the inflammation pathology in cystic fibrosis	 <p>Roberto Plebani (in the middle) with his collaborators, Anna Stejskalová (on the left) and Giovanni Di Bonaventura (on the right)</p>
Messa a punto di un modello 3D di tessuto respiratorio per studiare l'infiammazione in fibrosi cistica	3 <p>Roberto Plebani Department of Medical, Oral e Biotechnological Sciences, “G. d’Annunzio” University of Chieti-Pescara, Chieti, Italy (GMSG#1/2023, new)</p>
Background and rationale	<i>Aberrant inflammation and recurrent infections are landmarks of cystic fibrosis (CF) airways. Due to the low transferability of data obtained in animals, human preclinical systems for drug testing are crucial to improve the anti-inflammatory strategies. The organ-on-a-chip technology has revolutionized preclinical research. In this respect, we recently modeled the first partial CF airway-on-a-chip, composed of a CF pseudostratified bronchial epithelium and endothelial cells (ECs), to investigate inflammation and pathogen infections in CF airways. Although this model provided compelling evidence of CF airway dysfunction, a complete CF chip, including CF-ECs and a CF stroma, will reproduce more faithfully a CF respiratory unit.</i>
Hypothesis and objectives	<i>We hypothesize that modeling a complete CF human airway structure will provide an unprecedented platform for mechanistic and pharmacological studies in CF. Our objectives are: i) to model the CF airway-on-a-chip 2.0; ii) to monitor the impact of CFTTR modulation on the immune-inflammatory response in the chip, in presence or absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection.</i>
Essential methods	<i>The new chip will be populated by CF bronchial epithelial cells (HBE), CF-ECs and CF fibroblasts. We will compare pathogenetically relevant features of the CF airway-on-a-chip 2.0, including mucus accumulation and rheology by immunofluorescence, and cytokine/chemokine release by multiplex ELISA, with those of wild type chips at basal levels and after infection. We will also perfuse polymorphonuclear neutrophils (PMN) (CF or not) and monitor their activation and migration by flow cytometry and confocal microscopy, in the presence or absence of Kaftrio and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</i>
Preliminary results	<i>We successfully isolated and cultured CF-ECs in microfluidic chips. These chips displayed altered EC layer integrity and activation of PMNs upon contact with CF-ECs, confirming the role of EC dysfunction in CF inflammation.</i>
Conclusions	<i>We expect to obtain valuable information on the pathobiology of CF inflammation, and the proof of principle that the CF airway-on-a-chip 2.0 can be proposed as the first human preclinical platform for studies on CF. Data obtained with this approach will help to elucidate pathogenetic mechanisms and due to their high translatability will improve drug monitoring and discovery rate for the benefit of people with CF.</i>
Razionale dello studio	Infiammazione eccessiva e infezioni ricorrenti caratterizzano le vie aeree in fibrosi cistica (FC). A causa della scarsa traslazione dei dati ottenuti negli animali, i modelli preclinici umani sono fondamentali per testare farmaci e migliorare le strategie antinfiammatorie. La tecnologia dell' <i>organ-on-a-chip</i> ha rivoluzionato la ricerca preclinica. Abbiamo recentemente sviluppato il primo chip bronchiale parzialmente FC, composto da un epitelio bronchiale pseudostratificato FC e cellule endoteliali (CE), per studiare l'infiammazione e le infezioni delle vie aeree FC. Sebbene questo modello abbia confermato la disfunzione delle vie aeree in FC, un chip totalmente FC, compresi CE e stroma FC, potrebbe riprodurre più fedelmente un'unità respiratoria FC..
Ipotesi e obiettivi	La riproduzione delle vie aeree umane FC fornirebbe un modello senza precedenti per studi meccanistici e farmacologici nella FC. I nostri obiettivi sono: i) costruire l' <i>airway-on-a-chip</i> FC 2.0; ii) monitorare nel nuovo chip l'impatto della modulazione di CFTTR sulla risposta immuno-infiammatoria in presenza o assenza di infezione da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

Metodi	Il nuovo chip sarà popolato da sole cellule FC, tra cui epiteliali bronchiali (HBE), CE e fibroblasti. Confronteremo le caratteristiche patologiche dei chip FC con quelle dei chip di controllo, in particolare l'accumulo di muco e la reologia mediante immunofluorescenza e il rilascio di citochine/chemochine mediante ELISA multiplex, a livelli basali e dopo l'infezione. Perforderemo neutrofili (FC o meno) e ne monitoreremo l'attivazione e la migrazione mediante citometria a flusso e microscopia confocale, in presenza o assenza di Kaftrio e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Risultati preliminari	Abbiamo isolato e coltivato con successo CE-FC in chip di microfluidica. Questi chip hanno mostrato alterazioni del monostato endoteliale e un'attivazione dei neutrofili a contatto con CE-FC, confermando il ruolo della disfunzione delle CE nell'infiammazione in FC.
Conclusioni	Ci aspettiamo di ottenere preziose informazioni sulla patobiologia dell'infiammazione in FC e una prima prova che l' <i>'airway-on-a-chip FC 2.0'</i> potrebbe essere proposto come prima piattaforma preclinica umana in FC. I dati ottenuti aiuteranno a chiarire i meccanismi patogenetici in FC e, grazie alla loro traslazione, a migliorare il monitoraggio dei farmaci e della loro efficacia a beneficio delle persone con FC.
Melanocortins to control cystic fibrosis airway inflammation Melanocortine per controllare l'infiammazione nella fibrosi cistica	 <p>Mario Romano (2nd from the right) with his collaborators</p> <p>Mario Romano Department of Medical, Oral e Biotechnological Sciences, “G. d’Annunzio” University of Chieti-Pescara, Chieti, Italy (FFC#15/2023, new)</p>
Background and rationale	<i>Despite the introduction of CFTR modulators, unresolved inflammation still represents a significant problem for people with cystic fibrosis (CF). Since current anti-inflammatory therapy is of limited efficacy, innovative strategies to combat CF inflammation are needed. In this respect, pro-resolving pharmacology is emerging. Melanocortins are peptide hormones that activate specific receptors (MC1-5), suppressing the release of proinflammatory cytokines and promoting inflammation resolution. Synthetic melanocortins with enhanced pro-resolving activity are being tested in clinical trials.</i>
Hypothesis and objectives	<i>We hypothesize that melanocortin-based therapy can offer a fresh and innovative approach to the management of CF inflammation. Main objectives of this program are: i) To use the airway on-a-chip as a CF preclinical model to test the pro-resolving, antimicrobial efficacy of synthetic melanocortins. ii) To integrate the multiple layer evidence provided by the chip to establish a new paradigm in drug testing in CF.</i>
Essential methods	<i>We will construct airway-on-a-chip modules using the Emulate device populated by CF human bronchial epithelial cells, differentiated at air liquid interface, and CF vascular lung endothelial cells. The chips will be infected or not with <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) and perfused with CF polymorphonuclear leukocytes (PMN). [Nle4,D-Phe7]-αMSH, pan Melanocortin receptor (MCR) agonist, and BMS, selective MCR1 agonist, will be delivered to the vascular channel or to the airway channel, and their impact on several parameters of infection and inflammation will be evaluated.</i>
Preliminary results	<i>Human CF macrophages, PMN and bronchial epithelial cells express MCR1,3,4,5. Endogenous (α-MSH) and synthetic (BMS-470539) melanocortins enhanced PMN apoptosis, while decreasing ROS release. BMS significantly stimulated efferocytosis by CF macrophages and potently inhibited the release of IL-8 and CCL2. Both α-MSH and BMS stimulated bacterial phagocytosis by CF PMN and macrophages. These results establish that melanocortins inhibit pro-inflammatory pathways, while potentiating pro-resolving mechanisms in human CF cells.</i>
Conclusions	<i>We expect to collect preclinical evidence of melanocortin pro-resolving, antimicrobial efficacy on CF airways as a first step of the introduction of these molecules in the therapeutic lineup to contrast CF lung inflammation and infection. We will also expect to develop innovative preclinical tools.</i>
Razionale dello studio	Nonostante l'introduzione dei modulatori CFTR, l'infiammazione irrisolta rappresenta ancora un problema significativo per le persone affette da fibrosi cistica (FC). Poiché l'attuale terapia antinfiammatoria ha un'efficacia limitata, sono necessarie strategie innovative per combattere l'infiammazione della FC. A questo proposito sta emergendo la farmacologia pro-risoluzione. Le melanocortine sono ormoni peptidici che attivano recettori specifici (MC1-5), sopprimendo il rilascio di citochine proinfiammatorie e promuovendo la risoluzione dell'infiammazione. Melanocortine sintetiche con potente attività pro-risoluzione sono in fase di sperimentazione in studi clinici.
Ipotesi e obiettivi	Ipotizziamo che la terapia a base di melanocortine possa offrire un approccio innovativo alla gestione dell'infiammazione della FC. Gli obiettivi principali di questo progetto sono: i) usare un dispositivo (chip) che riproduce la struttura delle vie aeree come modello preclinico di FC per verificare l'efficacia antimicrobica pro-risoluzione di melanocortine sintetiche; ii) integrare le molteplici evidenze fornite dal chip per stabilire un nuovo paradigma di sperimentazione farmacologica nella FC.

Metodi	Costruiremo dispositivi <i>airway-on-a-chip</i> usando il dispositivo Emulate popolato da cellule epiteliali bronchiali umane FC, differenziate all'interfaccia aria-liquido, e cellule endoteliali polmonari vascolari FC. I chip verranno infettati o meno con <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) e perfusi con leucociti polimorfonucleati (PMN) FC. [Nle4,D-Phe7]- α MSH, agonista di tutti i recettori per le melanocortine (MCR), e BMS, agonista selettivo di MCR1, verranno somministrati dal canale vascolare o dal canale epiteliale e verrà valutato il loro impatto su diversi parametri di infezione e infiammazione.	
Risultati preliminari	Macrofagi, PMN e le cellule epiteliali bronchiali umane FC esprimono MCR1,3,4,5. Melanocortine endogene (α -MSH) e sintetiche (BMS-470539) hanno stimolato l'apoptosi dei PMN, diminuendo il rilascio di specie reattive dell'ossigeno. Il BMS ha stimolato significativamente l'efferocitosi da parte dei macrofagi CF e ha inibito potentemente il rilascio di IL-8 e CCL2. Sia α -MSH che BMS hanno stimolato la fagocitosi batterica da parte di PMN e macrofagi FC. Nel complesso questi risultati dimostrano che le melanocortine inibiscono meccanismi infiammatori, potenziando quelli pro-risoluzione in cellule umane FC.	
Conclusioni	Ci aspettiamo di raccogliere evidenze precliniche sull'efficacia antimicrobica e pro-risolutiva delle melanocortine sulle vie aeree FC come primo passo verso l'introduzione di queste molecole nell'armamentario terapeutico per contrastare l'infiammazione e l'infezione polmonare nella FC. Ci aspettiamo anche di sviluppare strumenti preclinici innovativi.	
Towards the development of GY-971a as anti-inflammatory drug in cystic fibrosis	Verso lo sviluppo di GY971a come farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica	 <p>Ilaria Lampronti (2nd from the left) with her collaborators</p> <p>Ilaria Lampronti Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy (FFC#10/2022, ongoing)</p> <p>5</p>
Background and rationale	<i>Starting from different new TMA (4,6, 4'-Trimethylangelicin) synthetic derivatives, we were able to identify GY971a, a molecule with interesting biological activity that will be developed as a possible anti-inflammatory drug for cystic fibrosis (CF).</i>	
Hypothesis and objectives	<i>Our proposal is aimed to progress toward the validation of GY971a, as a potential anti-inflammatory agent, by the evaluation of its activity in human differentiated bronchial epithelia (HBE) obtained in collaboration with the FFC Ricerca Servizio Coltura Primarie, and in murine models of CF and chronic inflammation (treatments and analysis in collaboration with the FFC Ricerca CFaCore).</i>	
Essential methods	<i>The studies on the synthesized GY971a (a) are being conducted ex vivo (b) and in vivo (c). a) Innovative synthetic strategies were used to obtain a large amount of GY-971a. b) Primary HBE cells were firstly used to set up the method and test different approaches, then HBE cells derived from several CF patients were used to study the anti-inflammatory activity of GY-971a. c) Murine model of <i>P. aeruginosa</i> chronic airway infection and CF mice will be used to test the efficacy of GY-971a with different treatment schedules (early or late after infection), after having set the appropriate conditions for administration via aerosol.</i>	
Preliminary results	<i>It was demonstrated that GY971a decreases the IL-8 gene expression in CF bronchial cell lines and without pro-apoptotic, mutagenic and phototoxic effects, facilitating our decision to test its efficacy in vivo, using a mouse model of acute <i>P. aeruginosa</i> lung infection. The anti-inflammatory effect of GY971a was confirmed in vivo: this derivative was able to deeply decrease total inflammatory cells, including neutrophils and macrophages and to modulate the expression of cytokines/chemokines involved in inflammation. We are now testing GY971a in HBE cells derived from CF patients. The first obtained results are encouraging: GY971a is able to decrease the expression of IL-8, IL-6, IL-1β and TNF-α also in ex-vivo experiments.</i>	
Conclusions	<i>The results obtained during the first year of the project confirm that GY971a has an anti-inflammatory activity also in HBE primary cells derived from different CF patients, without interfering with the action of the new modulatory drugs (Kaftrio).</i>	
Razionale dello studio	Partendo dalla progettazione di nuovi analoghi sintetici della TMA (4,6,4'-Trimetilangelicina), siamo riusciti ad identificare GY971a, una molecola con interessante attività biologica che stiamo studiando e sviluppando come potenziale agente antinfiammatorio per la fibrosi cistica (FC).	
Ipotesi e obiettivi	Il nostro obiettivo consiste nel validare il nuovo derivato GY971a come agente antinfiammatorio, studiando la sua attività su colture primarie di cellule bronco-epiteliali umane (HBE) derivate da persone con FC, ottenute grazie alla collaborazione con il Servizio Coltura Primarie di FFC Ricerca, e in modelli di topo FC e di infiammazione cronica grazie alla collaborazione con il CFaCore di FFC Ricerca.	

Metodi Gli studi su GY971a sintetizzato ex-novo (a) sono condotti mettendo a punto esperimenti *ex vivo* (b) e *in vivo* (c).

a) Il derivato GY-971a è stato sintetizzato sfruttando metodi chimici innovativi. b) Cellule HBE derivate da persone con FC e sottoposte a trapianto polmonare sono state usate per settare il modello di infiammazione e iniziare lo studio di GY971a

c) Per testare l'efficacia di GY971a sarà in futuro usato anche un modello murino di infezione cronica da *P. aeruginosa* delle vie aeree e topi FC.

Risultati preliminari Il derivato GY971a ha dimostrato di essere in grado di diminuire l'espressione del gene IL-8 in linee cellulari fibroscistiche, senza determinare effetti pro-apoptotici, mutageni e fototossici, ed è risultato efficace anche *in vivo*, in un modello murino di infezione polmonare acuta. Questo derivato, infatti, è stato in grado di ridurre in modo rilevante il numero di cellule infiammatorie totali, tra cui neutrofili e macrofagi, e di modulare l'espressione di citochine/chemochine coinvolte nell'infiammazione. Stiamo oggi valutando la molecola su cellule HBE derivate da persone con FC. I primi risultati ottenuti sono incoraggianti: GY971a è in grado di diminuire l'espressione genica di IL-8, IL-6, IL-1 β e TNF- α anche in esperimenti *ex vivo*.

Conclusioni I risultati ottenuti durante il primo anno del progetto confermano l'interesse per GY971a, che dimostra attività antinfiammatoria anche in colture primarie HBE ottenute da alcune persone con FC, senza interferire con l'attività dei nuovi farmaci modulatori (Kaftrio).

SESSION 2

Treatments for Nontuberculous Mycobacteria

Nontuberculous Mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *Mycobacterium abscessus* iron acquisition pathways

Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica



Picture top left: Laurent Robert Chiarelli (2nd from the left) with his collaborators. Picture top right: Sonia Covaceuszach (2nd from the left) with her collaborators. In the picture below, Fiorella Meneghetti (in the middle) and collaborators.

6

Matteo Mori², Giovanni Stelitano¹, Matteo Tomaiuolo³, Alberto Tresoldi², Mario Cocorullo¹, Giuseppe Mangiatordi³, Alberto Cassetta³, Marina Camera², Stefania Villa², Sonia Covaceuszach³, Fiorella Meneghetti², Laurent Robert Chiarelli¹

¹ Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Italy - ² Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Italy -

³ Institute of Crystallography, CNR, Trieste, Italy
,"(FFC#5/2022, ongoing)

Background and rationale

The resistance of the most relevant Nontuberculous Mycobacterium (NTM) *M. abscessus* (*Mab*) against conventional therapies is globally rising, especially among cystic fibrosis patients. Thus, new strategies are urgently needed. Iron acquisition is an interesting target, critical for pathogen growth and virulence. To get this essential cofactor, Mycobacteria produce siderophores that are iron chelators and whose biosynthesis was widely investigated in *M. tuberculosis* (*Mtb*), leading to inhibitors with bacteriostatic activity.

The aim of the project is the identification of new compounds targeting iron uptake in *Mab*. To this purpose we focus on the first enzyme in the siderophore biosynthetic pathway, the salicylate synthase *SaS*.

To identify new *Mab-SaS* inhibitors, we used a combined fragment-based and ligand-based drug design approach. Considering the high homology between Mycobacterial *SaS*, we used a model based on *Mtb-SaS* to perform a virtual screening (VS). In parallel, *Mab-SaS* was crystallized, and the structure solved. This new structure was used to refine our model. For all compounds identified as potential ligands, the activity and affinity were determined through biochemical and biophysical methods.

Preliminary results

Using the homology model built on *Mtb-SaS*, we performed a VS of a library of phenyl-furan compounds active against *Mtb*. The best compounds were assayed against *Mab-SaS*, identifying three inhibitors with IC₅₀ and KD in the low μ M range. In parallel, we solved for the first time the crystal structure of *Mab-SaS*, that allowed to refine the VS affording a further lead, 5-(3-sulfamoylphenyl)furan-2-carboxylate, showing high potency (IC₅₀ of 2.3 μ M).

Conclusions

The validity of the phenylfuran-carboxylate scaffold for the development of new potent *Mab-SaS* inhibitors was confirmed, identifying new leads that will be optimized. Moreover, the availability of the *Mab-SaS* structure allowed to refine the *in-silico* screening, identifying further promising compounds. These compounds will be co-crystallised with *Mab-SaS*, to better understand their binding mode. Moreover *Mab-SaS* structure will be used for further VS to identify novel scaffolds. Finally, the inhibitors identified, as well as all the molecules that will be found, will be tested for their antiMycobacterial activity and toxicity..

Razionale dello studio	Tra i micobatteri non tubercolari, <i>M. abscessus</i> (Mab) sta emergendo in modo preoccupante, soprattutto tra le persone con fibrosi cistica, a causa della diffusione di ceppi resistenti ai farmaci. È pertanto urgente individuare nuove strategie antibatteriche. L'approvvigionamento del ferro è un bersaglio interessante perché fondamentale per la crescita e la virulenza dei patogeni. Per ottenere questo cofattore, i micobatteri producono siderofori in grado di chelarla, la cui biosintesi è stata ampiamente studiata in <i>M. tuberculosis</i> (MtB), portando allo sviluppo di inibitori.
Ipotesi e obiettivi	L'obiettivo del progetto è l'identificazione di nuovi inibitori dell'assorbimento del ferro in Mab. A tale scopo ci siamo focalizzati sul primo enzima della biosintesi dei siderofori, salicilato sintasi (SaS), precedentemente studiato con successo per identificare agenti antitubercolari.
Metodi	Per individuare nuovi inibitori di Mab-SaS, abbiamo impiegato un approccio combinato di progettazione di farmaci basati su frammenti e su ligandi. In primo luogo, data l'elevata omologia tra le SaS micobatteriche, abbiamo eseguito uno screening virtuale (VS), usando un modello basato su MtB-SaS. In parallelo, Mab-SaS è stato cristallizzato e la struttura risolta. Quest'ultima è stata usata per perfezionare lo screening. Per tutti i potenziali ligandi, l'attività e l'affinità sono state determinate con metodi biochimici e biofisici.
Risultati preliminari	Usando il modello di omologia costruito su MtB-SaS, abbiamo eseguito un VS di una libreria di composti fenil-furanici. I migliori composti sono stati saggiati contro Mab-SaS e sono stati trovati tre inibitori con valori di IC ₅₀ e KD nel range del basso μM. Parallelamente, abbiamo risolto la struttura cristallina di Mab-SaS, potendo raffinare il VS, e abbiamo identificato un ulteriore lead, con una IC ₅₀ di 2,3 μM.
Conclusioni	È stata confermata la validità dello scaffold fenil-furanico per lo sviluppo di inibitori di Mab-SaS. Inoltre, la disponibilità della struttura cristallografica ha permesso di affinare lo screening in-silico, e di identificare ulteriori composti promettenti, che saranno co-cristallizzati con Mab-SaS, per comprendere meglio la loro modalità di legame. Inoltre, la struttura di Mab-SaS sarà usata in ulteriori VS per identificare nuovi scaffold. Infine, gli inibitori identificati, così come tutte le molecole selezionate, verranno testati per l'attività antimicobatterica e la tossicità.

Search for drug combinations killing *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis

Ricerca di combinazioni di farmaci capaci di eliminare *Mycobacterium abscessus* nella fibrosi cistica



Federico Giannoni (on the left)
with his collaborators.

7

Alessio Lanni, Angelo Iacobino, Federico Giannoni

Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità,
Rome, Italy
(FFC#6/2022, concluded)

Background and rationale

Mycobacterium abscessus (Mab) causes chronic pulmonary infections in people with cystic fibrosis (CF). In vitro, combinations with 5 drugs are necessary to sterilize Mab cultures. Different forms of Mab are observed: actively replicating (AR) bacteria, subpopulations of drug tolerant persister cells (PC), and, in condition of oxygen depletion found in biofilm, a dormant, drug resistant, nonreplicating (NR) phenotype.

Beta-lactams have potential interest for treatment of Mab infections. Our objectives were: i) to study drug combinations on AR and NR cultures containing the core bedaquiline-amikacin (BA) plus a third drug, and ii) to understand the biology of PC subpopulations by testing drugs and studying patterns of gene expression.

We cultured Mab ATCC 19977 under aerobic and hypoxic conditions and treated with drugs and drug combinations. Moreover, we extracted total RNA from AR, NR and PC Mab for qRT-PCR and RNAseq.

We characterized MIC and growth curves in AR and NR conditions of Mab. AR Mab is highly susceptible to BA combination. Under hypoxia, a natural mortality rate is increased by BA. We tested 6 drugs alone or in combination with BA: tetracyclines omadacycline and eravacycline, tedizolid, an oxazolidinone similar to linezolid, and beta-lactams imipenem, doripenem and cefoxitin. All drugs were active against AR Mab, and beta-lactams significantly boosted BA killing activity. No effect was observed in NR Mab. Concerning studies on PC, we tested the addition of a third drug after 8 days of incubation with BA, observing an increased killing by rifabutin and nimorazole compared to simultaneous addition with BA. qRT-PCR experiments on BA treated Mab showed a strong activation of dormancy related genes, *hsp20*, *sigE*, and toxins-antitoxins, *hicB*, *vapB* and *MAB_3113*, suggesting that aerobic PC subpopulations display a NR phenotype. Finally, we have set-up the optimal conditions for an RNAseq study of PC, currently underway.

Hypothesis and objectives

Essential methods

Results

Conclusions

The use of drug combinations remains the only feasible approach to Mab infections. Mab is susceptible to drugs, but the presence of dormant cells and PC, all encountered in CF patients, causes treatment failures. Studying differences between dormant and persisters, identifying the key genes and factors that regulate and induce these forms, and drugs specifically targeting them will have an impact on clinical protocols.

Razionale dello studio

Mycobacterium abscessus (Mab) causa infezioni polmonari croniche in persone con fibrosi cistica (FC). In vitro, è necessaria una combinazione di 5 farmaci per sterilizzare le colture di Mab. Si osservano diverse forme di Mab: batteri che si replicano attivamente (AR), sottopopolazioni di cellule persistenti (PC) farmaco-tolleranti e, in condizioni di deplezione di ossigeno, un fenotipo dormiente, non replicativo (NR), farmaco-resistente.

Ipotesi e obiettivi

Gli antibiotici beta-lattamici sono di interesse per il trattamento delle infezioni da Mab. Gli obiettivi del progetto erano: testare combinazioni di farmaci su colture AR e NR contenenti il bedaquilina-amikacina (BA) più un terzo farmaco e studiare l'espressione genica e i farmaci attivi su PC.

Metodi

Abbiamo coltivato Mab ATCC 19977 in aerobiosi e ipossia e trattato con farmaci, ed estratto l'RNA totale da AR, NR e PC Mab per qRT-PCR e RNAseq.

Risultati

Abbiamo definito MIC e curve di crescita in condizioni AR e NR di Mab. AR Mab è altamente sensibile alla combinazione BA. In ipossia, il tasso di mortalità naturale è aumentato con BA. Abbiamo testato 6 farmaci da soli o in combinazione con BA: le tetracicline omadaciclina ed eravaciclina, il tedizolid, un ossazolidinone simile al linezolid e i beta-lattamici imipenem, doripenem e cefoxitina. Tutti i farmaci sono attivi contro AR Mab e i beta-lattamici hanno aumentato significativamente la mortalità di BA. Nessun effetto è stato osservato in NR Mab. Riguardo le PC, abbiamo testato l'aggiunta di un terzo farmaco dopo 8 giorni di incubazione con BA, osservando un aumento della mortalità da parte di rifabutina e nimorazolo rispetto alla loro aggiunta insieme a BA. qRT-PCR su Mab trattato con BA hanno mostrato una forte attivazione di geni correlati alla dormienza, hsp20, sigE e tossine-antitossine, hicB, vapB e MAB_3113, suggerendo che le sottopopolazioni di PC aerobiche mostrano un fenotipo NR. Infine, abbiamo messo a punto le condizioni per l'RNAseq dei PC, attualmente in corso.

Conclusioni

L'uso di combinazioni di farmaci resta l'unico approccio alle infezioni da Mab. La presenza di cellule dormienti e PC, anche *in vivo* nelle persone con fibrosi cistica, causa fallimenti terapeutici. Lo studio delle differenze tra NR e PC, l'identificazione dei geni chiave e dei fattori che regolano e inducono queste forme e i farmaci attivi su di esse avranno un impatto sui protocolli clinici.

Evaluation of the efficacy of the "VOMG" new antibiotic against *Mycobacterium abscessus*

Valutazione dell'efficacia del nuovo antibiotico "VOMG" contro *Mycobacterium abscessus*



From the left: Maria Rosalia Pasca,
Riccardo Manganelli, Fabio Saliu

8

Maria Rosalia Pasca¹, Riccardo Manganelli², Fabio Saliu³

¹ Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Italy - ² Department of Molecular Medicine, University of Padua, Italy - ³ Infection and Cystic Fibrosis Unit San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy (FFC#9/2023, new)

Background and rationale

Nontuberculous Mycobacteria (NTM) are important pathogens, which are responsible for a wide spectrum of clinical manifestations. The incidence of pulmonary disease caused by *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC) members is dramatically increasing especially among people with cystic fibrosis worldwide, with *M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*) becoming the most worrisome. *M. abscessus* infections are characterized by the formation of granulomas. These are organized structure of macrophages, epithelioid cells and multinucleated giant cells, surrounded by a ring of lymphocytes. Their function is to localize and contain *Mycobacteria* while concentrating the immune response to a limited area. During the life in the granulomas, bacteria are hypothesized to become more tolerant to different stress, including that due to drugs. *M. abscessus* treatment is a combinational and highly toxic therapy up to 2 years long. Treatment failure is associated to unfavourable progression and to an accelerated lung function decline. Consequently, new active and less toxic drugs are urgently needed. Out of more than 700 compounds ad hoc synthetized, we found that VOMG was the only hit molecule active against *M. abscessus* in vitro, *M. abscessus* biofilm and *in vivo* with a high bactericidal activity. We recently discovered that it targets cell division, by inhibiting the *FtsZ* protein. VOMG has been patented with the co-ownership of FFC Ricerca thanks to the potential of its activity *in vitro*, *in vivo* and against biofilm.

Hypothesis and objectives

Our results show that VOMG has features to be a drug candidate against *M. abscessus* with the potential to be included in regimens to treat *M. abscessus* lung disease. In this project, we aim at: i) to study the mechanism of action of VOMG in depth; ii) to evaluate the activity of VOMG alone and in combination with amikacin in *M. abscessus* infected mice using different methods; iii) to study the activity of VOMG alone or in combination with amikacin in a granuloma-like structure model induced by *M. abscessus* infection.

Essential methods

Preliminary results

Conclusions

We will use microbiological methods to reach the aims of the Project.

We are setting up the granuloma like structures assay in *M. abscessus*.

Our findings will pave the way for the development of new potential therapeutic and antimicrobial treatments against *M. abscessus* infections in particular for people with cystic fibrosis.

Razionale dello studio

I Micobatteri Non Tuberculari (MNT) sono importanti patogeni, responsabili di un ampio spettro di manifestazioni cliniche. L'incidenza della malattia polmonare causata dai membri del *Mycobacterium abscessus* complex (MABC) è in drammatico aumento soprattutto tra le persone con fibrosi cistica in tutto il mondo, con *M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus*) che diventa il più preoccupante. Le infezioni da *M. abscessus* sono caratterizzate dalla formazione di granulomi, strutture organizzate di macrofagi, cellule epiteliodi e cellule giganti multinucleate, circondate da un anello di linfociti. La loro funzione è quella di contenere i micobatteri, concentrando la risposta immunitaria in un'area limitata. Durante la vita nei granulomi, si ipotizza che i batteri diventino più tolleranti a diversi stress, compresi quelli dovuti ai farmaci. Il trattamento di *M. abscessus* consiste in una terapia combinata altamente tossica che dura fino a 2 anni; il suo fallimento è associato a un declino accelerato della funzione polmonare. Di conseguenza, sono urgentemente necessari nuovi farmaci attivi e meno tossici. Fra oltre 700 composti sintetizzati ad hoc, VOMG è stata l'unica molecola che abbiamo trovato essere attiva contro *M. abscessus* *in vitro*, il biofilm di *M. abscessus* e *in vivo*.

Ipotesi e obiettivi

Recentemente abbiamo scoperto che VOMG ha come bersaglio la divisione cellulare, inibendo la FtsZ. VOMG è stato brevettato con la comproprietà di FFC Ricerca e ha le caratteristiche per essere un candidato farmaco contro *M. abscessus*. In questo progetto, ci proponiamo di: i) studiare a fondo il meccanismo d'azione di VOMG; ii) valutare l'attività di VOMG da solo e in combinazione con l'amikacina in topi infettati da *M. abscessus* usando diversi metodi; iii) studiare l'attività di VOMG da solo o in combinazione con l'amikacina in un modello di struttura simile al granuloma indotto dall'infezione da *M. abscessus*.

Metodi

Verranno usati metodi microbiologici per raggiungere gli scopi del progetto.

Risultati preliminari

Stiamo mettendo a punto il saggio per la formazione *in vitro* dei granulomi in *M. abscessus*.

Conclusioni

I nostri risultati apriranno la strada allo sviluppo di nuovi potenziali trattamenti terapeutici e antimicrobici contro le infezioni da *M. abscessus*, in particolare per le persone con fibrosi cistica.

Fighting *Mycobacterium abscessus* infections by a novel combination therapy

Una nuova strategia terapeutica combinata per il trattamento di infezioni da *Mycobacterium abscessus*



Maurizio Fraziano (on the right) and his collaborators

9

Noemi Poerio¹, Tommaso Olimpieri¹, Nicolai Lorè², Fabiana Ciciriello³, Greta Ponsecchi¹, Marco Maria D'Andrea¹, Federico Alghisi³, Daniela Cirillo², Maurizio Fraziano¹

¹ Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy -

² Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ³ Fibrosis Unit, Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy

(FFC#13/2022, ongoing)

Background and rationale

We have generated apoptotic body-like liposomes (ABL) carrying bioactive lipids that enhance antimicrobial response of macrophages irrespective of pathogen's antibiotic resistance. Impaired macrophage functions in cystic fibrosis (CF) patients have a crucial role in the defective bacterial clearance, which persist despite the therapeutic use of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator channel (CFTR) modulators, such as Kaftrio.

Hypothesis and objectives

The main aim of this project is to ameliorate the beneficial effects of Kaftrio, that might be hindered by chronic *Mycobacterium abscessus* (Mab) colonization, by a therapeutic strategy based on ABL/Kaftrio and antibiotics, as a combined host and pathogen-directed approach, which may simultaneously target intracellular and extracellular pathogens and defective CFTR.

Essential methods

Primary macrophages derived by people with CF, undergoing Kaftrio regimen or not, were *in vitro* infected with Mab, and stimulated with ABL loaded with phosphatidyl5-phosphate (PI5P) or phosphatidylserine (PS) and/or Kaftrio. Efficacy of treatments was evaluated in terms of intracellular Mycobacterial killing.

Preliminary results

Our preliminary results show that only ABL/PI5P treatment is able to improve Mab intracellular killing in macrophages of CF patients without any modulator/corrector therapeutic regimen. Furthermore, the combined treatment with ABL/PI5P or ABL/PS and Kaftrio *in vitro* improves the intracellular killing of Mab in macrophages of CF patients under Kaftrio therapeutic regimen, also resulting significantly more efficient than treatment with liposomes alone.

Conclusions

The goal of this project is the generation of a novel host- and pathogen- directed therapeutic approach to be used in association with CFTR modulators, to enhance Mab clearance in people with CF by simultaneously limiting pathogenic inflammatory response. Thus, this project aims at generating a novel combination therapy consisting of Kaftrio, selected ABLs and antibiotics for the control of pulmonary drug resistant Mycobacterial infections in people with CF.

Razionale dello studio

Abbiamo sviluppato liposomi simili a corpi apoptotici (ABL) caricati con lipidi bioattivi che sono in grado di migliorare l'uccisione intracellulare limitando la risposta infiammatoria nei confronti di batteri multiresistenti (MDR). Inoltre, il difetto nella capacità di "clearance" batterica, osservato nelle persone con fibrosi cistica (FC), persiste nonostante l'uso di modulatori del regolatore della conduttanza transmembrana della FC (CFTR).

Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo principale di questo progetto è migliorare gli effetti benefici di Kaftrio, che potrebbero essere ostacolati dalle infezioni batteriche croniche causate da *Mycobacterium abscessus* (Mab), attraverso una strategia terapeutica basata su liposomi bioattivi/Kaftrio e antibiotici, come approccio combinato diretto sia all'ospite e che al patogeno.

Metodi

I macrofagi primari derivati da persone con FC, sottoposti o meno al trattamento con Kaftrio, sono stati infettati *in vitro* con Mab e infine sono stati stimolati con ABL caricato con fosfatidil5-fosfato (PI5P) o fosfatidilserina (PS) e/o Kaftrio. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata in termini di uccisione dei micobatteri intracellulari.

Risultati preliminari

Solo il trattamento ABL/PI5P è in grado di migliorare l'uccisione intracellulare di Mab nei macrofagi di persone con FC non sottoposte a terapia. Invece, il trattamento combinato *in vitro* ABL/PI5P o ABL/PS e Kaftrio migliora l'uccisione intracellulare di Mab nei macrofagi delle persone con FC e sottoposte al regime terapeutico con Kaftrio, risultando inoltre significativamente più efficiente rispetto al trattamento con i singoli liposomi.

Conclusioni

L'obiettivo di questo progetto è la generazione di un approccio terapeutico diretto sia all'ospite che al patogeno, che possa essere usato in associazione con Kaftrio per una migliore risoluzione delle infezioni polmonari croniche nelle persone con FC, limitando al tempo stesso la risposta infiammatoria. Pertanto, questo progetto mira a generare una nuova terapia combinata composta da Kaftrio, liposomi bioattivi e antibiotici per il controllo delle infezioni polmonari micobatteriche resistenti ai farmaci nelle persone con FC.

SESSION 3

New CFTR modulators

Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del-CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis

Ottimizzazione di analoghi di MKT-077 come inibitori allosterici di Hsp70 combinati con correttori CFTR F508del: un approccio multi-farmaco per contrastare la fibrosi cistica



Enrico Millo (in the middle) and his collaborators

10

Irene Garrone¹, Alice Parodi¹, Dario Lunaccio¹, Emanuela Pesce², Roberto Sabbadini³, Cecilia Astigiano¹, Erfan Asgari¹, Bruno Tasso³, Bujar Caushi¹, Laura Sturla¹, Santina Bruzzone¹, Elena Cichero³, Enrico Millo¹

¹ Department of Experimental Medicine (DIMES), Section of Biochemistry, University of Genoa, Italy - ² UOC Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ³ Department of Pharmacy, Section of Medicinal Chemistry, University of Genoa, Italy

(FFC#9/2021, concluded)

Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is one of the most frequent lethal autosomal recessive diseases. It is caused by loss of function variants of the CFTR, a membrane protein located on the epithelial cells. Combinations of molecules interacting with other proteins involved in CFTR channel functionality are expected to largely rescue F508del-CFTR activity. The design of compounds targeting the molecular chaperone Hsp70 has been proposed as a strategy to identify drug combinations for the treatment of cystic fibrosis. Hsp70 inhibitors may represent compounds for the development of optimized multi-drugs to contrast CF.

Hypothesis and objectives

Combinations of correctors with modulators interacting with molecular chaperones highly related to the CFTR folding and degradation processes, are expected to maximize the therapeutic effect of correctors. The main aim of our project is the rational design of novel Hsp70 inhibitors with the final goal of identifying new combinations of drugs with improved drug-like properties.

Essential methods

Based on molecular modeling studies new series of molecules belonging to different chemical classes have been designed, ranked through *in silico* screenings and synthesized. The most promising compounds have been evaluated in functional assays on CFBE41o cells expressing F508del-CFTR, in the presence of available CFTR correctors. Next, the mechanism of action as Hsp70 inhibitors of the most effective derivatives has been explored using the human recombinant Hsp70 protein and measuring its ATPase activity.

Results

During the project, several libraries of compounds were constructed and evaluated their effects on cells in combination with different correctors. Some of these displayed an increase in efflux by iodide efflux assays when administered with CFTR corrector VX8-09 and its analogues. The same molecules were tested by biochemical assays and shown to have an inhibitory effect on the ATPase activity of Hsp70. Our data allow us to consider our compounds as prototypes able to target the Hsp70 protein. Analyses on primary bronchial cells to evaluate their efficacy are in progress.

Conclusions

Several studies have demonstrated that combinations of drugs with different mechanisms of action are needed to pave the way for more effective therapies. We propose the development of effective Hsp70 inhibitors to be used in combination with correctors. These results will be important for the development of new CF therapies.

Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica causata da mutazioni che compromettono la funzione di CFTR, una proteina necessaria per il trasporto dello ione cloruro nelle cellule epiteliali. L'uso di farmaci modulatori con diversi meccanismi d'azione è risultato efficace nel recupero della funzione di CFTR, come dimostrato da saggi su combinazioni tra correttori e inibitori allosterici della proteina Hsp70 (*Heat shock protein 70*).

Ipotesi e obiettivi

Studi recenti suggeriscono che il recupero efficace della funzionalità del canale CFTR può essere raggiunto con correttori somministrati in presenza d'inibitori allosterici di Hsp70 quali MKT-077. L'obiettivo del nostro progetto è l'identificazione di nuovi inibitori Hsp70 da usare sulla proteina mutata in combinazione con i correttori classici.

Metodi

Sfruttando approcci di modellistica molecolare e di chimica farmaceutica sulla proteina Hsp70, sono state disegnate nuove serie di molecole appartenenti a differenti classi chimiche. Tra queste, le più promettenti *in silico* sono state sintetizzate e testate per valutarne l'efficacia in presenza del correttore VX-809 e di suoi analoghi. Il meccanismo di azione come inibitori di Hsp70 è stato confermato mediante opportuni saggi biochimici.

Risultati

Sono state costruite svariate librerie di composti e misurato il loro effetto cellulare in combinazione con diversi correttori. Alcuni di questi, somministrati con VX-809 e suoi analoghi, hanno mostrato un incremento della funzionalità del canale CFTR mediante saggi di efflusso di ioduro. Tali dati ci permettono di considerare alcuni di essi come derivati in grado di mimarne l'azione interagendo con Hsp70, e quindi precursori da ottimizzare. Sono in corso analisi su cellule primarie bronchiali per valutarne l'efficacia.

Conclusioni

Diversi studi hanno dimostrato come CFTR rappresenti un potenziale bersaglio farmacologico per contrastare la FC. Tuttavia, un approccio combinato e mirato a usare molecole con differenti meccanismi di azione su vari bersagli molecolari è ritenuto fondamentale nella ricerca di trattamenti terapeutici. Abbiamo identificato inibitori di Hsp70 da associare a correttori tradizionali. Questi risultati saranno importanti per lo sviluppo di nuove terapie per correggere il difetto di base nelle persone con FC.

Characterization of CFTR modulators mechanism of action via Photo-Affinity Labeling (PAL) approach

Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione



Clockwise: Francesco Saccoliti, Elisa Romeo, Fabio Bertozzi, Angela Andonaia, Federico Falchi, Onofrio Laselva, Andrea Armirotti

11

Fabio Bertozzi¹, Francesco Saccoliti¹, Angela Andonaia, Elisa Romeo²

¹ D3-PharmaChemistry, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova

² Structural Biophysics and Translational Pharmacology, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova.

(FFC#2/2022 concluded)

Background and rationale

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease characterized by an impairment in the synthesis or function of CF transmembrane conductance regulator (CFTR) anion channel, caused by mutations in CFTR gene. In the framework of the Task Force for Cystic Fibrosis project, our group discovered ARN23765, a CFTR corrector with a sub-nanomolar potency in rescuing the function of mutant CFTR in human bronchial epithelial cells from F508del/F508del CF patients. Despite the validated pharmacological effects, the mechanism of action and the binding site of ARN23765 have not yet been conclusively defined.

Hypothesis and objectives

The aim of our project is primarily to uncover the mechanism of action of ARN23765 by Photo-Affinity Labeling (PAL) studies in live cells. Furthermore, the binding site of ARN23765 on CFTR will be also investigated, contributing to further characterize this corrector and strengthen its profile as pre-clinical development candidate for the treatment of CF.

Essential methods

The mechanism of action of ARN23765 in living cells is explored by means of PAL studies using chemical probes structurally related to the corrector. Functional studies using CFTR domains are exploited to identify the protein regions involved in ARN23765-induced correction. Computational docking and molecular dynamic analyses along with mutagenesis experiments are also inquired to elucidate the molecular bases of ARN23765 interaction with CFTR.

Results

Taking advantage of the PAL methodology, we demonstrated the *in situ* interaction of ARN23765 with CFTR in wt- and F508del-CFTR overexpressing CFBE41o- cells. Additionally, functional studies using CFTR domains identified the interface between MSD1-NBD1 as the protein region involved in ARN23765-induced correction. The putative binding site of ARN23765 on CFTR was elucidated by a combination of computational analyses and site-directed mutagenesis studies, which identified the primary aminoacid residues involved in the effective interaction of the corrector with CFTR.

Conclusions

The results of this project contribute to elucidate the molecular bases of CFTR rescuing induced by ARN23765. Our data show that in an intact biological setting, such as CFBE41o- cells, the corrector binds directly to CFTR and stabilizes the interface between MSD1-NBD1 protein region through the interaction with specific aminoacids..

Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica rara caratterizzata da un'alterazione della sintesi o della funzione della proteina CFTR, causate da mutazioni nel gene che la codifica. Nell'ambito del progetto *Task Force for Cystic Fibrosis*, il nostro gruppo ha scoperto ARN23765, un correttore CFTR con un'elevata potenza nel recuperare la funzione della proteina mutata in cellule epiteliali bronchiali da persone con FC e mutazioni F508del/F508del. Nonostante i dimostrati effetti biologici, il meccanismo d'azione e il sito di legame di ARN23765 non sono stati ancora avvalorati in modo definitivo.

Ipotesi e obiettivi

Lo scopo del nostro progetto sta principalmente nell'identificare il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule integre attraverso un approccio biochimico, noto come *Photo-Affinity Labeling* (PAL). È stato studiato anche il sito di legame di ARN23765 su CFTR, al fine di caratterizzare ulteriormente questo correttore e rafforzarne il suo profilo come candidato allo sviluppo preclinico per il trattamento della FC.

Metodi

Il meccanismo d'azione di ARN23765 in cellule integre è stato studiato attraverso studi di PAL usando sonde chimiche strutturalmente correlate a esso. Inoltre, sono stati svolti studi funzionali usando domini di CFTR al fine di identificare le porzioni proteiche coinvolte nella correzione indotta da ARN23765. Analisi computazionali insieme a esperimenti di mutagenesi sono stati condotti per chiarire le basi molecolari dell'interazione di ARN23765 con CFTR.

Risultati preliminari

Sfruttando la metodologia PAL, abbiamo dimostrato l'interazione di ARN23765 con CFTR in cellule CFBE41o- che sovraesprimono CFTR in forma wt- e F508del. Studi funzionali con domini di CFTR hanno identificato la regione tra MSD1-NBD1 come la porzione proteica coinvolta nella correzione indotta da ARN23765. Il presunto sito di legame di ARN23765 su CFTR è stato chiarito da una combinazione di analisi computazionali e studi di mutagenesi, che hanno identificato i residui aminoacidici coinvolti nell'interazione con il correttore.

Conclusioni

I risultati di questo progetto contribuiscono a chiarire le basi molecolari del recupero dell'attività di CFTR indotta da ARN23765. I nostri dati mostrano che in un ambiente biologico integro il correttore si lega direttamente a CFTR e stabilizza la regione proteica MSD1-NBD1 attraverso interazioni specifiche con residui aminoacidici definiti.

Esculetin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease

Derivati del peptide esculentina come nuovi agenti terapeutici con attività antimicrobica e potenziatrice di CFTR per il trattamento della patologia polmonare della fibrosi cistica



In the large image: Maria Luisa Mangoni (in the middle) and her collaborators. In the center, Arianna Venturini. On the right, Mattia Mori

12

Maria Luisa Mangoni¹, Arianna Venturini², Mattia Mori³

¹ Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Italy - ² Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - ³ Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy (FFC#4/2022, ongoing)

Background and rationale

The loss of phenylalanine 508 severely impairs CFTR trafficking to the cell surface as well as the mechanisms of channel gating. Despite the clinical efficacy of current CFTR modulators in restoring the function of defective CFTR, treatment of pulmonary infections remains highly challenging especially in patients with advanced stages of lung disease. In the last few years, we identified two antimicrobial peptides (AMPs), Esc peptides, able to stimulate repair of bronchial epithelium integrity. In addition, they reduce lung bacterial burden in C57BL/6 mice with *Pseudomonas aeruginosa* (the principal pathogen in CF lung) pulmonary infection, upon intra-tracheal instillation. Very recently we reported on an unprecedented property of AMPs, that is the ability of Esc peptides to act as potentiaters of F508del CFTR.

Hypothesis and objectives

The project aims at i) studying the effect of Esc peptides on the ion currents mediated by other CFTR mutants (including missense G551D or G1349D mutations which impair CFTR channel opening); ii) optimizing their efficacy for the dual (antimicrobial and CFTR potentiator) function and iii) evaluating the capability of the optimized peptides to preserve antibacterial activity in CF-mimicking lung environment.

Essential methods

A multidisciplinary approach combining electrophysiological, biochemical, cell biology and computational methods, as well as mouse models for in vivo studies.

Preliminary results

*We demonstrated that both Esc peptides and the isoform containing D-phosphoserine at position 17 are able to increase the CFTR-dependent transepithelial conductance in primary bronchial epithelial cells homozygous/heterozygous for F508del mutation as well as in Fisher Rat Thyroid cells expressing G551D-CFTR, with a similar effect to that of genistein and strictly dependent on the amino acids sequence of Esc peptides. Indeed, the presence of D/L glutamic acid at position 17 abolishes the CFTR potentiator effect; in contrast, the presence of the non-coded amino acid alfa-aminoisobutyric acid (AiB) at position 8 of Esc peptides expands their spectrum of activity towards Gram-positive bacteria (like *Staphylococcus aureus*) also relevant in cystic fibrosis, without altering their potentiator effect on both F508del and G551D-CFTR mutants and without making them cytotoxic towards human cells. Notably, the AiB-containing all-L Esc peptide was also found to preserve the in vivo anti-*Pseudomonas* efficacy in the lung of β -ENaC mice where the formation of a sticky and dehydrated mucus occurs, like that of people with CF.*

Conclusions

We expect to identify peptides with the ability not only to act as antibacterial drugs in CF lung environment but also to rescue the function of CFTR with gating defect. This effect may be potentiated in combination with current CFTR modulators. Overall, our studies will contribute to the development of a novel therapeutic strategy to address pulmonary pathology in CF.

Razionale dello studio

La perdita della fenilalanina 508 compromette gravemente la veicolazione di CFTR sulla superficie cellulare e altera i meccanismi di apertura del canale. Nonostante l'efficacia clinica degli attuali modulatori di CFTR nel ripristinare l'attività della proteina difettosa, il trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica (FC) resta una grande sfida, soprattutto negli stadi avanzati della malattia. Negli ultimi anni abbiamo identificato due peptidi antimicrobici (AMP), i peptidi Esc, che sono anche in grado di accelerare il recupero dell'integrità dell'epitelio bronchiale e ridurre la carica batterica in topi C57BL/6 con infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (principale patogeno nel polmone delle persone con FC), dopo instillazione intratracheale. Recentemente abbiamo scoperto una proprietà senza precedenti degli AMP, ovvero la capacità dei peptidi Esc di agire come potenziatori di F508del.

Ipotesi e obiettivi

Il progetto mira a i) studiare l'effetto dei peptidi Esc sulle correnti ioniche mediate da CFTR con altre mutazioni (incluse quelle missenso G551D o G1349D); ii) ottimizzare la loro efficacia per la doppia funzione (antimicrobica e potenziatrice di CFTR) e iii) valutare la capacità dei peptidi selezionati di preservare l'attività antibatterica in condizioni che simulano il polmone FC.

Metodi

Approccio multidisciplinare con metodi elettrofisiologici, biochimici, di biologia cellulare e computazionali, nonché l'uso di modelli di topo.

Risultati preliminari

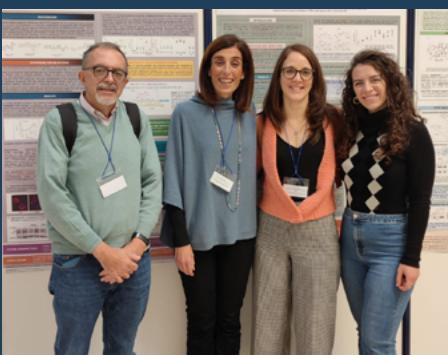
Abbiamo dimostrato che entrambi i peptidi Esc e l'isoforma contenente D-fosfoserina in posizione 17 sono in grado di aumentare la conduttanza transepiteliale dipendente da CFTR in epitelii di cellule bronchiali primarie omozigoti/eterozigoti per la mutazione F508del così come in cellule di tiroide di ratto che esprimono CFTR con mutazione G551D, con un effetto simile a quello della genisteina e strettamente dipendente dalla sequenza amminoacidica dei peptidi di Esc. Infatti la presenza dell'amminoacido D/L glutammico in posizione 17 causa la perdita dell'effetto potenziatore; diversamente, la presenza dell'amminoacido non convenzionale alfa-aminoisobutyrico (AiB) in posizione 8 dei peptidi Esc conferisce loro un più ampio spettro d'azione, anche contro batteri Gram-positivi (come lo *Staphylococcus aureus*) pure rilevanti in FC senza alterarne l'effetto potenziatore sui mutanti F508del e G551D e senza rendere i peptidi citotossici nei confronti di cellule umane. È interessante notare come il peptide contenente AiB mantenga l'efficacia anti-*Pseudomonas* *in vivo* nel polmone di topi β -ENaC dove è presente la formazione di un muco appiccicoso e disidratato, simile a quello delle persone con FC.

Conclusioni

Ci aspettiamo di identificare peptidi con la capacità non solo di agire come antibiotici nel polmone FC, ma anche di recuperare la funzione di CFTR con diversi difetti di conduttanza. Questo effetto può essere potenziato in combinazione con gli attuali modulatori CFTR. Nel complesso, i nostri studi contribuiranno allo sviluppo di una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia polmonare della FC.

**Molecules 3.0.
New generation
of pharmacological
modulators to rescue
mutant CFTR protein**

**Molecole 3.0 per la fibrosi
cistica. Nuovi modulatori
farmacologici per il
recupero della proteina
CFTR mutata**



From the left, Luis J.V. Galietta , Paola Barraja and collaborators

13

Marilia Barreca¹, Virginia Spanò¹, Maria Valeria Raimondi¹, Alessandra Montalbano¹, Paola Barraja¹, Mario Renda², Anna Borrelli², Arianna Venturini², Martina Buccirossi², Daniela Guidone², Michele Genovese², Luis J. V. Galietta²

¹ Department of Sciences and Chemical Biology and Pharmaceutical Technology (STEBICEF), University of Palermo, Italy - ² Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy (**Molecules 3.0, ongoing**)

**Background
and rationale**

Although substantial advances have been obtained in the pharmacological treatment of cystic fibrosis (CF), with the approval of Kaftrio, a combination of two correctors (VX-661, VX-445) and one potentiator (VX-770), new modulators are still needed to rescue F508del and other CFTR mutants with trafficking defects. Supported by FFC Ricerca (FFC#4/2018, FFC#3/2020, Molecole 3.0), we have identified PP compounds as correctors with high efficacy in the rescue of F508del-CFTR on native epithelial cells of CF patients, particularly in combination with class 1 correctors (VX-809, VX-661).

**Hypothesis
and objectives**

Within a library of compounds based on a tricyclic core (PP), compound PP028 was found as a lead candidate for the high rescue of F508del-CFTR and used for mechanistic insight. Extensive studies have shown that corrector activity (potency, efficacy) and medicinal chemistry (MedChem) properties of PP028 can be improved by design and functional testing of new analogues. Following this approach, PP244 emerged as a new candidate with favourable structural features and promising MedChem profile. Our future objective is to extend the chemical synthesis to generate compounds with improved features, either in terms of corrector potency/efficacy on F508del and other CFTR mutants, and of drug-likeness.

**Essential
methods**

Iterative cycles of chemical synthesis and functional testing are performed to identify compounds with improved properties. Along with chemical manipulation of PP scaffold, a scaffold hopping (SH) approach is pursued to generate new compounds based on a free rotatable structure. All compounds are functionally tested on CFBE41o- cells expressing F508del-CFTR. Selected compounds are tested on other CFTR mutants (N1303K, W1282X). Most promising compounds are validated on primary bronchial epithelial cells from CF patients.

Results

So far, 250 analogues of PP028 and 126 novel SH compounds have been synthesized and tested. The potency and efficacy of SH compounds have been progressively improved with identification of compounds active on primary bronchial epithelia. Selected PP and SH were tested in multiple assays to identify possible liabilities due to activity on other biological targets.

Conclusions

PP and SH compounds appear promising for the future development of combinatorial treatments for CF. The work on two families of compounds in parallel enhances the chance to develop candidates for preclinical and clinical development.

**Appendix Project
Molecules 3.0**

We propose to continue the process of chemical optimization of PP and SH compounds, following the pipeline that has been successfully adopted so far, to find the best compromise between corrector activity on mutant CFTR and drug-likeness. Our goal is that the multiparametric optimization on the two families of compounds PP and SH will deliver maximally optimized compounds endowed with the characteristics needed to reach preclinical and clinical studies.

**Razionale
dello studio**

Nonostante la recente approvazione di Kaftrio, una combinazione di due correttori (VX-661, VX-445) e un potenziatore (VX-770), rappresenti un grande progresso per la terapia farmacologica della fibrosi cistica (FC), è opportuno sviluppare nuovi modulatori per il recupero della proteina CFTR con F508del e altre mutazioni con difetto simile. Con il supporto di FFC Ricerca (progetti FFC#4/2018, FFC#3/2020, Molecole 3.0), abbiamo identificato una nuova classe di molecole (composti PP) che funzionano da correttori della CFTR mutata soprattutto in combinazione con composti di classe 1 (VX-809, VX-661).

**Ipotesi
e obiettivi**

Nell'ambito di una classe di composti a struttura triciclica (PP), è emerso un candidato molto promettente (PP028). È stata condotta una estesa campagna di sintesi e di valutazione funzionale che ha dimostrato la possibilità di sviluppare composti con proprietà progressivamente migliorate dal punto di vista dell'attività correttrice su CFTR e delle proprietà MedChem. In effetti è stato individuato un nuovo candidato, PP244, dalle caratteristiche promettenti. L'obiettivo è quindi di proseguire il lavoro per identificare molecole sempre più attive su F508del e altre mutazioni.

Metodi

Cicli di sintesi chimica e di valutazione funzionale sono effettuati per identificare composti con le migliori caratteristiche. L'esplorazione dello spazio chimico è effettuata sia attraverso modifiche del composto PP028, sia generando una nuova famiglia di composti (SH) dotati di una maggiore flessibilità strutturale. Tutti i composti sintetizzati sono saggiati sulla linea cellulare CFBE41o- con espressione di F508del-CFTR. I composti attivi sono verificati su cellule epiteliali bronchiali da persone con FC. Infine, i composti più promettenti sono controllati su altre mutazioni quali N1303K e W1282X.

Risultati

Abbiamo ottenuto finora 250 nuovi composti PP e 130 composti SH, tutti saggiati su cellule CFBE41o- per determinarne l'attività corretrice, che è stata confermata per i migliori derivati su colture primarie di epitelio bronchiale. In parallelo sono stati effettuati saggi per evidenziare eventuali attività indesiderate.

Conclusioni

I composti PP ed SH sono promettenti per lo sviluppo di trattamenti combinatori per la correzione del difetto di base nella FC. Il lavoro in parallelo su due famiglie di composti aumenta la probabilità di sviluppare candidati ottimizzati per uno sviluppo preclinico e clinico.

Appendice Progetto Molecole 3.0

I ricercatori propongono di continuare il processo di ottimizzazione chimica dei composti PP e SH, seguendo il percorso adottato finora; l'obiettivo è quello di eseguire una ottimizzazione multiparametrica sulle due famiglie di composti PP e SH, che potrebbe portare al raggiungimento delle caratteristiche necessarie per accedere alla fase preclinica.

SESSION 4

Personalized therapies

Enhancing the prediction of clinical responses to CFTR modulators by in vitro assays using patient-derived tissues under conditions mimicking native status of CF airways

Ottimizzazione della previsione delle risposte cliniche ai modulatori della CFTR utilizzando le cellule primarie nasali in condizioni che rispecchiano lo stato infiammatorio del paziente con FC

Background and rationale

Chronic infections and inflammation are the primary causes of declining lung function in people with cystic fibrosis (pwCF). Kaftrio (Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor, ETI) is an approved combination therapy for pwCF bearing the most common mutation, F508del. However, clinical studies on Kaftrio demonstrated that the response to treatments is variable among patients. This high patient-to-patient variation in Kaftrio response may feasibly be attributed in part to differences in types of microbial infections across patients and even within a single patient over time.

Hypothesis and objectives

*In vitro screening of patient-specific responses to CFTR modulators under infection or inflammation in a relevant preclinical model using primary airway epithelial cells could enhance the prediction of clinical response. In the proposed study we aimed to infect primary human nasal epithelial (HNE) cells with clinical exoproducts of *P. aeruginosa* isolated from the corresponding pwCF to mimic what happens in vivo. We also tested the effect of Kaftrio on inflammatory response and oxidative stress in HNE cells.*

Essential methods

*We analyzed: i) the efficacy of CFTR modulators in HNE cells infected with clinical exoproduct of *P. aeruginosa* on functional rescue of mutated CFTR by Ussing Chamber and FLIPR assay; ii) the pro-inflammatory cytokines in HNE cells infected with clinical by RNA sequencing, RT-PCR and ELISA assay; iii) intracellular ROS production by using a ROS sensitive fluorescent probe (DCF).*

Results

*We found that Kaftrio-mediated rescue of F508del-CFTR is reduced by clinical exoproducts of *P. aeruginosa* in both CFBE cell line and primary nasal epithelial cells from 15 pwCF. Interestingly, the reduction of F508del-CFTR activity was reduced in strain-specific manner by 10 to 65%. Moreover, we developed a high-throughput plate reader assay to test CFTR modulators efficacy on individual-specific nasal cultures under infection and inflammatory conditions.*

*We then studied the inflammatory response in HNE infected with the clinical exoproducts of *P. aeruginosa* isolated from the corresponding patient. Interestingly, we found a higher variability for pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) levels across different clinical exoproducts. Moreover, ETI pre-treatment significantly decreased the pro-inflammatory cytokines in HNE cultures in presence or absence of clinical exoproducts. Lastly, we found that treatment of HNE with ETI significantly reduced ROS level in absence or presence of clinical exoproducts.*

Conclusions

Understanding the role of infection and inflammatory response of CF airways on mutated CFTR rescue by CFTR modulators should provide the basis for optimizing the prediction of clinical responses to CFTR modulators.

Razionale dello studio

L'infezione cronica e l'infiammazione sono le cause primarie del declino della funzionalità polmonare nelle persone con fibrosi cistica (FC). Kaftrio è una terapia attualmente approvata per persone con FC portatrici della mutazione più comune, F508del. Tuttavia, gli studi clinici su Kaftrio hanno dimostrato che la risposta ai trattamenti è variabile da paziente a paziente: ciò potrebbe in parte essere attribuito alle differenze nel tipo di infezioni microbiche tra pazienti e anche all'interno di un singolo paziente nel corso del tempo.

Onofrio Laselva (2nd from the left) with Caterina Allegretta, Enza Montemitro and Graziano Pesole

14

Onofrio Laselva¹, Enza Montemitro², Graziano Pesole³



¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Italy - ² Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy - ³ Department of Biosciences, Biotechnology and Biopharmaceutics, University of Bari, Italy (FFC#6/2021, concluded)

Ipotesi e obiettivi	Lo screening <i>in vitro</i> delle risposte paziente-specifiche ai modulatori di CFTR, in condizioni di infezione o infiammazione in cellule epiteliali di persone con FC, potrebbe migliorare la previsione della risposta clinica. Nello studio proposto abbiamo infettato le cellule epiteliali nasali (HNE) con gli esoprodotti clinici di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolati dal corrispondente malato FC per mimare ciò che accade <i>in vivo</i> . Abbiamo anche testato l'effetto di Kaftrio sulla risposta infiammatoria e sullo stress ossidativo nelle cellule HNE.
Metodi	Abbiamo analizzato: i) l'efficacia di Kaftrio nel ripristinare l'attività della F508del-CFTR in HNE infettate mediante studi di Ussing chamber e FLIPR; ii) le citochine proinfiammatorie nelle cellule HNE infettate mediante RNA sequencing, RT-PCR e saggi ELISA; iii) la produzione intracellulare di ROS utilizzando una sonda fluorescente sensibile ai ROS.
Risultati	Abbiamo dimostrato che l'efficacia di Kaftrio nel ripristino della F508del-CFTR, è ridotta nelle HNE infettate con gli esoprodotti clinici di <i>P. aeruginosa</i> . È stato interessante notare che l'attività di CFTR è stata ridotta in modo ceppo-specifico dal 10 al 65%. Inoltre, abbiamo sviluppato un metodo fluorescente che permette di testare l'efficacia dei modulatori della CFTR su colture nasal specifiche per paziente in condizioni di infezioni e infiammazione. Abbiamo inoltre studiato la risposta infiammatoria nelle HNE infettate con gli esoprodotti clinici di <i>P. aeruginosa</i> . Abbiamo dimostrato un'elevata variabilità dei livelli di citochine pro-infiammatorie indotte dall'infezione con i diversi esoprodotti clinici. Inoltre, il pretrattamento con ETI ha ridotto significativamente le citochine proinfiammatorie nelle colture nasal. Infine, abbiamo dimostrato che il trattamento delle cellule nasal con Kaftrio riduce significativamente i livelli dei ROS intracellulari in presenza di esoprodotti.
Conclusioni	La comprensione del ruolo dell'infezione e della risposta infiammatoria sul ripristino della CFTR mutata da modulatori della CFTR dovrebbe fornire la base per ottimizzare la previsione delle risposte cliniche ai modulatori di CFTR.

Therotyping of cystic fibrosis

Therotyping della fibrosi cistica



Marco Lucarelli, Adriana Eramo (3rd and 4th from the right) with their collaborators

15

Marco Lucarelli¹, Adriana Eramo²

¹ Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Italy - ² Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

(FFC#8/2021, concluded)

Background and rationale

The effectiveness of the genotype-specific precision therapy of cystic fibrosis (CF) when rare variants are to be targeted needs evaluation. The therotyping approach, by drug testing in patient-specific cellular models, is a valuable tool to identify responding pathogenic variants of CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Hypothesis and objectives

CF modulatory therapies could be effective also on rare CFTR genotypes still untested. Furthermore, the targetable amount of CFTR may be variable and it may be usefully enhanced by amplificatory therapies. During this project, we performed CF therotyping using patient-derived pre-clinical respiratory models, mainly on rare genotypes not yet studied. The CFTR therapeutic response was tested for the clinically used modulators, a new modulator combination, and a novel amplificatory strategy.

Essential methods

Airway epithelial stem cells (AESCs) and organoids were obtained by nasal brushing of CF patients with different genotypes, by the culture reprogramming condition (CRC) approach setup by us for CF. Patient-specific cell lines were validated and characterized for CFTR biochemical, genetic and expression defects. The effectiveness of treatments was evaluated by several functional tests.

Results

During this project, we obtained and characterized 65 patient-specific long-term cultures, with 50 different genotypes, 44 of which are rare (most unexplored for therapeutic response to modulators). The CFTR response to Kaftrio and to a new modulator combination was assessed, obtaining a functional recovery in 75% of rare genotypes. Most of the low- or non-responding genotypes include mutated alleles with stop codons, frameshift, macrodeletions and/or the N1303K pathogenic variant. Surprisingly, a great interindividual variability has been found in the CFTR mRNA expression, mostly unrelated to the CFTR mutated genotype and which can affect the therapeutic response. A possible amplificatory therapy was able to enhance both the CFTR and FOXII (a marker of respiratory epithelium differentiation) mRNA expression, in wild-type and F508del/F508del genotypes.

Conclusions

Considering also previous projects, till now we obtained, characterized and banked 107 patient-specific long-term cultures, with 82 different genotypes, 69 of which are rare. Therapeutic response to therotyping has been disclosed, with the aim of possible Kaftrio treatment of corresponding patients. Interindividual variability in the CFTR expression should be considered in the planning of modulatory therapies. The therotyping of CFTR pathogenic genotypes may allow the clinical translation of effective therapeutic strategies.

Razionale dello studio	L'efficacia della terapia di precisione genotipo-specifica della fibrosi cistica (FC) per varianti rare necessita ancora di valutazione. Il <i>therotyping</i> , procedura di test farmacologici in modelli cellulari paziente-specifici, è utile per identificare le varianti patogenetiche del gene CFTR (il regolatore della conduttanza transmembrana responsabile della FC) che rispondono ai trattamenti.
Ipotesi e obiettivi	Le terapie modulatorie già usate in FC potrebbero essere efficaci anche sui genotipi rari di CFTR non ancora valutati. Inoltre, la quantità della proteina CFTR disponibile per la terapia modulatoria può essere variabile e potrebbe essere utilmente aumentata dalla cosiddetta terapia amplificatoria. Durante questo progetto abbiamo effettuato il <i>therotyping</i> usando modelli cellulari respiratori preclinici paziente-specifici, principalmente di genotipi rari non studiati finora. La risposta terapeutica è stata valutata per modulatori del CFTR già usati in terapia, per una nuova combinazione di modulatori, nonché per una nuova strategia sperimentale amplificatoria.
Metodi	Le cellule respiratorie "riprogrammate" a cellule staminali epiteliali (AESC) e gli organoidi sono stati ottenuti da brushing nasale di persone con FC con diversi genotipi, mediante l'approccio cosiddetto CRC (<i>culture reprogramming condition</i>) messo a punto per la FC dal nostro gruppo di ricerca. Queste preparazioni cellulari paziente-specifiche sono state validate e caratterizzate per i difetti del CFTR a livello biochimico, genetico e di espressione. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata mediante diversi test funzionali.
Risultati	Nell'ambito di questo progetto abbiamo ottenuto 65 colture cellulari paziente-specifiche, con 50 diversi genotipi del CFTR, 44 dei quali rari (in maggior parte non precedentemente studiati per la risposta terapeutica ai modulatori). È stata valutata la risposta di CFTR al Kaftrio e alla nuova combinazione di modulatori ottenendo il recupero funzionale, a livello cellulare, nel 75% dei genotipi rari. Molti dei genotipi con bassa o assente risposta terapeutica includono alleli con codoni di stop, slittamento del registro di lettura, macrodelezioni e/o la variante patogenetica N1303K. Sorprendentemente, è stata evidenziata un'elevata variabilità interindividuale nell'espressione di CFTR (in larga parte indipendente dal genotipo mutato), che potrebbe condizionare la risposta terapeutica. Sia nel genotipo wild-type sia in quello F508del/F508del la terapia amplificatoria ha indotto un incremento dell'espressione dei geni CFTR e FOXI1 (un marcitore del differenziamento dell'epitelio respiratorio).
Conclusioni	Considerando anche i progetti precedenti, finora abbiamo ottenuto, caratterizzato e conservato 107 colture cellulari paziente-specifiche, con 82 genotipi diversi, 69 dei quali rari. La risposta terapeutica al <i>therotyping</i> è stata resa nota, con l'obiettivo di un possibile trattamento con il Kaftrio delle rispettive persone con FC. La variabilità inter-individuale nell'espressione di CFTR dovrebbe essere presa in considerazione nella pianificazione delle terapie modulatorie. Il <i>therotyping</i> delle persone con FC facilita il trasferimento alla clinica delle strategie terapeutiche efficaci.

Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs

Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani: soddisfare i bisogni insoddisfatti



Nicoletta Pedemonte (2nd from the right) with her collaborators

16

Valeria Capurro¹, Emanuela Pesce¹, Cristina Pastorino¹, Valeria Tomati¹, Federico Cresta², Elvira Sondo¹, Maria Teresa Lena¹, Tiziano Bandiera³, Luis J. V. Galiotta⁴, Carlo Castellani², Renata Bocciardi^{1,5}, Nicoletta Pedemonte¹

¹ UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ² Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ³ D3-PharmaChemistry, Istituto

Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - ⁴ Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - ⁵ Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOGLMI), University of Genoa, Italy (FFC#10/2021, concluded)

Background and rationale

Many people with cystic fibrosis (pwCF), i.e approx. 30% in Italy, carry variants not included among those for which CFTR-modulating drugs have been approved and are thus defined as "orphan mutations". Some of these mutations are uncharacterized and have unknown sensitivity to CFTR modulators. While FDA approved the use of Trikafta/Kaftrio for pwCF bearing selected rare mutations based on in vitro data, for the European Medicines Agency further information is considered necessary to support authorization for selected genotypes.

Hypothesis and objectives

New personalized-medicine strategies based on the use of disease-relevant primary cells could be exploited to evaluate efficacy of therapeutic approaches. Our study aims to investigate, in patient-derived nasal epithelia, the molecular mechanisms underlying the loss of function caused by mutations, and to assess their responsiveness to CFTR modulators.

Essential methods

Nasal epithelial cells are cultured using an established protocol. Functional and biochemical characterization of CFTR variants, and evaluation of the effect of approved drugs or preclinical compounds is performed by electrophysiology and microfluorimetry on native and heterologous systems. Molecular analysis of CFTR transcripts is used to confirm sequence and expression of CFTR isoforms.

Results

Our project relies on a network of collaborating CF centers that have recruited so far more than 350 patients. As expected, for most pwCF CFTR activity is very low. We have been able to identify effective modulators for approximately 50% of the pwCF enrolled in the project. Treatment with approved CFTR modulators rescues CFTR activity to values that are above those observed upon treatment of F508del/F508del epithelia with lumacaftor/ivacaftor, but for some pwCF, the pharmacological rescue is comparable to that observed upon treatment with Kaftrio.

Among the pwCF showing an optimal response to CFTR modulators, some bear variants not yet included in the list of 178 variants eligible to Kaftrio. On the contrary, although carrying Kaftrio-eligible variants, some patients displayed a reduced response to Kaftrio: in some cases, this lack of effect could be ascribed to the presence of previously unidentified complex alleles.

Conclusions

Our study aids in the definition of personalized treatment for people with CF, including those with rare, poorly characterized mutations. Furthermore, our findings provide evidence for the use of patient-derived nasal cells derived from pwCF, as compared to other types of approaches, for a preliminary assessment of novel, preclinical therapies.

Razionale dello studio

Molte persone con fibrosi cistica (in Italia circa il 30%) sono portatrici di varianti non incluse tra quelle per le quali sono stati approvati specifici farmaci chiamati modulatori di CFTR, quindi definite "mutazioni orfane". Alcune di queste mutazioni non sono caratterizzate e non ne è nota la sensibilità ai modulatori di CFTR. Mentre la statunitense FDA ha approvato l'uso di Trikafta/Kaftrio per persone con FC portatrici di mutazioni rare selezionate sulla base di dati *in vitro*, per l'Agenzia europea per i medicinali sono ritenuti necessari ulteriori dati a supporto dell'estensione a genotipi selezionati.

Ipotesi e obiettivi

Per valutare l'efficacia degli approcci terapeutici è possibile sfruttare le nuove strategie di medicina personalizzata basate sull'uso di cellule primarie rilevanti per la malattia. Il nostro scopo è quello di indagare, nelle cellule epiteliali nasali derivate dai pazienti, i meccanismi molecolari alla base della perdita di funzione causata da mutazioni di CFTR e di valutarne la risposta ai modulatori.

Metodi

Le cellule epiteliali nasali vengono coltivate usando un protocollo consolidato. La caratterizzazione funzionale e biochimica delle varianti di CFTR e la valutazione dell'effetto di farmaci approvati o composti preclinici vengono eseguite mediante elettrofisiologia e microfluorimetria su sistemi nativi ed eterologhi. L'analisi molecolare dei trascritti di CFTR viene eseguita mediante procedure standardizzate per confermare la sequenza e l'espressione di forme specifiche del gene.

Risultati

Il nostro progetto si avvale della collaborazione con una rete di centri FC, che finora hanno reclutato più di 350 pazienti. Come previsto, per la maggior parte delle persone con FC l'attività di CFTR è molto bassa. Siamo stati in grado di identificare modulatori efficaci per circa il 50% delle persone con FC arruolate nel progetto. Il trattamento con i modulatori di CFTR approvati aumenta significativamente l'attività di CFTR, in alcuni casi anche a livelli paragonabili a quelli osservati in epители derivati da persone con FC omozigoti per la F508del e trattati con Kaftrio.

Tra le persone che hanno mostrato una risposta ottimale ai modulatori CFTR, alcune presentano varianti non ancora incluse nell'elenco delle 178 varianti idonee per Kaftrio. Al contrario, pur avendo varianti ritenute sensibili a Kaftrio, alcuni pazienti hanno mostrato una risposta ridotta: in alcuni casi, questo è stato correlato alla presenza di alleli complessi precedentemente non identificati.

Conclusioni

Il nostro studio ha confermato la validità dell'uso di cellule nasali derivate da persone con fibrosi cistica per una valutazione preliminare di nuove terapie precliniche, aiutando nella definizione di trattamenti personalizzati, in particolare per le mutazioni rare e scarsamente caratterizzate.

Understanding the mechanisms behind the variable efficacy of CFTR modulators on the N1303K mutation on human primary nasal epithelial cells

Studio dei meccanismi alla base della variabilità di risposta ai modulatori di CFTR della mutazione N1303K su cellule nasali primarie

Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is one of the most frequent genetic disease due to bi-allelic loss of function of the CFTR gene. Pharmacological agents called CFTR modulators have been developed to rescue the basic defects of mutant CFTR with specific functional defects and are now available in the clinics. The N1303K, the second most common variant in Italian CF patients, causes both trafficking and gating defects with a modest and variable response to available modulators usually effective in rescuing these functional alterations.



Renata Bocciardi (in the middle) with her collaborators

17

**Renata Bocciardi^{1,2}, Cristina Pastorino²,
Mariateresa Lena², Valeria Capurro²**

¹ Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOOGMI), University of Genoa, Italy

² UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy

(FFC#3/2023, new)

Hypothesis and objectives	<p>The main goal of this proposal is to investigate the basis of the variable response of the N1303K variant to approved modulators in primary HNEC from patients. The underlying hypothesis is that among the factors responsible for such heterogeneity, different amounts in the expression level of the mutant allele may be critical and variants affecting regulatory regions of the CFTR gene may be involved as cis modifying factors.</p>
Essential methods	<p>Qualitative and quantitative evaluation of the CFTR gene expression in epithelia from N1303K patients will be performed and compared to control and CF-carrier HNEC. In samples showing defective/differential expression of the allele we will check the presence of additional variants that i) might affect the coding sequence altering the stability or the primary defect of the N1303K mutant; ii) might modulate the expression of the N1303K allele by affecting genomic regions involved in gene expression regulation. To this purpose, both molecular and functional assays will be applied.</p>
Preliminary results	<p>We performed a functional characterization of the CFTR activity in HNEC from a cohort of N1303K patients demonstrating that the pharmacological rescue is quantitatively (if not even qualitatively) different among patients, defining different groups of drug response. Our data suggest that this may be due to intrinsic properties of these N1303K epithelia.</p>
Conclusions	<p>We expect to provide a quantitative and qualitative profile of the CFTR gene expression in HNEC expressing the N1303K allele with different response to CFTR modulators and open the path toward the identification of the molecular basis of such heterogeneous behavior. The final aim of our study is to provide indications suitable to select and develop pharmacological agents able to provide a reliable treatment for people carrying the N1303K variant still awaiting an effective therapy..</p>
Razionale dello studio	<p>La fibrosi cistica (FC) è una delle più frequenti malattie genetiche dovuta a varianti del gene CFTR. I farmaci disponibili in clinica, detti modulatori di CFTR, sono stati sviluppati per correggere il difetto funzionale specifico causato da alcune particolari mutazioni. La N1303K, seconda variante più frequente nella popolazione FC italiana, causa alterazioni di maturazione e attività di CFTR e presenta una risposta variabile al trattamento con modulatori.</p>
Ipotesi e obiettivi	<p>Scopo del progetto è studiare le basi della variabilità di risposta di N1303K ai modulatori di CFTR in campioni di cellule nasali ottenute da persone con FC. L'ipotesi è che, tra i fattori responsabili di questa eterogeneità, possano avere un ruolo chiave differenze di espressione dell'allele N1303K, e che alterazioni di regioni regolatorie importanti per l'espressione del gene possano agire come fattori modificatori.</p>
Metodi	<p>Proponiamo un'analisi sia qualitativa che quantitativa dell'espressione di CFTR in campioni di cellule nasali ottenute da persone con FC, di controllo o di portatori sani. Nei campioni con espressione difettiva dell'allele N1303K verrà ricercata la presenza di alterazioni aggiuntive del gene che i) potrebbero alterare la stabilità o modificare il difetto di base di N1303K, se presenti sulla sequenza codificante; ii) potrebbero modulare l'espressione (quantità di mRNA) se presenti in regioni di DNA coinvolte nella regolazione dell'espressione del gene. A questo scopo, combineremo sia analisi molecolari che saggi funzionali.</p>
Risultati preliminari	<p>Lo studio funzionale dell'attività di CFTR in campioni di cellule nasali derivate da una coorte di persone con FC portatrici di N1303K ha dimostrato che la risposta farmacologica ai modulatori è quantitativamente (e se possibile qualitativamente) diversa e permette di suddividere i pazienti in diversi gruppi in base alla risposta ai farmaci. I nostri dati suggeriscono che questa variabilità possa essere dovuta a caratteristiche proprie degli epiteli N1303K.</p>
Conclusioni	<p>Risultato atteso è la definizione di un profilo di espressione del gene CFTR nei campioni di cellule N1303K con diversa risposta ai farmaci. Inoltre, si vuole aprire la strada all'identificazione delle basi molecolari della variabilità di questa risposta, base per la selezione e lo sviluppo di modulatori che possano fornire un trattamento affidabile alle persone con FC e varianti N1303K, ancora in attesa di una terapia efficace.</p>

Correcting the CFTR basic defect

Oxidative stress and autophagy in cystic fibrosis: novel biochemical characterizations and drug discovery approaches

Stress ossidativo e autofagia in fibrosi cistica: nuovi approcci biochimici e di individuazione di farmaci



On the left, Giorgio Cozza (in the middle) with his collaborators. On the right, Federica Rossin (2nd from the left) with her collaborators

Ilaria Artusi¹, Michela Rubin¹, Anna Pianazzola¹, Andrea Venerando², Valentina Bosello Travain¹, Carlo Abbate³, Valeria Raia⁴, Mauro Piacentini³, Federica Rossin³, Giorgio Cozza¹

¹ Department of Molecular Medicine, University of Padua, Italy - ² Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Italy - ³ Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy - ⁴ Department of Translational medical sciences, University of Naples Federico II, Regional Cystic Fibrosis Care Unit, Italy

(FFC#4/2021, concluded)

Background and rationale

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disorder with a significantly reduced life expectancy, primarily caused by mutations in the CFTR ion channel. The most prevalent mutant form, F508del, is incapable of correctly trafficking to and residing at the cell's plasma membrane. Current treatment options, such as Kaftrio, are only effective for a very limited range of CFTR mutations, including F508del. Consequently, the quest for novel therapeutic strategies for CF remains a pressing need.

Hypothesis and objectives

The accumulation of defective CFTR in the endoplasmic reticulum contributes to the abnormal generation of reactive oxygen species (ROS) and inflammation, associated with a marked depletion of glutathione (GSH) which fosters the oxidative damage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) via lipid peroxidation (LPO). The synthesis of GSH is overseen by the nuclear factor Nrf2, whose expression in CF epithelia is decreased by 70% compared to healthy cells. Consequently, our project aims to address the oxidative imbalance in CF by pharmacologically increasing Nrf2/GSH levels and inhibiting LPO, tackling the root causes of CF-related oxidative stress.

Essential methods

The project has employed biochemical and cellular biology analyses to uncover the functions of distinct proteins and molecular mechanisms within pharmacologically treated CF models. Specifically, Western Blot techniques were used to track the patterns of specific oxidative markers, in conjunction with assays designed to evaluate the cellular oxidative condition. Functional assessments were carried out using the Ussing Chamber in CFBE and FRT models.

Results

The results obtained suggest that pharmacological treatment can play a role in restoring the redox balance in CF. On one hand, this is accomplished through the regulation of Nrf2, and on the other hand, by inhibiting LPO using specific compounds. These interventions have demonstrated the potential to improve the effectiveness of existing correctors. Additionally, we have shown the direct influence of VX770 on modulating pro-oxidative factors within CF models.

Conclusions

The collected data, for the first time, unveil the involvement of distinct pro-oxidative mechanisms in CF. Specifically, the link between reduced Nrf2/GSH levels and LPO highlights a novel avenue in the advancement of therapies that could be applicable across various CFTR mutations.

Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica causata da mutazioni nel canale CFTR, che comporta una significativa riduzione dell'aspettativa di vita. La forma mutante più prevalente, F508del, è incapace di raggiungere e stabilirsi sulla membrana plasmatica della cellula. Le attuali opzioni di trattamento, come il Kaftrio, sono efficaci per una gamma limitata di mutazioni del CFTR, tra cui la F508del. Di conseguenza, la ricerca di nuove strategie terapeutiche per la FC rimane una necessità urgente.

Ipotesi e obiettivi

L'accumulo di CFTR difettoso nel reticolo endoplasmatico contribuisce alla generazione anomala di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e infiammazione, associata a una marcata deplezione di glutazione (GSH) che favorisce il danneggiamento ossidativo degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) attraverso la perossidazione lipidica (LPO). La sintesi del GSH è controllata dal fattore nucleare Nrf2, la cui espressione nelle cellule epiteliali FC è diminuita del 70% rispetto alle cellule sane. Di conseguenza, il nostro progetto mira a affrontare lo squilibrio ossidativo in FC aumentando farmacologicamente i livelli di Nrf2/GSH e inibendo la LPO.

Metodi

Il progetto ha impiegato analisi biochimiche e di biologia cellulare per studiare proteine e meccanismi molecolari specifici all'interno di modelli FC trattati farmacologicamente. In particolare, sono state usate tecniche di Western Blot, in combinazione con saggi progettati per valutare la condizione ossidativa cellulare. Le valutazioni funzionali sono state effettuate usando la Camera di Ussing in modelli CFBE e FRT.

Risultati

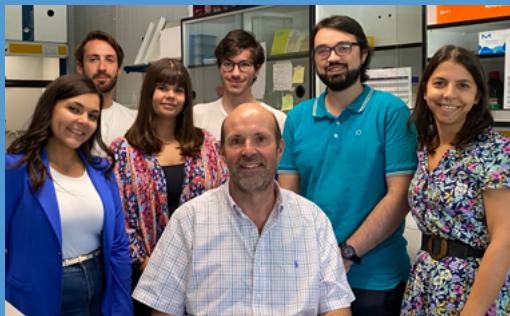
I risultati ottenuti suggeriscono che il trattamento farmacologico possa svolgere un ruolo nel ripristinare l'equilibrio redox nella FC. Da un lato, ciò è realizzato attraverso la regolazione di Nrf2, e dall'altro, mediante l'inibizione della LPO mediante specifici composti. Questi trattamenti hanno dimostrato il potenziale per migliorare l'efficacia dei correttori esistenti. Inoltre, abbiamo mostrato l'influenza diretta di VX770 nella modulazione dei fattori pro-ossidativi nei modelli FC.

Conclusioni

I dati raccolti, per la prima volta, rivelano il coinvolgimento di distinti meccanismi pro-ossidativi nella FC. In particolare, il legame tra i livelli ridotti di NRF2/GSH e la LPO evidenzia una nuova strada nell'avanzamento delle terapie che potrebbero essere applicabili a diverse mutazioni del CFTR.

Exploring the cellular pathways to promote rescue of mutant CFTR protein in cystic fibrosis

Esplorare i percorsi cellulari della proteina CFTR mutata per potenziarne il recupero



Carlos Farinha (bottom center) with his collaborators

19

Carlos M. Farinha¹, Valeria Tomati²

¹ BioISI - Biosystems and Integrative Sciences Institute, University of Lisboa, Portugal - ² UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy
(FFC#2/2023, new)

Background and rationale

Old and new data have made it increasingly clear that CFTR is at a crossing between the cytoskeleton and signaling pathways, especially cAMP signaling. Regulation of CFTR trafficking - particularly plasma membrane (PM) stability - and channel activation is a complex process involving protein partners functioning as molecular switches. Fine tuning of this regulation requires integrity of correct cytoskeletal organization, because the cytoskeleton is responsible for the scaffolding that stabilizes CFTR at the PM and brings several interacting proteins to CFTR's proximity, among which cAMP sensors, such as protein kinase A and EPAC1 have a prominent role.

Hypothesis and objectives

As we aim at characterizing the crosstalk between the cytoskeleton and cAMP signaling in the regulation of CFTR traffic and at using such mechanisms to improve CFTR PM stability and to boost endoplasmic reticulum (ER) rescue of trafficking mutants, we focused here on INF2, an inverted formin that we previously reported as negative regulator of CFTR PM stability, and on its possible dual role in regulation of CFTR at the PM and ER.

Essential methods

We used CF bronchial epithelial cells expressing wild-type or mutant CFTR and analyzed them using Western blot, cell surface biotinylation, and cycloheximide chase assay.

Preliminary results

Results show that INF2 knockdown (KD) increases mature wt-CFTR levels, even after treatment with the corrector combination Teza/Elexa. For F508del-CFTR, results show that INF2 KD improves rescue by VX-661 independently of EPAC1 activation. Additionally, INF2 KD promotes a strong stabilizing effect on immature CFTR levels and decreases rescued F508del-CFTR turnover increasing its half-life. INF2 KD was also observed to increase immature N1303K-CFTR levels.

Conclusions

These observations constitute an important characterization of how an actin cytoskeleton dynamics regulator regulates CFTR, exploring the crosstalk between cAMP signaling pathways and the cytoskeleton to affect CFTR modulation, and possibly CF handling.

Razionale dello studio

Studi sia più che meno recenti hanno messo in evidenza come la proteina CFTR è collegata sia alla struttura del citoscheletro della cellula sia alle vie di segnalazione, in particolare quella dell'AMP ciclico. La regolazione del traffico di CFTR, in particolare la sua stabilità nella membrana plasmatica, e dei meccanismi che portano all'attivazione del canale è un processo complesso che coinvolge una serie di proteine che funzionano da interruttori molecolari. Inoltre, è fondamentale che il citoscheletro sia integro, essendo responsabile dell'impalcatura che stabilizza CFTR sulla membrana e di avvicinare diverse proteine interagenti a CFTR. Tra questi, i sensori dell'AMP ciclico come la proteina chinasi A e EPAC1 hanno un ruolo di primo piano.

Ipotesi e obiettivi

Il progetto mira a caratterizzare l'interazione tra il citoscheletro e la segnalazione dell'AMP ciclico e il loro ruolo nella regolazione del traffico di CFTR. Tali meccanismi potrebbero essere usati per migliorare la stabilità di CFTR nella membrana plasmatica e potenziare il recupero dal reticolo endoplasmatico delle proteine mutate con difetto di traffico. In particolare, ci siamo concentrati sulla proteina INF2, un componente della famiglia delle formine, che il nostro gruppo ha precedentemente caratterizzato come regolatore negativo della stabilità di CFTR nella membrana. INF2 potrebbe avere un duplice ruolo nella regolazione di CFTR sia a livello della membrana che del reticolo.

Abbiamo usato cellule epiteliali bronchiali FC che esprimono CFTR wild-type o mutata e le abbiamo analizzate usando tecniche di Western Blot, biotinilazione della superficie cellulare e il Cycloheximide Chase Assay.

Metodi

Risultati preliminari	I risultati preliminari mostrano che il <i>knockdown</i> di INF2 aumenta i livelli della forma matura di wt-CFTR, anche dopo il trattamento con la combinazione di correttori tezacaftor/elexacaftor. Su F508del-CFTR, i risultati mostrano che il <i>knockdown</i> di INF2 migliora il recupero da parte di VX-661 indipendentemente dall'attivazione di EPAC1. Inoltre, il <i>knockdown</i> di INF2 stabilizza i livelli della forma immatura di CFTR e diminuisce il turnover di F508del-CFTR, aumentando la sua permanenza nella cellula. È stato anche osservato che il <i>knockdown</i> di INF2 KD aumenta i livelli della forma immatura di N1303K-CFTR.
Conclusioni	Le osservazioni raccolte permetteranno di comprendere come la regolazione dell'actina nella dinamica del citoscheletro possa regolare CFTR, esplorando la relazione tra la via di segnalazione dell'AMP ciclico e il citoscheletro e il suo ruolo nella modulazione di CFTR.
Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis	 <p>Luis J. Galietta (in the middle) with his collaborators</p>
Effetto di stimoli infiammatori sul trasporto ionico epiteliale in fibrosi cistica	20
Background and rationale	Inflammation is a hallmark of cystic fibrosis (CF) lung disease. The loss of CFTR function impairs innate defense mechanisms, thus paving the way to bacterial colonization and development of a persistent inflammatory state. Present correctors and potentiators efficiently rescue mutant CFTR function but bacterial infection remains. This situation is worse with patients carrying undruggable mutations who cannot benefit from CFTR modulators.
Hypothesis and objectives	We hypothesize that inflammation, by altering ion transport properties, further disrupts mucociliary clearance. Our objective is to assess how inflammatory stimuli affect epithelial ion transport systems, with a special focus on ENaC, SLC26A4, and ATP12A, whose role in sodium, bicarbonate, and proton transport may have detrimental effects on airway surface properties.
Essential methods	Differentiated bronchial epithelia generated on porous membranes (Snapwell and Transwell inserts) are studied with multiple functional and molecular methods: i) short-circuit current recordings; ii) pH-sensitive fluorescent probes; iii) fluorescence recovery after photobleaching (FRAP); iv) bulk and single-cell RNAseq.
Preliminary results	Treatment of epithelia with IL-17/TNF- α , a stimulus associated with Th17 immune response, significantly modifies the epithelial transcriptome with upregulation of genes coding for ion channels and transporters (SLC26A4, ATP12A, ENaC, SLC5A1), anti-bacterial molecules (defensins), neutrophil chemoattractants, and mucins (MUC5B). At the functional level, IL-17/TNF- α treatment induces in both CF and non-CF epithelia a hyperviscous state of the apical surface, probably due to enhanced electrolyte/water absorption. Importantly, the hyperviscous state can be converted to a fluid state, only in non-CF epithelia, by activation of CFTR with a beta-adrenergic stimulus. In CF epithelia, recovery from the hyperviscous state can be promoted by treatment with CF correctors (epithelia with F508del mutation) or with inhibitors of SLC26A4.
Conclusions	Our study is identifying targets and mechanisms whose pharmacological modulation could contrast the negative effects of inflammatory conditions in the airways of people with CF. This approach will be useful as an adjuvant for people with CF that are treated with CFTR modulators and will be essential for the other CF patients who carry undruggable mutations.
Razionale dello studio	Il difetto di base nella fibrosi cistica (FC) è la perdita di funzione della proteina CFTR, che causa disidratazione della superficie delle vie aeree. Questa condizione favorisce l'infezione batterica. Nonostante l'efficacia dei modulatori farmacologici di CFTR, correttori e potenziatori, molte persone con FC mostrano persistenza delle infezioni batteriche, che rappresentano quindi uno stimolo continuo di infiammazione. Tale situazione è ancora più marcata nelle persone con FC che portano mutazioni insensibili a correttori e potenziatori.
Ipotesi e obiettivi	La nostra ipotesi è che l'infiammazione abbia effetti negativi sulle proprietà della superficie delle vie aeree. In effetti, i nostri risultati preliminari suggeriscono che l'infiammazione sia alla base di un circolo vizioso che peggiora le conseguenze della perdita di funzione di CFTR, generando uno stato disidratato e iperviscoso. Il nostro obiettivo è svelare i meccanismi attraverso cui l'infiammazione altera i processi epiteliali con la conseguente identificazione di bersagli utili per un trattamento farmacologico.

Metodi	Usiamo cellule epiteliali bronchiali di persone con FC e soggetti di controllo per la generazione <i>in vitro</i> di epitelii altamente differenziati, in grado di riprodurre le proprietà del tessuto <i>in vivo</i> . Su questi epitelii effettuiamo esperimenti per misurare l'attività di CFTR e di altre proteine coinvolte nel trasporto ionico, nonché per valutare le proprietà (pH, viscosità) della superficie degli epitelii.
Risultati preliminari	Gli esperimenti finora effettuati confermano la capacità di stimoli infiammatori di modificare in maniera sostanziale gli epitelii, sia a livello molecolare che funzionale. In particolare, stimoli associati a infezioni batteriche provocano un aumento di attività di ATP12A, SLC26A4, ENaC che rendono la superficie degli epitelii molto più densa e disidratata. L'attivazione di CFTR con uno stimolo fisiologico permette agli epitelii ottenuti da soggetti di controllo, ma non da persone con FC, di ripristinare lo stato di fluidità. Tuttavia, il recupero dallo stato di disidratazione negli epitelii FC può essere ottenuto mediante trattamento con correttori di CFTR oppure con inibitori di SLC26A4.
Conclusioni	I nostri risultati sono importanti per l'identificazione di bersagli alternativi la cui modulazione farmacologica potrebbe correggere gli effetti negativi che l'infiammazione ha sulle proprietà della superficie degli epitelii.
Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect Studio dei bersagli alternativi per compensare la mancata funzione della proteina-canale CFTR	 <p>Paolo Scudieri (in the middle) with his collaborators. On the right, Fabiana Ciciriello</p> <p>Giulia Gorrieri¹, Floriana Guida¹, Ilaria Musante¹, Federico Alghisi², Carlo Visconti², Antonella Boni², Serena Tamburro¹, Alessandro Fiocchi², Fabiana Ciciriello², Paolo Scudieri^{1,3}</p> <p>¹ Department of Neurosciences, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOGMI), University of Genoa, Italy - ² UOC Pneumologia e Fibrosi Cistica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy - ³ UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy</p> <p>(FFC#11/2021, concluded)</p>
Background and rationale	<i>Correction of cystic fibrosis (CF) abnormalities may be obtained by restoring the function of CFTR with mutation-specific treatments. A potentially alternative approach is to modulate the activity of other targets in order to stimulate CFTR-independent anion secretion or inhibit acidification. This approach could be essential for people with CF expressing undruggable CFTR mutants but could also be useful as an adjuvant therapy supporting the effect of CFTR rescue maneuvers.</i>
Hypothesis and objectives	<i>Despite the increasing interest towards possible alternative targets such as TMEM16A, SLC26A9, SLC26A4, and ATP12A, their precise function and expression in the airways is largely unknown or controversial, and specific modulators are still lacking. For these reasons, our specific aims are: i) to study the expression and the role of alternative targets in the airways; ii) to develop tools and assays for therapeutic development.</i>
Essential methods	<i>To pursue our aims, we applied spatial (immunofluorescence and RNAscope) and functional (analysis of airway surface liquid – ASL – pH, viscosity, and depth) imaging approaches in ex vivo samples (tissue microarrays of the airways, nasal brushings) and advanced in vitro models of the epithelia lining large and small airways.</i>
Results	<i>We found intriguing differences in the expression levels, proximal-distal gradient, and cell type specific localization in the airways of alternative targets. ATP12A and SLC26A4 were mainly localized in secretory cells and overexpressed under inflammatory conditions <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (CF and asthmatic patients). TMEM16A appeared with a very low expression in human bronchi and was undetectable in more distal regions. Interestingly, SLC26A9 was absent in most epithelial and glandular cells of the airways, except for rare epithelial cells (<1%) showing high expression. We identified these cells as pulmonary neuroendocrine cells. Pharmacological dissection of alternative targets contribution to ASL properties evidenced ATP12A as a major player in the regulation of ASL pH and viscosity, with its inhibition resulting in normalization of CF ASL pH and viscosity.</i>
Conclusions	<i>Our study indicates that targeting ATP12A proton pump could provide novel therapeutic opportunities for CF. To start the search of drug candidates we developed <i>in vitro</i> models with functional expression of ATP12A and designed an antisense-drug approach aimed at ATP12A suppression.</i>
Razionale dello studio	Il trattamento della fibrosi cistica (FC) si può basare su farmaci che agiscono direttamente sulla proteina CFTR mutata, con lo scopo di ripristinarne la corretta funzione. Un approccio alternativo si potrebbe basare sulla modulazione di bersagli diversi dalla proteina CFTR, al fine di aumentare la secrezione anionica o inibire l'eccessiva acidificazione che si osserva nelle vie aeree delle persone con FC.
Ipotesi e obiettivi	Nonostante l'elevato interesse nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche rivolte a tutte le persone con FC, il ruolo preciso di potenziali bersagli alternativi, come TMEM16A, SLC26A9, SLC26A4 e ATP12A, è tuttora poco conosciuto o controverso. Inoltre, modulatori farmacologici specifici per questi bersagli non sono ancora stati sviluppati. Pertanto, l'obiettivo principale di questo progetto è stato lo studio dell'espressione e della funzione nelle vie aeree di potenziali bersagli alternativi, in modo da selezionare quelli più promettenti e iniziare lo sviluppo di approcci terapeutici mirati.

Metodi	Sono state applicate metodiche di <i>imaging</i> per studi di espressione (RNAscope e immunofluorescenza) e funzione (saggi per valutare il contributo dei bersagli alternativi alle proprietà dell'epitelio respiratorio) su diversi tipi di campioni rappresentativi delle vie aeree.
Risultati	Abbiamo caratterizzato in dettaglio i profili di espressione e la localizzazione cellula-specifica di TMEM16A, SLC26A9, SLC26A4 e ATP12A nelle diverse regioni delle vie aeree native e <i>in vitro</i> . ATP12A e SLC26A4 sono risultati i più espressi, soprattutto in condizioni infiammatorie e spesso hanno mostrato co-espressione in cellule secretorie. TMEM16A e SLC26A9 risultano, invece, meno espressi, con il secondo che mostra una peculiare localizzazione limitata alle cellule polmonari neuroendocrine. Abbiamo poi valutato il contributo dei bersagli alternativi alle proprietà del fluido che riveste l'epitelio respiratorio. Questi studi hanno identificato un ruolo primario per la pompa protonica ATP12A, la cui inibizione ha prodotto effetti benefici sulle proprietà epiteliali.
Conclusioni	Il nostro progetto ha individuato ATP12A come bersaglio alternativo più promettente per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la FC. Inoltre, abbiamo sviluppato dei modelli da usare per la ricerca di nuovi farmaci in grado di inibire la funzione o ridurre l'espressione di ATP12A.

SESSION 6



Laura Lentini and Ivana Pibiri (bottom center) and their research group

22

Treatment of rare and orphan mutations

Validation of the biodistribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems

Valutazione della distribuzione e dell'attività di nuove molecole ad azione readthrough nel modello di topo e in altri sistemi di modello FC

Background and rationale

*Among the mutations of the Cystic Fibrosis Transconductance Regulator (CFTR) gene, causing cystic fibrosis (CF), nonsense mutations are the second most diffuse mutations. In particular, in Italy, about 20,5% of people with CF have a stop mutation. A proposed approach restoring the nonsense mutated CFTR gene is translational readthrough of premature termination codons (PTCs) by Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs). By computational and biological screening, we identified three new small molecules showing high readthrough activity. Based on the results of the project FFC#3/2017 we hypothesize that: i) the efficacy of TRIDs observed *in vitro* is reproducible *in vivo*; ii) the CFTR protein produced after the readthrough recovers its functionality; iii) the Mechanism Of Action (MOA) could involve an interaction with the mRNA or proteins favoring interaction with t-RNA directly or indirectly.*

*The main scope of this project was to assess the molecules toxicity and the biodistribution *in vivo*, to evaluate CFTR expression and functionality after treatment with TRIDs *in vivo* and in CF organoids. A side objective was to study the possible MOA.*

Essential methods

Scale up of the synthesis to obtain adequate amounts of the selected TRIDs. Study of the TRIDs metabolism in human liver microsomes and study of the biodistribution in a wild type mouse model. Analysis of CFTR expression (by Western Blot and Real time RT-PCR) and functionality after treatment with NV TRIDs in G542X-CFTR stop mouse model and in human CF intestinal organoids carrying nonsense CFTR mutations. Computational evaluation of the TRIDs biological targets and MOA.

Results

Our studies performed on human liver microsomes and in mice models, showed a good metabolic stability and biodistribution of our molecules. Histological analyses performed on different organs of the treated mice showed no deleterious effects in acute toxicity experiments. Moreover, a moderate rescue of the CFTR activity was observed in CF organoids in combination with CFTR modulators. Finally, a possible biological target of the NV molecules was explored by docking and Molecular Dynamics simulations, indicating that the FTSJ1 protein could be involved in the readthrough process induced by our TRIDs.

Conclusions

Our findings have translational potential and provide the validation of molecules with readthrough activity for the rescue of the CFTR function.

Razionale dello studio	Le mutazioni stop rappresentano il secondo tipo di mutazione più frequente del gene CFTR. Esse causano un fenotipo severo della malattia, poiché comportano la completa assenza della proteina. Un approccio terapeutico per questo tipo di mutazione è rappresentato dal <i>readthrough</i> , cioè il “superamento” del codone di stop prematuro, meccanismo che consente di sintetizzare una proteina completa. Questo è reso possibile da farmaci noti come TRIDs (<i>Translational Readthrough Inducing Drugs</i>).
Ipotesi e obiettivi	Nel nostro precedente progetto (FFC#3/2017) abbiamo identificato tre molecole che presentano elevata attività <i>readthrough</i> e una bassa tossicità sia <i>in vitro</i> sia <i>in vivo</i> (modello Zebrafish). Scopo di questo progetto è stato quello di valutarne stabilità, tossicità e biodistribuzione in modello di topo oltre all’efficacia su modelli avanzati di FC. Infine, ulteriore obiettivo è stato quello di valutarne a fondo il meccanismo d’azione (MOA).
Metodi	Ceppi di topi wild-type sono stati usati per lo studio di tossicità acuta delle tre molecole NV848, NV914, NV930 e per la biodistribuzione di queste <i>in vivo</i> . Stiamo completando gli studi di espressione di CFTR in un sistema modello di topo CFTR-UGAstop dopo il trattamento con le tre molecole NV. Abbiamo stimato l’attività delle nuove molecole in organoidi umani intestinali con mutazioni stop del gene CFTR. Studi computazionali sono invece stati effettuati per comprendere il target biologico e il meccanismo d’azione delle molecole.
Risultati	I risultati ottenuti hanno mostrato una buona stabilità e tollerabilità delle tre molecole NV848, NV914, NV930 <i>in vivo</i> , oltre alla capacità di raggiungere differenti distretti dell’organismo (NV848). È stato anche possibile osservare un recupero dell’attività di CFTR in organoidi intestinali FC con mutazione W1282X in combinazione a correttori e potenziatori. Inoltre gli studi hanno mostrato la non interferenza delle tre molecole con i codoni di stop naturali e il possibile coinvolgimento della proteina FTSJ1 nel meccanismo del <i>readthrough</i> dei codoni stop. Sono in fase di completamento gli esperimenti sul modello di topo CFTR-UGAstop.
Conclusioni	I risultati di questo studio hanno un elevato potenziale traslazionale e forniscono in parte la convalescenza di molecole con attività di <i>readthrough</i> per il ripristino della funzione di CFTR.

A lipid-based therapeutic approach to rescue F508del-CFTR and CFTR with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis

Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con la mutazione F508del e mutazioni orfane e valutazione delle interazioni ospite-patogeno in fibrosi cistica



Massimo Aureli (in the middle) with his collaborators: from the left, Laura Mauri, Dorina Dobi, Rosaria Bassi, Nicoletta Loberto, Anna Tamanini

23

Anna Tamanini¹, Nicoletta Loberto², Laura Mauri², Rosaria Bassi², Dorina Dobi², Christian Boni³, Elena Baldisseri¹, Diletta Onorato⁴, Federica Quiri⁴, Nicoletta Pedemonte⁵, Valeria Tomati⁵, Giulio Cabrini⁶, Valentino Bezzerrini^{1,3}, Debora Olioso¹, Alessandro Rimessi^{6,7}, Massimo Aureli²

¹ Section of Clinical Biochemistry, University of Verona, Italy - ² Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - ³ Cystic Fibrosis Center of Verona, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy - ⁴ Department of Pathology and Diagnostics, University of Verona, Italy - ⁵ UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ⁶ Research Center on Innovative Therapies for Cystic Fibrosis, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Italy - ⁷ Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy. (FFC#1/2022, ongoing)

Background and rationale

Several people with cystic fibrosis (pwCF) carrying orphan mutations are still without therapeutic options. Thanks to previous grants from the FFC Ricerca Foundation, we have shown that the ganglioside GM1 stabilizes and improves the activity of the F508del CFTR rescued by Kaftrio. In CF, the plasma membrane (PM) stability of the mutated CFTR rescued by modulators is strongly affected by *P. aeruginosa* infection. Considering the immunomodulatory activity of GM1, this lipid could also potentially ameliorate the immune response in CF lungs.

Hypothesis and objectives

The aim of this project is to investigate whether exogenous administration of GM1 and cholesterol can ameliorate the activity of Kaftrio in rescuing CFTR with orphan mutations. We also intend to study the effect of GM1 on host-pathogen interactions and on the inflammatory burden in *in vitro* and *in vivo* CF models.

Essential methods

The involvement of GM1 and cholesterol as adjuvants of Kaftrio will be studied in airway CF cells with different genotypes, evaluating their effect on the stabilization of CFTR. The impact of these lipids on host-pathogen interactions will be studied in terms of internalization of *P. aeruginosa* in airway cells. The immunomodulatory effect of GM1 will be evaluated on CF murine models subjected to acute and chronic infection with *P. aeruginosa*.

Preliminary results

We verified that: i) the expression of different variants of CFTR influences the membrane composition of bronchial epithelial cells; ii) the administration of either GM1, its structural analogues, or LDL-associated cholesterol ameliorates the effect of Kaftrio increasing the PM stability of the mutated channel without exerting toxic effects; iii) GM1 restores the clearance of *P. aeruginosa* in bronchial epithelial cells expressing F508del-CFTR. We generate new bronchial epithelial human cell lines overexpressing different mutations of CFTR that are orphan in terms of therapy. We set up the experiments on CF murine models to verify the toxicity of GM1 and its ability to enhance the activity of immune cells to kill *P. aeruginosa*.

Conclusions

The results of this study may serve as a starting point for the development of new therapeutic strategies based on the combination of lipids with correctors and potentiators, aimed at increasing the effectiveness of the treatment of pwCF with mutations other than F508del, as well as improving their inflammatory status.

Razionale dello studio

Diverse persone con fibrosi cistica (FC) portatrici di mutazioni orfane sono ancora prive di opzioni terapeutiche. Abbiamo dimostrato che il lipide GM1 stabilizza e migliora l'attività di CFTR-F508del recuperato da Kaftrio. In FC, la stabilità in membrana plasmatica (MP) di CFTR mutata è fortemente influenzata dall'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). Considerando l'attività immunomodulatoria di GM1, questo lipide potrebbe migliorare anche la risposta immunitaria nel polmone delle persone con FC.

Ipotesi e obiettivi

Con questo progetto vogliamo studiare se la somministrazione esogena di GM1 e colesterolo migliorino l'efficacia di Kaftrio nel ripristinare il CFTR con mutazioni orfane. Intendiamo inoltre valutare l'effetto di GM1 sull'interazione ospite-patogeno in modelli di FC *in vitro* e *in vivo*.

Metodi

L'implicazione di GM1 e del colesterolo come coadiuvanti di Kaftrio verrà studiata in cellule delle vie aeree con diverse varianti di CFTR, valutando l'effetto sulla sua stabilità. L'effetto di questi lipidi sull'interazione ospite-patogeno verrà studiato in termini di internalizzazione di *P. aeruginosa* nelle cellule delle vie aeree. L'effetto immunomodulatorio di GM1 verrà valutato in modelli di topo FC sottoposti a infezione acuta e cronica da Pa.

Risultati preliminari

Abbiamo verificato che: i) l'espressione di diverse varianti di CFTR influisce sulla composizione della MP delle cellule epiteliali bronchiali, ii) l'uso di GM1, dei suoi analoghi strutturali e del colesterolo associato alle LDL migliora l'effetto di Kaftrio aumentando la stabilità in MP del canale mutato senza causare effetti tossici, iii) il GM1 ripristina l'eliminazione di Pa nelle cellule epiteliali bronchiali che esprimono F508del-CFTR. Abbiamo iniziato a generare nuove linee cellulari epiteliali bronchiali umane sovraesprimendo diverse mutazioni di CFTR che non hanno ancora terapie disponibili. Abbiamo impostato gli esperimenti sui modelli di topo FC al fine di verificare la tossicità di GM1 e la sua capacità di potenziare l'attività delle cellule immunitarie nell'uccidere Pa.

Conclusioni

I risultati di questo studio potrebbero rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'associazione di lipidi con correttori e potenziatori, per migliorare l'efficacia dei trattamenti nei pazienti con FC con mutazioni diverse dalla F508del e per migliorarne lo stato infiammatorio.

Rescuing rare CFTR mutants with a PI3K γ mimetic peptide

Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3K γ



Emilio Hirsch (in the middle) and his research group

24

Alessandra Ghigo^{1,2}, Angela Della Sala¹, Alessandra Murabito¹, Marco Mergiotti¹, Valeria Capurro³, Jessica Conti⁴, Alessia Loffreda⁵, Andrea Raimondi⁵, Elvira Sondo³, Carlo Tacchetti⁵, Gergely Lukacs⁶, Paola Melotti⁴, Claudio Sorio⁴, Nicoletta Pedemonte³, **Emilio Hirsch^{1,2}**

¹ Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Italy - ² Kither Biotech Srl, Torino, Italy - ³ Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy - ⁴ Department of Medicine, Section of General Pathology, University of Verona, Italy - ⁵ Experimental Imaging Center, San Raffaele Scientific Institute, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy - ⁶ Department of Physiology, McGill University; Montréal, Quebec, Canada. (**FFC#3/2022, ongoing**)

Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cAMP-activated Cl⁻ channel. The approval of CFTR modulators has opened the possibility of targeting the basic molecular defects underlying CF. Nevertheless, these molecules fail to completely rescue the activity of CFTR mutants, and patients with rare mutations are not eligible for these treatments.

Hypothesis and objectives

We previously conceived a cell-permeable PI3K γ mimetic peptide (PI3K γ MP) that, by targeting the scaffold activity of PI3K γ , increases subcortical levels of cAMP, the second messenger known to increase CFTR channel activation. The ensuing PKA-mediated phosphorylation of Serine-737 of the channel activates the wild-type CFTR, while synergizes with CFTR modulators in rescuing the function of the most common mutant, F508del-CFTR. Here, we aim at demonstrating that the PI3K γ MP can be exploited to reinstate the function of rare class III-IV CFTR mutants, characterized by gating/conductance defects.

Essential methods

The effects of the PI3K γ MP on CFTR function will be evaluated in cell lines and primary cells expressing rare class III-IV CFTR variants.

Preliminary results

Preliminary data revealed that PI3K γ MP is able to rescue the opening of the rare class IV mutant, R334W, that is currently not eligible for modulator treatment. Measurement of short-circuit currents (ISC) in intestinal organoids bearing the frameshift mutation 2184insA and the R334W allele shows that acute application of PI3K γ MP induces an increase in CFTR conductance up to 6 and 12 folds when applied alone or in association with forskolin, respectively. In contrast, the conductance of the channel is not restored upon acute application of Ivacaftor, the CFTR potentiator used for CFTR variants with defects in channel gating. Intriguingly, in 2184insA/R334W organoids the peptide retains the ability to increase ISC in the presence of a CFTR inhibitor (CFTRinh172), with the residual current returning to baseline after addition of inhibitors of basolateral Ca $^{2+}$ -activated K $^{+}$ channels and of the Na-K-Cl cotransporter, which are known to increase the electrochemical driving force for luminal Cl $^{-}$ secretion.

Conclusions

Taken together, these results uncover the PI3K γ MP as an effective means of rescuing the activity of the rare R334W variant through a direct action on the CFTR protein and an indirect effect on the electrical driving force.

Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una patologia causata da mutazioni nel gene che codifica per CFTR, un canale al cloruro attivato dall'AMP ciclico. L'approvazione dei modulatori di CFTR ha aperto alla possibilità di bersagliare i difetti molecolari alla base della patologia. Tuttavia, queste molecole non riescono a ripristinare completamente l'attività dei mutanti di CFTR, e le persone con FC con mutazioni rare non sono eleggibili per questi trattamenti.

Ipotesi e obiettivi

Abbiamo ideato un peptide permeabile alla cellula (PI3K γ MP), che bloccando la funzione di "ancoraggio" di PI3K γ , aumenta i livelli subcorticali di cAMP, il secondo messaggero noto per indurre l'attivazione del canale. La conseguente fosforilazione mediata da PKA della serina-737 induce l'apertura del wt-CFTR, mentre sinergizza con i modulatori nel ripristinare la funzione della mutazione più comune, F508del-CFTR. L'obiettivo del progetto è quello di dimostrare che PI3K γ MP può essere usato per ripristinare la funzione di mutanti rari di CFTR di classe III-IV, direttamente o potenziando l'efficacia dei modulatori.

Metodi

L'effetto di PI3K γ MP di ripristinare l'attività di CFTR sarà valutata in linee cellulari e cellule primarie che esprimono varianti rare di classe III-IV.

Risultati preliminari

Dati preliminari rivelano che PI3K γ MP è in grado di ripristinare l'apertura della mutante raro di classe IV, R334W, attualmente non idoneo per il trattamento da modulatori. La misurazione delle correnti di cloruro in organoidi intestinali portatori degli alleli 2184insA e R334W mostra come l'applicazione acuta di PI3K γ MP induce un aumento della conduttanza di CFTR fino a 6 se applicato da solo o 12 volte in associazione con forskolina. Diversamente, la conduttanza del canale R334W non viene recuperata dopo l'applicazione acuta di ivacaftor, il potenziatore approvato per varianti con difetto di apertura di CFTR. Curiosamente, negli organoidi 2184insA/R334W il peptide conserva la capacità di aumentare le correnti di Cl $^{-}$ in presenza di un inibitore di CFTR (CFTRinh172), con corrente residua che ritorna ai livelli basali dopo aggiunta di inibitori dei canali del K $^{+}$ attivati da Ca $^{2+}$ e del cotrasportatore Na-K-Cl, canali noti per aumentare la forza motrice elettrochimica per la secrezione di Cl $^{-}$.

Conclusioni

Questi risultati rivelano come PI3K γ MP sia un mezzo efficace per ripristinare la funzionalità del mutante raro R334W, attraverso sia un'azione diretta sulla proteina CFTR sia con effetto indiretto sulla forza motrice elettrochimica.

Pharmacological inhibition of colistin resistance in Gram-negative cystic fibrosis pathogens

Inibizione farmacologica della resistenza alla colistina nei patogeni Gram-negativi della fibrosi cistica



In the large image, Fiorentina Ascenzi (2nd from the right), Bruno Botta (1st on the left) and collaborators. Top left image, Mattia Mori. In the image below, Stefano Salmaso

Fiorentina Ascenzi¹, Bruno Botta², Mattia Mori³, Stefano Salmaso⁴

¹ Department of Molecular and Cellular Biology, Sapienza University of Rome, Italy - ² Department of Chemistry and Technology of Drugs, Sapienza University of Rome, Italy -

³ Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy - ⁴ Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Italy (FFC#12/2021, concluded)

Background and rationale

In Pseudomonas aeruginosa inhibition of the ArnT transferase (ArnT-Pa) is expected to reduce colistin resistance. Accordingly, we have identified a natural compound that reduces colistin resistance and the ent-beyerane scaffold for further development of ArnT-Pa inhibitors.

Hypothesis and objectives

Here, we proposed to produce drug-like synthetic molecules with improved biological activity by a rational procedure toward simplification of the ent-beyerane complex structure. Additionally, liposomes were designed to overcome the low solubility of the compounds and to allow the codelivery of colistin and ArnT-Pa inhibitors.

Essential methods

In silico production of a library of ent-beyerane diterpenes and molecular docking simulations of binding to ArnT-Pa. Synthesis of the suggested compounds by organic chemistry procedures. Production and purification of ArnT-Pa and in vitro binding assay. Design and assembly of liposomal formulations by thin lipid film hydration technique. Antimicrobial testing by conventional methods against planktonic and biofilms of P. aeruginosa strains.

Results

A library of compounds was generated in silico, subsequently the library was screened using molecular docking simulations. This led to the selection of abietane-type diterpenoids which were then synthesized. Stable liposomes were assembled co-encapsulating both isostevic acid, as a prototype of ent-beyerane derivatives, and colistin at different drug ratio. Interestingly, the co-loaded liposomes possess low mobility in mucus which may represent a benefit for prolonged local release and reduced interaction with the lung mucosa. Additionally, a lyophilized prototype for inhalable has been developed. The new compounds and the liposomal formulations were tested on both planktonic and biofilm P. aeruginosa strains. Recombinant ArnT-Pa has been produced and purified; the quality of the protein has been evaluated by size-exclusion chromatography (SEC) as a prerequisite for crystallization trials.

Conclusions

Collectively this project led to the identification of compounds with colistin-adjuvant activity with a chemical structure easily-affordable and the production of liposome-based nanovehicles for the code-delivery of compounds and colistin. Additionally, recombinant ArnT-Pa is available for crystallization studies, which is expected to further improve the identification of Arn-T inhibitors.

Razionale dello studio

In *Pseudomonas aeruginosa* l'inibizione della transferasi ArnT (ArnT-Pa) è atteso che riduca la resistenza alla colistina. Infatti, abbiamo identificato un composto naturale che riduce la resistenza alla colistina e, da questo, la struttura ent-beyeranica per l'ulteriore sviluppo di inibitori di ArnT.

Ipotesi e obiettivi

Basandoci sui nostri studi precedenti, ci siamo proposti di produrre molecole sintetiche con migliori proprietà farmacologiche e attività biologica attraverso una procedura di semplificazione della struttura ent-beyeranica. Inoltre, per superare il limite della bassa solubilità dei composti identificati e per permettere la co-somministrazione della colistina e dell'adiuvante, sono stati progettati dei vettori liposomiali.

Metodi

Analisi *in silico* per la selezione di diterpeni con struttura ent-beyeranica e simulazione di legame dei composti. Sintesi dei composti selezionati *in silico* mediante procedure di chimica organica. Produzione e purificazione di ArnT-Pa e saggi di legame *in vitro*. Progettazione e assemblaggio di formulazioni liposomiali mediante tecnica di idratazione di film lipidico sottile. Test antimicrobici con metodi convenzionali contro planctonici e biofilm di ceppi di *P. aeruginosa*.

Risultati

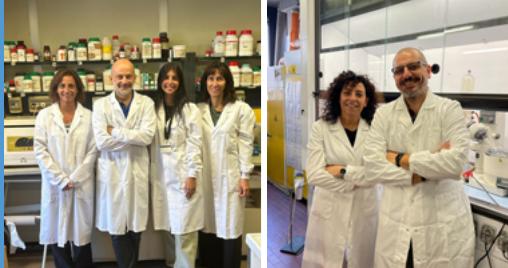
Una libreria di composti è stata generata *in silico*, e successivamente la libreria è stata poi valutata mediante simulazioni di docking molecolare. Ciò ha portato alla selezione di diterpenoidi di tipo abietano che sono stati sintetizzati e avviati ai saggi di attività antimicrobica in presenza di concentrazione sub-inibenti di colistina. Liposomi sono stati assemblati co-incapsulando sia l'acido isostevico, come prototipo di derivati ent-beyeranici, sia la colistina a diversi rapporti farmacologici. Abbiamo osservato che questi liposomi possiedono una bassa mobilità nel muco che può rappresentare un vantaggio per un rilascio locale prolungato e una ridotta interazione con la mucosa polmonare. Inoltre, è stato sviluppato un prototipo liofilizzato per sostanze inalabili. I nuovi composti e le formulazioni liposomiali sono stati testati su ceppi di *P. aeruginosa* sia planctonici che biofilm. ArnT-Pa ricombinante è stato prodotto e purificata; la qualità della proteina è stata valutata mediante cromatografia a esclusione dimensionale (SEC) come prerequisito per le prove di cristallizzazione.

Conclusioni

Nel complesso questo progetto ha portato all'identificazione di composti con attività adiuvante della colistina e alla produzione di liposomi per la co-somministrazione di composti e colistina. Inoltre, per gli studi sulla cristallizzazione è disponibile l'ARN-T-Pa ricombinante, che dovrebbe migliorare ulteriormente l'identificazione degli inibitori dell'ARN-T.

A Trojan horse strategy to improve the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections

Strategia del cavallo di Troia per migliorare il trattamento delle infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa*



On the left, Andrea Battistoni with his collaborators.
On the right, Luigi Scipione and collaborator.

Andrea Battistoni¹, Luigi Scipione²

¹ Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy - ² Department of Chemistry and Technology of Drug, University of Rome Tor Vergata, Italy (FFC#4/2023, new)

Background and rationale

Pseudomonas aeruginosa lung infections pose a serious threat to people with cystic fibrosis (CF). The ability of this pathogen to evade the host immune responses and thrive in the inflamed lung is dependent on its ability to import transition metals that are used as cofactors by many proteins. In particular, *P. aeruginosa* displays a noteworthy ability to import zinc, which is captured in the extracellular environments by a zinc-transporting molecule (zincophore) named pseudopaline. The identification of a pseudopaline-mediated mechanism of Zn uptake offers possibilities to improve antibiotic delivery in *P. aeruginosa*, overcoming some of its intrinsic mechanisms of antibiotic resistance.

Hypothesis and objectives

Our goal is to generate a new formulation of existing antibiotics to obtain drugs capable of selectively and effectively targeting *P. aeruginosa*. To this aim, we will use the Trojan horse strategy, which involves the conjugation of antibiotics to molecules synthesized by the microorganism to import essential nutrients, exploiting the ability of *P. aeruginosa* to import Zn through pseudopaline.

Essential methods

We will synthesize conjugates between pseudopaline and two different antibiotics and analyze their antimicrobial activity *in vitro* on reference and clinical strains of *P. aeruginosa* and *in vivo* in *Galleria mellonella*.

Preliminary results

We have shown that in *P. aeruginosa* Zn acquisition modulates the expression of several virulence features (alginate production, biofilm formation, protease secretion, siderophore biosynthesis, motility) and is critical for establishing lethal lung infections in mice. Furthermore, we have found that Zn uptake is significantly facilitated by the release of pseudopaline. In addition, we have developed a chemical strategy for the synthesis of pseudopaline or of a derivative able to promote the growth of *P. aeruginosa* strains unable to synthesize the zincophore. This makes the generation of conjugates between zincophore and antibiotics technically feasible.

Conclusions

We expect to obtain results that validate the potential of zincophore-based Trojan horses as a tool to increase the effectiveness of antibiotics in use for the treatment of lung infections caused by *P. aeruginosa*.

Razionale dello studio

Le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa* rappresentano una seria minaccia per le persone con fibrosi cistica (FC). La capacità di questo patogeno di proliferare nell'ambiente polmonare dipende dalla sua capacità di acquisire metalli di transizione usati come cofattori in molte proteine. In particolare, *P. aeruginosa* mostra una notevole capacità di importare zinco, che viene catturato negli ambienti extracellulari dallo zincoforo (molecola che trasporta selettivamente Zn) pseudopalina. L'identificazione di un meccanismo di assorbimento di Zn mediato da pseudopalina offre possibilità per veicolare efficientemente antibiotici in *P. aeruginosa*, superando alcuni dei meccanismi intrinseci di resistenza agli antibiotici.

Ipotesi e obiettivi

Al fine di aumentare l'efficacia degli antibiotici usati per trattare le infezioni da *P. aeruginosa*, proponiamo di usare la strategia del cavallo di Troia, che prevede la coniugazione di antibiotici a molecole sintetizzate dal microrganismo per importare nutrienti essenziali. In questo caso proponiamo di coniugare antibiotici alla pseudopalina.

Metodi

Sintetizzeremo coniugati tra lo zincoforo e due diversi antibiotici e analizzeremo la loro attività antimicrobica *in vitro* su ceppi clinici e di riferimento di *P. aeruginosa* e *in vivo* in *Galleria mellonella*.

Risultati preliminari

Abbiamo dimostrato che in *P. aeruginosa* lo Zn modula l'espressione di diversi caratteri di virulenza (sintesi di alginato, formazione di biofilm, secrezione di proteasi, biosintesi dei siderofori, motilità) ed è fondamentale per stabilire infezioni polmonari nei topi. Inoltre, abbiamo dimostrato che la pseudopalina ha un ruolo centrale nel promuovere l'assorbimento di Zn. Abbiamo anche messo a punto una nuova strategia chimica per la sintesi della pseudopalina o di suoi derivati capaci di stimolare la crescita di *P. aeruginosa*. Questi risultati aprono la strada alla possibilità di generare coniugati tra pseudopalina e antibiotici.

Conclusioni

Ci aspettiamo di validare il potenziale dei cavalli di Troia basati sulla pseudopalina come strumento per aumentare l'efficacia degli antibiotici in uso per il trattamento delle infezioni polmonari causate da *P. aeruginosa*.

Using a Virtual Screening approach to find new drugs against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*

Individuare nuovi farmaci contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* mediante l'approccio di screening virtuale



Silvia Buroni (3rd from the right) and her research group

Silvia Buroni¹, Antonio Coluccia²

¹ Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Italy - ² Department of Chemistry and Technology of Drug, University of Rome Tor Vergata, Italy

(FFC#6/2023, new)

Background and rationale

Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus* multidrug resistant (MDR) infections still represent a main threat for people with cystic fibrosis (pwCF), rendering the development of new antibiotics urgently needed. Virtual Screening (VS) is a fast and cheap method for the selection of small molecules predicted to be effective in the inhibition of the selected enzymes. A crucial advantage of VS is the possibility to include in the filter rules some descriptors to evaluate drug-like and toxicological properties of the compounds. This greatly speeds up the identification of a new hit, its development, and expands the chances of getting a compound in clinical testing.

Hypothesis and objectives

To promote innovative treatment and care for CF, we propose to apply the VS approach to identify bactericidal molecules with a mechanism of action different from the one of antibiotics in clinical use, i.e. targeting proteins involved in cell division (*FtsZ* and the complex *FtsZ-SulA*).

Essential methods

After selecting a short number of molecules, a biological evaluation will be performed, saving time and costs to research. Enzymatic assays and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) tests will be performed to identify antimicrobial compounds targeting *FtsZ*. Then, cytotoxicity studies will be carried out on human cells. The compounds endowed with promising biological activity will be optimized in terms of potency and safety. Also in this step we will take great advantage of the application of computer aided methods speeding up the process. The optimization of compounds will be repeated until satisfactory results will be achieved. The compound showing the best properties *in vitro* will be tested *in vivo*, first in the wax moth *Galleria mellonella*, and finally in a mouse model of *P. aeruginosa* and *S. aureus* acute and chronic infections.

Preliminary results

Using the VS, we already identified a compound able to inhibit *S. aureus FtsZ* polymerization and with a good MIC against *S. aureus* growth. We also showed that the compound is not cytotoxic.

Conclusions

Our final goal is to identify new molecules that might become new therapeutic solutions against the two MDR pathogens that mostly affect pwCF, with a new mechanism of action with respect to currently used drugs, which will improve the lifetime and the quality of life of pwCF.

Razionale dello studio

Le infezioni provocate da *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* multiresistenti rappresentano ancora una delle principali minacce per le persone con fibrosi cistica (FC), rendendo urgente lo sviluppo di nuovi antibiotici. Il Virtual Screening (VS) è un metodo rapido ed economico per la selezione di piccole molecole efficaci nell'inibizione di enzimi selezionati. Un vantaggio cruciale del VS è la possibilità di includere filtri per valutare le proprietà farmacologiche e tossicologiche dei composti. Ciò accelera notevolmente l'identificazione, lo sviluppo e aumenta le possibilità di ottenere un composto che possa entrare in trial clinico.

Ipotesi e obiettivi

Per promuovere trattamenti e cure innovative per la FC, proponiamo di applicare l'approccio del VS per identificare molecole battericide con un meccanismo d'azione diverso da quello degli antibiotici in uso clinico, cioè che abbiano come bersaglio le proteine coinvolte nella divisione cellulare (*FtsZ* e il complesso *FtsZ-SulA*).

Metodi

Dopo aver selezionato un piccolo numero di molecole, verrà eseguita una valutazione biologica, risparmiando tempo e costi per la ricerca. Verranno effettuati test enzimatici e valutazione della minima concentrazione inibente (MIC) per identificare composti antimicrobici contro *FtsZ*. Successivamente verranno condotti studi di citotossicità su cellule umane. I composti dotati di attività biologica promettente saranno ottimizzati. Anche in questa fase useremo metodi informatici per velocizzare il processo. L'ottimizzazione dei composti verrà ripetuta fino al raggiungimento di risultati soddisfacenti. Il composto che mostrerà le migliori proprietà *in vitro* sarà testato *in vivo*, prima usando la tarma della cera *Galleria mellonella*, e infine in un modello di topo di infezioni acute e croniche da *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Risultati preliminari

Usando il VS, abbiamo già identificato un composto in grado di inibire la polimerizzazione *FtsZ* di *S. aureus* e con una buona MIC contro la crescita del batterio. Abbiamo anche dimostrato che il composto non è citotossico.

Conclusioni

Il nostro obiettivo finale è identificare nuove molecole che potrebbero diventare nuove soluzioni terapeutiche contro i due patogeni multiresistenti che colpiscono maggiormente le persone con FC, con un nuovo meccanismo d'azione rispetto ai farmaci attualmente usati, che miglioreranno la durata e la qualità della vita delle persone con FC.

Drug repurposing to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* adaptation to the CF lung environment

Riposizionamento di farmaci per inibire l'adattamento di *Pseudomonas aeruginosa* all'ambiente polmonare nelle persone con fibrosi cistica



From left to right: Marta Mellini, Livia Leon, Giordano Rampioni, Francesco Imperi, Claudia Ridolfi

28

Giordano Rampioni

Department of Science, University Roma Tre, Italy
(FFC#10/2023, new)

Background and rationale

In the cystic fibrosis (CF) lung, *Pseudomonas aeruginosa* grows to high densities within airway sputum, which serves as the nutritional source during infection. High-throughput genetic approaches revealed that essential genes in the CF sputum exceed those required for *P. aeruginosa* growth in standard laboratory media. Moreover, the formation of *P. aeruginosa* antibiotic-resistant biofilms and the production of key virulence factors are controlled by signaling systems that integrate environmental and metabolic stimuli. Hence, specific molecular pathways are involved in growth, biofilm formation and pathogenicity in the CF sputum.

Hypothesis and objectives

Molecules specifically inhibiting growth, biofilm formation and/or expression of virulence factors in a medium mimicking the CF sputum have the potential to reduce *P. aeruginosa* load and pathogenicity in the CF lung. On this basis, the objective of this project is to identify such inhibitors by screening a library of drugs already approved for their use in humans in the synthetic CF sputum medium SCFM.

Essential methods

Ad hoc engineered *P. aeruginosa*-based biosensor strains will be used to set-up a screening system allowing the identification of drugs specifically inhibiting growth or signaling systems controlling biofilm formation and/or virulence in SCFM. To this aim, a library of > 3000 FDA-approved and pharmacopeial drugs will be used. Based on their activity, selected hits will be preliminarily characterized by using standard assays (e.g. MIC, MBC, biofilm formation, secretion of virulence factors), both in the reference strain PAO1 and in 10 *P. aeruginosa* multidrug-resistant CF isolates.

Preliminary results

The research group has successfully applied drug-repurposing approaches to identify new anti-virulence agents and colistin adjuvants. Moreover, the PI has already developed the biosensor strains useful for the identification of anti-biofilm and anti-virulence compounds.

Conclusions

This pilot study will allow identifying molecules with favorable pharmacological properties that decrease the ability of *P. aeruginosa* to grow and persist in the CF lung. The output of this project will lay the foundation for the development of new therapeutic treatments beneficial for people with CF with intermittent and chronic *P. aeruginosa* lung infection.

Razionale dello studio

Nei polmoni delle persone con fibrosi cistica (FC) *Pseudomonas aeruginosa* usa l'espettorato come fonte di nutrienti per la crescita. Diversi studi hanno dimostrato che i) alcuni geni sono essenziali per la crescita di *P. aeruginosa* nell'espettorato FC ma non nei terreni standard di laboratorio; ii) la formazione di biofilm resistenti agli antibiotici e la produzione di fattori di virulenza in *P. aeruginosa* sono regolati da stimoli ambientali e metabolici. Pertanto, la crescita, la formazione di biofilm e la patogenicità di *P. aeruginosa* nel polmone FC sono dipendenti da specifici pathway molecolari.

Ipotesi e obiettivi

Molecole in grado di inibire le pathway molecolari necessarie per la crescita, la formazione di biofilm e/o l'espressione di fattori di virulenza in un mezzo di crescita che mima l'espettorato FC, come il terreno SCFM, hanno il potenziale di ridurre la patogenicità di *P. aeruginosa* nel polmone FC. L'obiettivo di questo progetto è identificare tali inibitori. A tal fine, una libreria di farmaci già approvati per uso nell'uomo verrà testata su biosensori di *P. aeruginosa* cresciuti nel terreno SCFM.

Metodi

Ceppi biosensori di *P. aeruginosa* verranno usati per mettere a punto un sistema di screening che consenta l'identificazione di farmaci in grado di inibire in modo specifico la crescita o i sistemi di segnalazione che controllano la formazione di biofilm e/o la virulenza nel terreno SCFM. A tal fine verrà usata una libreria di oltre 3000 farmaci. In base alla loro attività, molecole selezionate durante lo screening saranno caratterizzate in dettaglio usando saggi standard (es. MIC, MBC, formazione di biofilm, secrezione di fattori di virulenza), sia nel ceppo di riferimento PAO1 che in isolati polmonari FC multiresistenti di *P. aeruginosa*.

Risultati preliminari

Il gruppo di ricerca ha già impiegato con successo approcci di riposizionamento di farmaci per l'identificazione di nuovi agenti anti-virulenza e adiuventi della colistina. Inoltre, il PI ha già sviluppato i biosensori che verranno impiegati per identificare i nuovi farmaci anti-biofilm e anti-virulenza.

Conclusioni

Questo studio consentirà di identificare molecole con proprietà farmacologiche favorevoli in grado di ridurre la capacità di *P. aeruginosa* di crescere e persistere nel polmone FC, gettando le basi per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per il trattamento di infezioni polmonari intermittenenti e croniche.

Evaluation of cefiderocol activity against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections

Valutazione del potenziale dell'antibiotico cefiderocol su *Pseudomonas aeruginosa* per il trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica



Barbara Citterio (top left picture, 2nd from the left) and her collaborators

29

Gianmarco Mangiaterra¹, Giuseppe Piccioni¹, Massimiliano Lucidi², Giulia Capecchi², Carla Vignaroli³, Natalia Cirilli³, Alessandra Bragonzi⁵, Barbara Citterio¹

¹ Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, Urbino, Italy - ² Department of Science, Microbiology Unit, University of RomaTre, Italy - ³ Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy - ⁴ University Hospital of Marche, Cystic Fibrosis Centre, Ancona, Italy - ⁵ Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

(FFC#7/2023, new)

Background and rationale

*Cystic fibrosis (CF) lung infections by *Pseudomonas aeruginosa* are extremely difficult to treat and eradicate, mainly due to the development of biofilm and persistent cells, including the so-called viable but non-cultivable (VBNC) forms. The novel antibiotic cefiderocol (CFD) exploits the bacterial iron uptake systems to enter the cell and achieve a higher bactericidal effect compared to other adopted drugs. However, its activity on *P. aeruginosa* persistent and VBNC cells is still unknown.*

Hypothesis and objectives

*To fill this gap of knowledge, this project's aims are: i) investigating the *P. aeruginosa* resistance to CFD in both planktonic and sessile cultures; ii) assessing the induction of persistent and VBNC *P. aeruginosa* cells in *in vitro* iron-starved and CFD-exposed biofilms; iii) validating the results obtained *in vitro* in a preclinical mouse model of chronic infection.*

Essential methods

*The *P. aeruginosa* susceptibility to CFD will be tested against laboratory and clinical isolates, in planktonic and sessile cultures. The development of persistent and VBNC cells will be investigated in *in vitro* biofilm models, challenged with bactericidal CFD concentrations and then maintained in the presence of sublethal doses. Culturable and VBNC persisters will be detected by culture and qPCR, respectively, estimating the amount of the VBNC as the difference between molecular and cultural bacterial counts. The obtained results will be validated by confocal microscopy in flow-cell biofilms, using specific dyes to reveal the bacterial metabolic activity. Then, a mouse model of *P. aeruginosa* infection will be treated with CFD, focusing on the infection eradication and/or on the persisters insurgence.*

Preliminary results

*As first step, iron-depleted cation adjusted Mueller Hinton and M9 minimal medium have been selected as proper media for the experimental setting, since both containing a limited iron amount, a stress condition required for CFD activity. *P. aeruginosa* biofilm formation in these media has been preliminary evaluated as well.*

Conclusions

*The results obtained in this project will provide: i) an evaluation of *P. aeruginosa* resistance to CFD and evidence of the drug contribution to the induction of culturable persisters and VBNC cells; ii) an efficacy study of CFD in the preclinical mouse model of *P. aeruginosa* chronic infection and of the bacterial population dynamics in response to the antibiotic.*

Razionale dello studio

L'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica (FC) risulta estremamente difficile da trattare/eradicare a causa dello sviluppo di biofilm e di forme batteriche persistenti, incluse le forme vitali ma non coltivabili (VBNC). Il nuovo farmaco cefiderocol (CFD) sfrutta i sistemi batterici di acquisizione del ferro per penetrare la cellula e ottenere un'efficacia maggiore rispetto ad altri antibiotici noti. Tuttavia, la sua efficacia contro le cellule persistenti non è stata testata.

Ipotesi e obiettivi

Per caratterizzare l'azione del CFD contro le cellule persistenti di *P. aeruginosa*, il presente progetto mira a: i) valutare la resistenza e la persistenza di *P. aeruginosa* al CFD, sia nello stato planctonico sia in biofilm; ii) verificare l'induzione di cellule persistenti e VBNC in biofilm di *P. aeruginosa* esposti al CFD in condizioni di carenza di ferro; iii) validare i risultati ottenuti *in vitro* in un modello preclinico di infezione cronica.

Metodi

La resistenza di *P. aeruginosa* al CFD sarà valutata in colture planctoniche e biofilm di ceppi di laboratorio e isolati clinici. Le cellule persistenti e VBNC del patogeno verranno indotte in biofilm *in vitro*, esposti a diverse concentrazioni di CFD, e rilevate tramite saggi culturali e di qPCR. La quota di forme VBNC, in particolare, verrà stimata come differenza tra conte batteriche molecolari e culturali. Tali risultati saranno validati dall'analisi in microscopia confocale, tramite protocolli in grado di rilevare l'attività metabolica batterica. Infine, l'attività del CFD nell'eradicare l'infezione da *P. aeruginosa* e nel contrastare lo sviluppo di persistenza sarà testata in un modello di topo di infezione cronica.

Risultati preliminari

Il terreno Mueller Hinton II, impoverito di ferro, e il terreno minimo M9 sono stati selezionati come mezzi di coltura idonei per saggiare l'attività del CFD, in quanto entrambi presentano bassi livelli del metallo e costituiscono un fattore di stress per il patogeno. L'abilità di *P. aeruginosa* di formare biofilm in questi terreni è stata esaminata in saggi preliminari.

Conclusioni

I risultati del progetto permetteranno di: i) valutare l'attuale diffusione della resistenza al CFD in *P. aeruginosa*; ii) investigare il ruolo dell'antibiotico nell'induzione di forme persistenti e VBNC del patogeno; iii) esaminare l'efficacia del CFD e monitorare le dinamiche di popolazione batterica *in vivo* tramite il modello di infezione cronica.

Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting: a translational research

Ruolo delle forme batteriche vitali ma non coltivabili (VBNC) nei pazienti con fibrosi cistica dal punto di vista clinico



30

Natalia Cirilli (top-left, 2nd from the right) and her collaborators

Natalia Cirilli¹, Gianmarco Mangiterra^{2,3}, Valentina Schiavoni², Valentina Tagliabuaci¹, Rosaria Gesuita⁴, Silvana Balzani⁴, Luca Tiano², Benedetta Fabrizzi¹, Anastasia D'Antuono¹, Arianna Peruzzi¹, Nicholas Cedraro², Flavia Carle⁴, Marco Moretti⁵, Luigi Ferrante⁴, Edlira Skrami⁴, Carla Vignaroli², Francesca Biavasco²

¹ Cystic Fibrosis Centre, Department of Gastroenterology and Transplantation, United Hospitals, Ancona, Italy ² Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy

³ Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, Urbino, Italy - ⁴ Center of Epidemiology, Biostatistics and Medical Information Technology, Department of Biomedical Sciences and Public Health, Marche Polytechnic University, Ancona, Italy - ⁵ Clinical Laboratory United Hospitals, Ancona (FFC#22/2020, concluded)

Background and rationale

Chronic lung infections in people with cystic fibrosis patients (pwCF) are characterized by periods of stability interspersed by pulmonary exacerbations. Not all pwCF with a documented chronic lung infection show the same bacteria in the sputum in a long term follow up. Culture-independent community profiling of the CF lung bacterial population resulted more reliable than culture, also highlighting the occurrence of quiescent cells, including the so-called viable but non-cultivable (VBNC) forms.

Hypothesis and objectives

This project aims: i) to investigate the presence of VBNC forms in sputum samples of pwCF with chronic lung infection; ii) to investigate clinical features of pwCF with chronic lung infection; iii) to match the clinical outcomes with the presence of VBNC forms; iv) to estimate the time to reactivation of VBNC forms.

Essential methods

*Sputum samples (SS) collected at routine visits from pwCF have been analysed using both culture and species-specific qPCR to detect *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Achromobacter xylosoxidans* (AX), *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), methicillin sensitive (MSSA) and resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus*, evidencing VBNC forms as discrepancy between molecular and cultural counts.*

Results

Among the 102 pwCF enrolled, 94 people completed the study and a total of 407 SS were collected. PA and MSSA resulted statistically more prone (MSSA, p<0.05) to develop VBNC cells over time, as shown in the table.

Visit	n	PA	AX
		% (95%CI)	% (95%CI)
Visit 1	94	30.9 (21.5-41.3)	7.4 (3.3-15.3)
Visit 2	94	33 (23.83-43.5)	5.3 (1.97-12.3)
Visit 3	94	27.7 (19.2-38.0)	5.3 (1.97-12.3)
Visit 4	93	22.6 (14.8-32.7)	3.2 (0.8-9.8)
p		0.206	0.285
		SM	MSSA
Visit 1	94	3.2 (0.8-9.7)	27.7 (19.2-38)
Visit 2	94	4.3 (1.4-11.2)	29.8 (21-40.2)
Visit 3	94	6.4 (2.6-13.9)	47.9 (37.6-58.4)
Visit 4	93	7.5 (3.3-15.4)	47.3 (37-57.9)
p		0.201	0.003
		MRSA	At least 1 VBNC
Visit 1	94	8.5 (4.0-16.6)	58.5 (47.9-68.4)
Visit 2	94	12.8 (7.1-21.6)	60.6 (50.0-70.4)
Visit 3	94	14.9 (8.7-24.1)	68.1 (57.6-77.1)
Visit 4	93	11.8 (6.3-20.6)	65.6 (54.9-74.9)
p		0.478	0.258

Only for PA a significant correlation ($p<0.001$) between chronic infection and VBNC cells presence was evidenced.

PwCF tested positive for VBNC cells showed significantly lower FEV1 values and a greater promptness to develop pulmonary exacerbations ($p<0.05$) compared to VBNC-free subjects. No correlations with other clinical features (e.g. antibiotic therapy, nutritional status or comorbidities) were evidenced. Treatment with CFTR modulators seemed to ameliorate FEV1 values in the treated pwCF, either presenting or not VBNC cells, although not in a significant manner.

Conclusions

The results of this pilot study highlight the urgent need to implement the routine cultural methods with more reliable culture-independent assays to efficiently detect all the viable bacterial populations in the CF lungs and to evaluate the efficacy of the routinely adopted antibiotic treatments. Moreover, our results confirm that patients with chronic or intermittent infection do not eradicate the bacteria; further studies are needed to clearly establish the effect of modulators on lung bacteria clearance.

Razionale dello studio

Le infezioni polmonari croniche nelle persone con fibrosi cistica (pFC) sono caratterizzate da esacerbazioni polmonari ricorrenti. La comunità batterica caratterizzante questi pazienti risulta molto variabile in un follow-up a lungo termine, come evidenziato tramite tecniche di analisi indipendenti dalla coltura batterica, più affidabili rispetto alla diagnosi colturale di routine. Tali saggi hanno, inoltre, rilevato la presenza delle cosiddette cellule vitali ma non coltivabili (VBNC).

Ipotesi e obiettivi

Gli obiettivi del progetto risultano: i) indagare la presenza di forme VBNC in campioni di espettorato delle pFC con infezione cronica; ii) indagare le caratteristiche cliniche di tali pwFC; iii) analizzare l'associazione tra esiti clinici e risultati del test per le forme VBNC; iv) stimare i tempi di riattivazione delle cellule VBNC.

Metodi

I campioni di espettorato delle persone arruolate sono stati analizzati sia con saggi culturali sia con qPCR specie-specifiche per la presenza di forme VBNC di *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Achromobacter xylosoxidans* (AX), *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), *Staphylococcus aureus* meticillino sensibile (MSSA) e resistente (MRSA), stimando tali forme come la differenza tra conte molecolari e culturali.

Risultati

Delle 102 pFC arruolate, 94 hanno completato lo studio, per un totale di 407 campioni di sputo analizzati. PA e MSSA sono risultati i batteri più inclini a sviluppare varianti VBNC (MSSA, $p<0.05$), il primo evidenziando, inoltre, una correlazione significativa ($p<0.001$) con lo stato infettivo cronico. Le persone con FC con VBNC hanno mostrato valori di FEV1 significativamente inferiori e una maggiore predisposizione ad episodi di esacerbazione polmonare ($p<0.05$) rispetto a pazienti liberi da VBNC. Non sono state evidenziate correlazioni con altre caratteristiche cliniche (e.g. terapia antibiotica, stato nutrizionale o comorbilità). Il trattamento con i modulatori del CFTR sembra esercitare un effetto positivo sui valori di FEV1 a dispetto della presenza di cellule VBNC, sebbene tale associazione sia risultata inconsistente.

Conclusioni

I risultati di questo studio pilota evidenziano: i) l'urgenza di implementare la diagnosi microbiologica colturale con tecniche non-culturali, per un monitoraggio efficiente della colonizzazione del polmone FC e dell'efficacia dei trattamenti antibiotici di routine; ii) la mancata eradicazione batterica nelle pFC con infezione cronica o intermittente; iii) la necessità di ulteriori studi sull'effetto dei modulatori CFTR nell'eradicazione dell'infezione stessa.

SESSION 8

New strategies against bugs and molds

Genomic and phenotypic characterization of *Mycobacterium abscessus* and detection of host biomarkers to define Mycobacterial infection in cystic fibrosis

Identificazione dei tipi di *Mycobacterium abscessus* presenti in Italia e dei biomarcatori dell'ospite per caratterizzare l'infezione da micobatteri in fibrosi cistica



Nicola Ivan Lorè (on the left) and his collaborators

31

Lisa Cariani¹, Francesca Nicola², Kiarash Moghaddasi², Federico Di Marco², Stefano de Pretis³, Beatrice Silvia Orena¹, Fabio Saliu², Andrea Gramegna⁴, Valeria Daccò⁵, Flavio Favari⁶, Catania M.⁷, Cristina Russo⁸, Valeria Ghisetti⁹, Francesco Blasi³, Daniela Maria Cirillo², Nicola Ivan Lorè²

¹ Cystic Fibrosis Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. - ² Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ³ Center for Omics Sciences, IRCCS San Raffaele Institute, Milan, Italy - ⁴ Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - ⁵ Pediatrics - Gastroenterology, hepatology, pediatric transplantation and Cystic Fibrosis, Mother and Child Department, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - ⁶ UOC Microbiology and Virology Unit, Department of Pathology, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy - ⁷ Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Italy - ⁸ UOC Unit of Microbiology and Diagnostic Immunology, Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy - ⁹ Microbiology and Virology, ASL Città di Torino, Italy

(FFC#7/2022, ongoing)

Background and rationale	<p><i>Nontuberculous Mycobacteria (NTM) are recently rising up as emerging pathogens among people with cystic fibrosis (pwCF). Mycobacterium abscessus complex (MA) are the dominant NTM species in the CF European community. PwCF colonized by MA display heterogeneous clinical outcomes, ranging from asymptomatic colonization to progressive lung function decline and damage, a condition known as MA Pulmonary Disease (MA-PD). Recent multicenter studies, exploiting whole genome sequencing (WGS) analysis of MA isolates, have reported the presence of Dominant Circulating Clones (DCCs) of MA in pwCF.</i></p>
Hypothesis and objectives	<p><i>To date, the intrinsic pathogenic potential of different MA DCCs, belonging to Italian pwCF with different clinical outcomes, remains to be elucidated. Moreover, the development of new reliable biomarkers is urgently required to better define disease stages and to limit the cost of intensive therapeutic regimen to contrast MA-PD. The hypothesis guiding this proposal are that i) the distribution of Italian DCCs can be characterized and that ii) molecular signatures associated with MA-PD disease can be identified.</i></p>
Essential methods	<p><i>i) A retrospective/prospective observational study was set up collecting MA strains from infected patients at different stages of MA-PD. ii) We are using biological samples from pwCF at different risk of MA pulmonary disease in order to determine novel biomarker of MA-PD by new genomic technology approach called "Single Cells RNA sequencing" (exploiting data obtained from our previous FFC#23/2020 project).</i></p>
Preliminary results	<p><i>We are collecting MA strains and related data among different CF centers that currently detect MA strains in Italy. Currently, we collected over thirty MA strains and twenty four strains were characterized phenotypically and genotypically by WGS. We found common Dominant Circulating Clones and bacterial genomic mutations in MA strains from different CF centers. Antimicrobial resistance profiles and the association with clinical data is still under progress. The second aim is still ongoing. To date, the hospital ethics committee was approved to increase the number of samples, and we are collecting blood samples from the designed cohort of pwCF.</i></p>
Conclusions	<p><i>Our project is i) determining current distribution of MA DCCs, belonging to Italian pwCF with different clinical outcomes, and ii) validating novel biomarkers to improve the decision-making processes associated with NTM infection in pwCF.</i></p>
Razionale dello studio	I Micobatteri Non Tuberculari (MNT) appartenenti al <i>Mycobacterium abscessus</i> complex (MA), risultano essere tra le specie MNT dominanti nella popolazione con fibrosi cistica (FC) europea. Le persone con FC colonizzate da MA sono clinicamente eterogenee: possono avere una colonizzazione asintomatica o una progressiva e grave disfunzione polmonare nota come MA-PD. Inoltre, un recente studio multicentrico inglese ha sfruttato l'analisi del sequenziamento dell'intero genoma (WGS) degli isolati di MA per determinare la presenza di Cloni Circolanti Dominanti (DCC) nelle persone con FC.
Ipotesi e obiettivi	A oggi resta da chiarire il potenziale patogeno di diversi DCC di MA nelle persone con FC italiane che presentano differenti quadri clinici. È evidente come la difficoltà di diagnosi e le limitate opzioni terapeutiche disponibili rendano necessario lo sviluppo di nuovi marcatori biologici utili a definire le diverse fasi della malattia polmonare da MA. Le ipotesi alla base di questo progetto sono che i) si possa caratterizzare la distribuzione dei DCC italiani e ii) si possano associare specifici profili infiammatori al rischio di malattia da MA.
Metodi	i) Stiamo avviando uno studio osservazionale retrospettivo/prospettico raccogliendo ceppi MA da persone con FC infette a diversi stadi di infezione da MA. ii) Stiamo usando campioni biologici di persone con FC a diverso rischio di malattia polmonare da MA al fine di determinare nuovi biomarcatori mediante il sequenziamento di RNA a cellule singole (ampliando i risultati ottenuti dal progetto FFC#23/2020).
Risultati preliminari	Attualmente, abbiamo raccolto oltre trenta ceppi MA tra i diversi centri FC che attualmente rilevano i ceppi MA in Italia. Venticinque sono stati caratterizzati a livello genomico e fenotipico. Abbiamo scoperto DCC comuni e mutazioni genomiche batteriche in ceppi MA provenienti da diversi centri FC. I profili di resistenza antimicrobica e l'associazione con i dati clinici sono ancora in fase di sviluppo. Il secondo obiettivo è ancora in corso. A oggi, il comitato etico dell'ospedale ha approvato l'aumento del numero di campioni e stiamo raccogliendo campioni di sangue dalla coorte progettata di persone con fibrosi cistica.
Conclusioni	Il nostro progetto mira a i) determinare l'attuale distribuzione delle MA DCC, appartenenti a persone italiane con FC, con diversi esiti clinici, e ii) validare nuovi biomarcatori per migliorare i processi decisionali associati all'infezione da MNT nelle persone con FC.

Resolving Mycobacterium abscessus infections with a phages-inspired therapy

Risoluzione delle infezioni da *Mycobacterium abscessus* con una terapia ispirata ai fagi



Picture on the left: Loris Rizzello (on the left) with his collaborators. Picture on the right: Giulia Degiacomi (in the middle) with her collaborators

Loris Rizzello¹, Giulia Degiacomi²

¹ National Institute of Molecular Genetics, Milan, Italy

² Department of Biology and Biotechnology "Lazzaro Spallanzani", University of Pavia, Italy

(FFC#11/2023, new)

Background and rationale

The CFTR chloride channel dysfunction of people with cystic fibrosis (pwCF) causes production and secretion of sticky mucus, facilitating the colonization by opportunistic pathogens, such as Non-tuberculous Mycobacteria (NTM). *Mycobacterium abscessus* (Mab)-infected pwCF are excluded from lung transplants, since Mab requires a multi-drug regimen that can last up to 2 years, with only 30% of success. There are no current specific drugs to treat these infections, and the recommended regimens generally lack efficacy.

Hypothesis and objectives

The proposal aims to address the lack of effective therapeutic solutions for Mab infections in pwCF, by an innovative Abs-based therapeutic strategy. We will exploit a class of protein present in the viral mycobacteriophages capsid, the endolysin (or lysis). The therapy will be a fusion antibody (Abs), where the variable part will be replaced with the binding domain sequence of the lysins. The Abs will instruct host cells to eliminate the Mab and to present the bacterial antigens for a T-cell mediated neutralization. These Abs will be loaded within polymeric nanoparticles and delivered only within macrophages infected by Mab.

Essential methods

The Abs will be produced by transfecting the plasmid codifying for the sequence in 293T cells and the amino acid sequence will be assessed by MS/MS mass spectrometry analyses. The efficacy of the therapy will be assessed by quantifying the intracellular Mab CFUs, and by fluorescence quantification (confocal microscopy) using tdTomato-expressing Mab. Finally, we will use polymeric nanoparticles to introduce the fusion Abs within Mab-infected human alveolar macrophages.

Preliminary results

We have already produced the mycobacteriophages endolysin (from Ms6) and created 4 different mutants to assess any change in binding efficacy against Mab. All mutants (and wild-type) have been linked to GFP and a binding assay has been performed after 90 and 180 minutes. The quantification of the GFP/tdTomato fluorescence ratio confirmed that all the mutants displayed strong affinity towards Mab, which corroborates the potential of creating the fusion Abs.

Conclusions

At the end of the project, we will have created a therapy for Mab which is ready for pre-clinical investigations with relevant *in vivo* models of Mab infections. An active collaboration with San Raffaele Hospital is on-going to access such models of Mab infections.

Razionale dello studio

La disfunzione del canale CFTR provoca la produzione e la secrezione di muco appiccicoso, che facilita la colonizzazione da parte di patogeni opportunisti come i Micobatteri Non Tuberculari (MNT). Le persone con fibrosi cistica (FC) infettate da *Mycobacterium abscessus* (Mab) sono perfino escluse dalle liste di trapianto polmonare. Al momento non esistono farmaci specifici per il trattamento di queste infezioni e i regimi raccomandati generalmente mancano di efficacia.

Ipotesi e obiettivi

Il progetto mira a trovare soluzioni terapeutiche efficaci per le infezioni da Mab nelle persone con fibrosi cistica, mediante un'innovativa strategia basata sugli anticorpi di fusione (Abs). Sfrutteremo l'elevata selettività di una classe di proteine presenti nel capsid dei micobatteriofagi, l'endololisina (o lisina). La terapia sarà un anticorpo di fusione, dove la parte variabile sarà sostituita con la sequenza del dominio legante delle lisine. Gli Abs istruiranno le cellule ospiti a eliminare i Mab e a presentare gli antigeni batterici per una neutralizzazione mediata dalle cellule T.

Metodi

Gli Abs saranno prodotti trasfettando il plasmide che codifica per la sequenza in cellule 293T e la sequenza di amminoacidi sarà valutata mediante analisi di spettrometria di massa MS/MS. L'efficacia della terapia sarà valutata quantificando le CFUs di Mab intracellulari e mediante quantificazione in fluorescenza (microscopia confocale) usando Mab che esprimono tdTomatoe. Infine, useremo nanoparticelle polimeriche per introdurre gli Abs di fusione all'interno dei macrofagi alveolari umani infettati da Mab.

Risultati preliminari

Il terreno Mueller Hinton II, impoverito di ferro, e il terreno minimo M9 sono stati selezionati come mezzi di coltura idonei per saggiare l'attività del CFD, in quanto entrambi presentano bassi livelli del metallo e costituiscono un fattore di stress per il patogeno. L'abilità di *P. aeruginosa* di formare biofilm in questi terreni è stata esaminata in saggi preliminari.

Conclusioni

Ci proponiamo di creare una terapia per Mab pronta per le indagini precliniche con rilevanti modelli *in vivo* di infezioni da Mab. È in corso una collaborazione attiva con l'Ospedale San Raffaele per accedere a tali modelli di infezioni da Mab.

Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application

Valutazione delle interazioni tra i batterofagi e il sistema immunitario dell'ospite in modelli di fibrosi cistica: un passo verso l'applicazione della terapia fagica



Anna Pistocchi (2nd from the right) and her collaborators

33

Marco Cafora¹, Francesca Forti², Nicoletta Loberto¹, Dorina Dobi¹, Rosaria Bassi¹, Massimo Aureli¹, Federica Briani², Anna Pistocchi¹

¹ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy

² Department of Biosciences, University of Milan, Italy
(FFC#12/2022, ongoing)

Background and rationale

The rise of multiple drug-resistant (MDR) bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) complicates the treatment of people with cystic fibrosis (pwCF). Recently, phage therapy has been explored as a potential alternative tool for pwCF, however, there are aspects that deserve to be further studied to make phage therapy a realistic therapeutic option.

Hypothesis and objectives

Essential methods

These general objectives will be addressed by: i) studying the fate of phages after the injection in WT and CF zebrafish embryos and incubation with WT or CF human cell lines representative of airway epithelium or innate immune system; ii) isolating and purifying proteins from DEV, the most promising among the phages composing a four-phage cocktail (CK4), and test which one exerts anti-inflammatory effects in the above-mentioned in vivo and in vitro models; iii) dissecting the molecular mechanisms through which CK4 modulate host immune system in WT and CF zebrafish embryos recapitulating the human innate immunity.

Preliminary results

We demonstrated that our DEV phages are internalized by CuFi-1 cells. Moreover, by selectively tracing neutrophils and macrophages populations in WT and CF zebrafish embryos, we demonstrated that our CK4 elicit anti-inflammatory effects by reducing the migration of neutrophils but not macrophages. In addition, we demonstrated that CK4 regulates resident macrophages that, in turn, govern neutrophil recruitment.

Conclusions

The discovery of mechanisms involved in phage/host immune system interaction in normal and pathological conditions will be relevant for the CF community. Indeed, clinical trials to assess the safety and tolerability of an inhaled phage cocktail in patients with chronic Pa infections have been started. This proposal aims to clarify unsolved issues of phage therapy that cannot be addressed in patients, with the final goal to make it a reliable and safe therapeutic option.

Razionale dello studio

L'aumento dei batteri resistenti ai farmaci, tra cui *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), complica il trattamento delle persone con fibrosi cistica (FC). Recentemente, la fagoterapia è stata esplorata come potenziale strumento alternativo per questi pazienti. Tuttavia, ci sono aspetti che meritano di essere approfonditi per rendere la terapia fagica un'opzione terapeutica realistica.

Ipotesi e obiettivi

Questo progetto mira a indagare alcune delle questioni ancora aperte della terapia fagica, e cosa succede quando i fagi entrano in contatto con le cellule eucariotiche in modelli wild-type (WT) e FC.

Metodi

Questi obiettivi saranno affrontati attraverso i) lo studio del destino dei fagi dopo l'iniezione in embrioni di zebrafish WT e FC o dopo la loro incubazione con linee epiteliali bronchiali umane o cellule del sistema immunitario WT o FC; ii) isolare e purificare alcune proteine strutturali di DEV, il più promettente tra i fagi che compongono il nostro cocktail (CK4) per testare se e quali esercitano effetti antinfiammatori; iii) analizzare i meccanismi molecolari attraverso i quali il CK4 modula il sistema immunitario dell'ospite in embrioni di zebrafish WT e FC che ricapitolano l'immunità innata umana.

Risultati preliminari

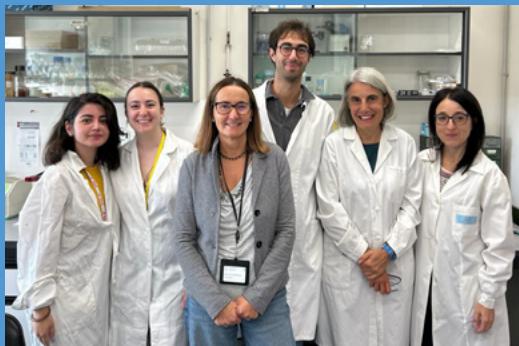
In studi precedenti, abbiamo dimostrato che il nostro fago DEV è in grado di legarsi alle cellule CuFi-1 e che viene internalizzato. Inoltre, tracciando selettivamente le popolazioni di neutrofili e macrofagi in embrioni di zebrafish WT e FC, abbiamo dimostrato che il nostro CK4 è in grado di trattare le infezioni da Pa in embrioni di zebrafish WT e FC. Inoltre, abbiamo dimostrato che i fagi hanno prodotto effetti antinfiammatori riducendo la migrazione dei neutrofili, ma non quella dei macrofagi.

Conclusioni

La scoperta dei meccanismi coinvolti nell'interazione tra fagi e sistema immunitario dell'ospite in condizioni normali e patologiche sarà importante per la comunità FC. Infatti, sono stati avviati studi clinici per valutare la sicurezza e la tollerabilità di un cocktail di fagi per via inalatoria in persone con infezioni croniche da Pa. Questa proposta mira a chiarire le questioni irrisolte della terapia fagica che non possono essere affrontate nei pazienti, con l'obiettivo finale di renderla un'opzione terapeutica affidabile e sicura.

Facing resistance to therapeutic phages observed in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from people with cystic fibrosis

Affrontare la resistenza alla terapia fagica di batteri *Pseudomonas aeruginosa* isolati da persone con fibrosi cistica



Federica Briani (in the middle) with her collaborators

Francesca Forti¹, Anna Pistocchi², Marco Cafora², Lisa Cariani³, Federica Briani¹

¹ Department of Biosciences, University of Milan, Italy

² Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy

³ Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

(FFC#16/2023, new)

Background and rationale

This project is part of a research line with the goal of making phage therapy a practicable option to cure the *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) pulmonary infection in people with cystic fibrosis (pwCF). Since phages are extremely specific for their bacterial hosts, phage therapy requires a personalized approach, tailored to the susceptibility of the infecting bacterial strain to specific phages.

Hypothesis and objectives

All phages that we have collected so far from environmental samples in the frame of previous FFC Ricerca projects may use either LPS or type IV pilus (T4P) as receptors for infection. Heterogeneity of LPS and lack of pili may explain phage-resistance shown by Pa clinical strains. The specific aims of this project are i) to develop a collection of phages able to kill Pa CF isolates resistant to natural phages; and ii) to assess whether Pa infections in patients treated with CFTR modulator drugs could be cured by the same phages/phage cocktails active against isolates from untreated patients or require specific phages/phage cocktails.

Essential methods

We will implement the following activities. i) Characterization of natural phages for their direct use in phage therapy and mutagenesis. Profiling phage susceptibility of Pa strains isolated from pwCF in treatment with modulators. ii) Generation of a collection of mutants of safe natural phages able to infect phage-resistant CF strains. iii) In vitro and in vivo phenotypic analysis of mutant phages.

Preliminary results

We developed a four-phage cocktail (CK4) able to cure Pa infections in different infection models. However, we found that 18 CF isolates out of 49 were partially or completely resistant to CK4 and that a single mutation interfering with LPS biosynthesis conferred CK4-resistance to PAO1 reference strain. We have isolated several new, uncharacterized phages from wastewater that are able to infect both mutants devoid of the O-antigen or lacking the T4P, and thus should use a different receptor.

Conclusions

We will assemble a collection of natural and mutant phages tailored to kill Pa isolates from pwCF treated or not with modulators drugs. Assembling phage collections and phage cocktails specifically designed to kill CF isolates, which may have specific pathoadaptive mutations, will represent a significant step towards introducing phage therapy among the options to cure the Pa infection in pwCF.

Razionale dello studio

Questo progetto fa parte di una linea di ricerca che ha l'obiettivo di rendere la terapia fagica un'opzione praticabile per curare l'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) in persone con fibrosi cistica (FC). Poiché i fagi sono estremamente specifici per i loro ospiti batterici, la terapia fagica richiede un approccio personalizzato.

Ipotesi e obiettivi

I fagi che abbiamo raccolto finora nell'ambito di precedenti progetti FFC Ricerca usano come recettori l'LPS o il pilo di tipo IV (T4P), che però sono eterogenei o assenti in ceppi clinici di Pa da persone con FC (isolati FC). Gli obiettivi specifici di questo progetto sono i) sviluppare una collezione di fagi in grado di uccidere isolati FC resistenti ai fagi naturali; e ii) valutare se le infezioni da Pa in persone con FC trattate con farmaci modulatori di CFTR potrebbero essere curate con gli stessi fagi attivi contro isolati da persone non trattati.

Metodi

Realizzeremo le seguenti attività: i) caratterizzazione di fagi naturali per il loro uso nella terapia fagica e nella mutagenesi. Profilazione della suscettibilità dei fagi dei ceppi di Pa isolati da pazienti in trattamento con modulatori; ii) generazione di una raccolta di mutanti di fagi naturali sicuri in grado di infettare ceppi di fibrosi cistica fago-resistenti; iii) analisi fenotipica *in vitro* e *in vivo* di fagi mutanti.

Risultati preliminari

Abbiamo sviluppato un cocktail di quattro fagi (CK4) in grado di curare le infezioni da Pa in diversi modelli di infezione. Tuttavia, 18 isolati CF su 49 analizzati sono parzialmente o completamente resistenti a CK4. Abbiamo isolato da acque reflue diversi fagi nuovi non ancora caratterizzati che sono in grado di infettare entrambi i mutanti privi dell'antigene O o privi di T4P e che quindi potrebbero usare un diverso recettore.

Conclusioni

Assembleremo una raccolta di fagi naturali e mutanti "su misura" per uccidere gli isolati di Pa da persone con fibrosi cistica in cura o meno con farmaci modulatori. L'assemblaggio di raccolte di fagi appositamente progettati per uccidere gli isolati FC, che possono presentare specifiche mutazioni pato-adattative, rappresenterà un passo significativo verso l'introduzione della terapia fagica tra le opzioni per curare l'infezione da Pa nelle persone con fibrosi cistica.

Inhalable nanoparticles delivering peptidomimetic/antibiotic combinations for local treatment of CF lung infections

Nanoparticelle inalabili per la somministrazione di combinazioni di molecole antimicrobiche nel trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica



Picture on the left: Eugenio Notomista (in the middle) with his collaborators. Picture on the right: Ivana d'Angelo with a collaborator

Eugenio Notomista, Ivana d'Angelo

¹ Department of Biology, University of Naples Federico II, Italy - ² Department of Environmental, Biological and Pharmaceutical Sciences and Technologies, Di.S.T.A.Bi.F., University of Campania "Luigi Vanvitelli", Caserta, Italy

(FFC#8/2023, new)

Background and rationale

Unlike conventional antibiotics, antimicrobial peptides very rarely give rise to resistant strains, unfortunately, sensitivity to proteases limits their usefulness as drugs. A possible solution is to design peptidomimetics resistant to proteases. However, peptides and peptidomimetics are difficult to administer, because their properties (e.g. high molecular weight and adhesiveness) preclude an adequate biodistribution. Direct delivery to lung could be an intriguing solution but it requires the use of inhalable formulations shielding peptidomimetic/lung barrier interaction and allowing good biodistribution and controlled release.

Hypothesis and objectives

We aim to develop inhalable polymeric nanoparticles for lung delivery of the previously designed antimicrobial peptidomimetic P13#1, alone and in combination with colistin or tobramycin, antibiotics widely used in the treatment of lung infection. The optimized formulation conditions will allow to obtain nanoparticles with optimized size and ζ potential, defined amount of loaded antimicrobials and adequate release rate.

Essential methods

Nanoparticles production will be optimized paying particular attention to features governing their interactions with lung mucus and biofilm. The most promising formulations will be tested *in vivo* in a mouse model of lung chronic infection by *P. aeruginosa*. This choice is motivated by the high relevance of *P. aeruginosa* in the lung infection in people with cystic fibrosis and by the synergic interaction between P13#1 and colistin and P13#1 and tobramycin on this pathogen.

Preliminary results

The proponents have already successfully engineered biodegradable polymeric nanocarriers for the controlled delivery of conventional antibiotics and antimicrobial peptides to the lung, highlighting the importance of nanoparticles to minimize interaction of drugs with mucin, to allow fast drug diffusion through simulated mucus and to penetrate inside biofilms.

Conclusions

The implementation of the project will improve the nanoparticle production technology, facilitating the development of antimicrobial therapies based on the direct delivery of drug combinations to the lung. The cooperation between the different antimicrobials will likely allow to reduce onset of resistance and the dose of each single antimicrobial thus reducing toxicity. The inhalable formulations could help to control lung infections with a reduced number of administrations.

Razionale dello studio

A differenza degli antibiotici convenzionali, i peptidi antimicrobici molto raramente danno origine a ceppi resistenti, purtroppo la sensibilità alle proteasi ne limita l'utilità come farmaci. Una possibile soluzione è progettare peptidomimetici resistenti alle proteasi. Tuttavia, peptidi e peptidomimetici sono difficili da somministrare perché le loro proprietà (per esempio elevato peso molecolare e adesività) precludono un'adeguata biodistribuzione. La somministrazione diretta al polmone è una soluzione interessante ma richiede l'uso di formulazioni inalabili che consentano una buona biodistribuzione e il rilascio controllato dei principi attivi.

Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo del progetto è sviluppare nanoparticelle polimeriche inalabili per il rilascio polmonare di P13#1, un peptidomimetico antimicrobico precedentemente progettato, da solo e in combinazione con colistina o tobramicina, antibiotici ampiamente usati nel trattamento delle infezioni polmonari. L'ottimizzazione delle formulazioni consentirà di ottenere nanoparticelle con le proprietà desiderate, una quantità predefinita di antimicrobici e un'adeguata velocità di rilascio.

Metodi

La produzione delle nanoparticelle sarà ottimizzata prestando particolare attenzione alle caratteristiche che ne controllano l'interazione con il muco polmonare e il biofilm. Le formulazioni più promettenti saranno saggiate *in vivo* in un modello di topo di infezione cronica polmonare da *Pseudomonas aeruginosa*. Questa scelta è motivata dalla rilevanza di *P. aeruginosa* nell'infezione polmonare delle persone con fibrosi cistica e dall'interazione sinergica di P13#1 con colistina e tobramicina su questo patogeno.

Risultati preliminari

I proponenti hanno già sviluppato con successo nanoparticelle biodegradabili per la somministrazione controllata di antibiotici convenzionali e peptidi antimicrobici nei polmoni, evidenziando l'importanza delle nanoparticelle nel ridurre l'interazione dei farmaci con le mucine, consentendo una rapida diffusione attraverso il muco e il biofilm.

Conclusioni

La realizzazione del progetto migliorerà la tecnologia di produzione delle nanoparticelle, facilitando lo sviluppo di terapie antimicrobiche basate sulla somministrazione diretta di combinazioni di farmaci al polmone. La cooperazione tra i diversi antimicrobici consentirà di ridurre l'insorgenza di resistenza, la dose di ogni singolo antimicrobico (riducendo così la tossicità) e il numero di somministrazioni necessarie a combattere l'infezione.

Study on anti-fungal immunoglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis

Usare gli anticorpi come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la terapia dell'aspergillosi broncopolmonare allergica nei bambini con fibrosi cistica



Teresa Zelante (2nd from the left) with her collaborators

Teresa Zelante

Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Italy

(FFC#15/2022, ongoing)

Background and rationale

Type I hypersensitivity due to hyper secretion of IgE in people with cystic fibrosis (pwCF) is described for at least 10% of pwCF and known as Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA). The development of IgE is mainly responsible of mast cell activation and pulmonary chronic inflammation.

By understanding how the cytokine pattern may affect isotypic switch, we are identifying the induction of non-beneficial IgE responses depending on the type of T cell immunity and therefore cytokine microenvironment. Our interest is also focused on anti-fungal IgG with known anti-inflammatory role, also acting as a non-anaphylactic or ‘blocking immunoglobulin’ against non-beneficial IgE responses. The aims of the project are: i) to understand the kinetics and determine the titres of the human antibody repertoires against *Aspergillus* in ABPA; ii) to identify different cytokine patterns, which are known to correlate with Ig enhancement and disease severity and remission; iii) to investigate which is the cytokine pattern able to shape the protective or non-protective antifungal Ig subclasses.

The titres of antigen specific/total IgG subclasses and IgE will be first determined at different stages of ABPA in pwCF. Thus, we will identify panel of epitopes that correlate to anti-fungal protection. In parallel, we will determine the cytokine pattern induced. In cystic fibrosis mouse model, we will enhance the subclasses generation with cytokine pattern identified.

We have preliminary data showing that in the ABPA mouse model compared to Invasive Aspergillosis, the production of IL-17F is correlated with tissue inflammation and exacerbation. In addition, IL-17F is correlated with IgE release and reduced respiratory functions. The exposure of HBE cells to IL-17F extremely exacerbates the inflammatory response that may affect B cell switching. As we have shown previously, the interaction of IL-17F with IL-17RC on epithelial cells in the upper airways contributed to inflammatory allergy.

In ABPA, the mechanistic explanation of Ig switching appears extremely important to support an early diagnosis in children sensitized to *Aspergillus* antigens. The project, by disentangling the antigen-specific Ig responses in acute or remission phases of ABPA may also find novel targets for protection in pwCF with ABPA.

Essential methods

Preliminary results

Conclusions

Razionale dello studio

L'ipersensibilità di tipo I dovuta all'ipersecrezione di IgE nelle persone con fibrosi cistica (FC) è descritta per almeno il 10% dei pazienti ed è nota come aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA). Lo sviluppo delle IgE è principalmente responsabile dell'attivazione dei mastociti e dell'infiammazione cronica polmonare.

Ipotesi e obiettivi

Comprendendo come il pattern delle citochine può influenzare lo switch isotipico, stiamo identificando l'induzione di risposte IgE a seconda del tipo di immunità T cellulare e quindi del microambiente indotto dalle citochine. Il nostro interesse è focalizzato anche sulle IgG antifungine con noto ruolo antinfiammatorio, agendo anche come immunoglobuline non anafilattiche o “bloccanti” contro le risposte IgE non protettive. Gli obiettivi del progetto sono: i) comprendere la kinetica e determinare i titoli dei repertori anticorpali umani contro *Aspergillus* in persone con FC e ABPA; ii) identificare diversi pattern di citochine, che sono noti per essere correlati con il potenziamento delle IgE e gravità o al contrario remissione della malattia; iii) studiare quale sia il pattern citochinico in grado di modulare le sottoclassi di Ig antifungine protettive o non protettive.

Metodi

I titoli delle sottoclassi di IgG antigene/totali e delle IgE saranno prima determinati in diversi stadi dell'ABPA nelle persone con FC. Pertanto, stiamo identificando un pannello di epitopi correlati alla protezione antifungina. In parallelo, determineremo il pattern di citochine indotto. Nel topo, stimuleremo la generazione delle sottoclassi con il pattern delle citochine identificato.

Risultati preliminari

Dati preliminari mostrano che nel modello di topo ABPA rispetto all'aspergillosi invasiva, la produzione di IL-17F è correlata all'infiammazione. Inoltre, IL-17F è correlata al rilascio di IgE e alla riduzione delle funzioni respiratorie. L'esposizione delle cellule HBE a IL-17F aggrava estremamente la risposta infiammatoria. Come abbiamo dimostrato in precedenza, l'interazione di IL-17F con IL-17RC sulle cellule epiteliali nelle vie aeree superiori può contribuire all'allergia infiammatoria.

Conclusioni

Nell'ABPA, la spiegazione meccanicistica dello ‘switch’ delle Ig è importante per supportare una diagnosi precoce nei bambini sensibilizzati agli antigeni di *Aspergillus*. Il progetto, districando le risposte Ig antigene-specifiche nelle fasi acute o di remissione dell'ABPA, può descrivere un nuovo bersaglio terapeutico per le persone con FC con ABPA.

Development of CRISPR-Cas delivery system for genome editing applications in cystic fibrosis

Sviluppo di sistemi di delivery di CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica



Giulia Maule (3rd from the left) and the CIBIO research group at University of Trento

Giulia Maule

Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Italy

(GMSG#1/2022, ongoing)

Background and rationale

Advancement in genome editing technologies allowed the development of efficient correction strategies for several CFTR mutations which were validated in people with cystic fibrosis (pwCF) derived experimental models. Despite the rising enthusiasm, the methods of delivery are still very inefficient thus strongly limiting the transition of these approaches to the clinic, especially in lungs being the leading cause of morbidity and mortality in pwCF. Unlike conventional gene therapy approaches, genome editing requires a transient expression of CRISPR nucleases, which must be active only for the time necessary to make the correction into the target DNA.

Hypothesis and objectives

This study exploits VESiCas nanoparticles, delivery tool previously developed for CRISPR-Cas9, to transport CRISPR components toward the lung epithelia to correct CFTR mutations. VESiCas system will combine the efficiency of viral vectors to enter the host cell, with a limited lifespan of cargo expression in target cells, to achieve correction of CFTR gene without generating unwanted alteration in the genome.

Essential methods

We initially incorporated into VESiCas the base editor ABE8e-SpCas9. The test of ABE8e-VESiCas in multiple loci showed a high editing efficiency in cell lines such as CFBE41o-, Huh7 and Caco2, obtaining up to 80% of base conversion. In order to test the efficacy of VESiCas for CF treatment, we created cellular models for the most frequent nonsense mutation, R553X, R1162X and W1282X, and designed gRNAs to correct them.

Preliminary results

Initial test by transfecting CRISPR components into HEK293T cells showed efficiencies between 15% and 60% depending on the mutation and gRNA. We are now producing ABE-VESiCas to correct these mutations in relevant cellular models for CF.

In order to achieve an efficient delivery of the genome editing complex to airway cells, we will change the tropism of VESiCas exploiting envelopes from different viruses. We are currently evaluating the efficacy of selected envelopes to enter the polarized airway epithelial cells from pwCF by measuring GFP expression after transduction.

Conclusions

With this project we aim to develop a new delivery system that will lead to an advancement in the treatment of pwCF, since the delivery in the lung tissue is still one of the main obstacles in the search for a cure. The developed VESiCas system could also be used for other lung diseases or be further adapted to specifically target other tissues, expanding its applications for genetic diseases treatment.

Razionale dello studio

Il progresso delle tecnologie per l'*editing* genomico ha consentito lo sviluppo di nuove strategie per correggere mutazioni in CFTR, che si sono dimostrate efficienti in modelli sperimentali derivati da persone con fibrosi cistica (FC). Nonostante il crescente entusiasmo, il trasporto (*delivery*) di queste tecnologie nei polmoni, principale causa di morbilità e mortalità nelle persone con FC, è inefficiente limitando l'uso di queste strategie in clinica. A differenza degli approcci convenzionali di terapia genica, l'*editing* del genoma richiede un'espressione transitoria delle nucleasi CRISPR, che devono essere attive solo per il tempo necessario per apportare la correzione nel DNA target.

Ipotesi e obiettivi

In questo progetto usiamo VESiCas per il *delivery* di CRISPR nell'epitelio polmonare per correggere mutazioni su CFTR. Il sistema VESiCas unisce l'efficienza dei vettori virali nell'entrare nella cellula ospite con espressione limitata del cargo, per ottenere la correzione del gene CFTR senza generare alterazioni indesiderate nel genoma.

Metodi

Inizialmente abbiamo incorporato in VESiCas il *base editor* ABE8e-SpCas9. Il test di ABE8e-VEsiCas in diversi loci ha mostrato un'elevata efficienza di *editing* in linee cellulari come CFBE41o-, Huh7 e Caco2, ottenendo fino all'80% di conversione A>G. Per testare l'efficacia di VESiCas per la FC, abbiamo creato modelli cellulari per le mutazioni non senso più frequenti, R553X, R1162X e W1282X, e gRNA per correggerle.

Risultati preliminari

Test iniziali in trasfezione hanno mostrato efficienze comprese tra il 15% e il 60%. Stiamo ora valutando ABE-VEsiCas per correggere queste mutazioni in modelli cellulari rilevanti per la FC. Per ottenere un *delivery* efficace dei complessi di *editing* genomico alle cellule delle vie aeree, modificheremo il tropismo di VESiCas sfruttando envelope virali. Stiamo attualmente valutando la loro efficacia in cellule epiteliali polarizzate delle vie aeree di persone con FC misurando l'espressione di GFP dopo la trasduzione.

Conclusioni

Con questo progetto miriamo a sviluppare un nuovo sistema di rilascio che porterà ad un progresso nel trattamento delle persone con FC, poiché il *delivery* nel tessuto polmonare è ancora uno dei principali ostacoli nella ricerca di una cura. Il sistema VESiCas sviluppato potrebbe essere usato anche per altre malattie polmonari o essere ulteriormente adattato per colpire specificamente altri tessuti, ampliando le sue applicazioni per il trattamento delle malattie genetiche.

Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del and 2789+5G>A CFTR defects

Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR



Anna Cereseto (1st from the left) and the CIBIO research group at University of Trento

38

Irene Carrozzo¹, Giulia Maule¹, Daniele Arosio², Anna Cereseto¹

¹ Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Italy - ² Institute of Biophysics, National Research Council of Italy, Trento, Italy

(FFC#2/2021, concluded)

Background and rationale

Recent advancements in genome editing offer unprecedented technical opportunities to permanently repair genetic defects causing cystic fibrosis (CF). Yet certain types of mutations are still difficult to reverse, these include deletions, such as the frequent F508del deletion in the CFTR gene causing cystic fibrosis. With this project we developed genome editing strategies, based on CRISPR technology, allowing to efficiently reverse the F508del defect.

Hypothesis and objectives

Secondary mutations in the CFTR gene can be exploited to mitigate the F508del defect. Structural studies revealed that these mutations promote F508del CFTR trafficking to the plasma membrane thus resulting in various degree restoration of the CFTR function. Based on this large body of data we have been able to circumvent the current limitation in repairing the F508del mutation by introducing neutralizing mutations through efficient genome editing techniques. We used the most advanced CRISPR-Cas based technology, base-editors, allowing to introduce modifications in the absence of genotoxic DNA double strand breaks.

We have used the recent CRISPR technology, base-editor, to introduce secondary mutations reported to neutralize the F508del defect. The F508del reversion was measured by CFTR localization on the cellular membrane by FACS analysis and by YFP-assay to measure CFTR functionality.

Results

Selected mutations that were reported to counteract the folding defect of F508del have been validated. We have also identified the best combinations of neutralizing mutations to reverse the F508del defect. We identified the base-editing strategies to introduce the neutralizing mutations and demonstrated that the modification reverses the F508del defect.

Conclusions

We identified the best combinations of neutralizing mutations as optimal candidate to restore CFTR function altered by F508del mutation. The neutralizing mutations were efficiently introduced through the innovative base-editor strategy to avoid genotoxic effects generated by the conventional CRISPR-Cas approach using nuclease activity. These strategies were proven valid to restore the activity of the CFTR locus containing the F508del defect as a groundwork for potential permanent treatment of CF.

Razionale dello studio

Lo sviluppo di nuove tecnologie per la terapia genica offrono nuove opportunità di sviluppo di terapie permanenti per le malattie genetiche come la fibrosi cistica (FC). In particolare, tecniche di *editing* genomico basate su CRISPR-Cas9 offrono la possibilità mettere a punto strategie di terapia genica basate sulla correzione delle mutazioni in opposizione al concetto "classico" di compensazione del difetto genetico. La mutazione più frequente in FC è la delezione F508del del gene CFTR. Le tecnologie di *editing* genomico disponibili non offrono al momento la possibilità di correggere in maniera efficiente questo tipo di mutazione (delezioni di tre nucleotidi).

Ipotesi e obiettivi

In questo progetto ci proponiamo di ripristinare il corretto funzionamento di F508del-CFTR, mediante un nuovo approccio che sfrutta l'esistenza di mutazioni neutralizzanti. Infatti, è stato osservato che i difetti di maturazione e trasporto proteico causati dal F508del possono essere in parte corretti da ulteriori mutazioni puntiformi nel gene CFTR, quindi dette neutralizzanti.

Metodi

Abbiamo usato nuovi sistemi basati su CRISPR (CRISPR-base editor) per modificare in modo mirato esclusivamente un singolo nucleotide. CRISPR-base editor e mutagenesi mediata da PCR sono state usate per introdurre le mutazioni neutralizzanti compatibili con le tecniche di *editing* genomico tramite *base-editing*.

Risultati

Abbiamo avviato ricerche finalizzate all'identificazione di nuove mutazioni neutralizzanti compatibili con il riparo della mutazione F508del tramite la tecnologia di *editing* genomico. Nel corso del progetto abbiamo identificato e selezionato nuove mutazioni secondarie in grado di correggere il trasporto di CFTR in membrana e ripristinarne la funzione. Grazie a una tecnologia CRISPR-Cas di seconda generazione, *base-editor*, che permette di introdurre modifiche in assenza di tagli del DNA abbiamo identificato strategie per inserire combinazioni di mutazioni neutralizzanti che ripristinano l'attività della proteina CFTR con mutazione F508del.

Conclusioni

Con questo progetto abbiamo messo a punto una nuova strategia di correzione genica per ripristinare il funzionamento della proteina CFTR con mutazione F508del. La nostra strategia prevede di aggirare i limiti dell'*editing* genomico che a oggi è limitato nella correzione efficiente di delezioni sfruttando mutazioni secondarie neutralizzanti il difetto principale. Abbiamo identificato mutazioni secondarie neutralizzanti che sono state inserite nel locus F508del tramite *base-editors* quindi in assenza di tagli del DNA. Le mutazioni neutralizzanti sono state dimostrate efficaci nel ripristinare l'attività di CFTR con mutazione F508del.

In vitro evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript

Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica (*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina CFTR con mutazioni stop



Aldo Di Leonardo (in the middle) and collaborators

39

Simona Titoli, Serena Gargano, Roberta Flavia Chiavetta, Viviana Barra, Patrizia Cancemi, Raffaella Melfi, Aldo Di Leonardo

Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo, Italy
(FFC#5/2021, concluded)

Background and rationale

Approximately 10% of people with cystic fibrosis (pwCF) worldwide have been reported to be compound heterozygous or homozygous for stop mutations that introduce in the CFTR gene a Premature Termination Codon (PTC). PTCs cause the translation of the CFTR protein to stop prematurely leading to a truncated, non-functional protein. We investigated sequence specific RNA editing as a novel tool to correct stop mutations to increase the range of therapeutic opportunities for these pwCF that currently have no treatment.

Hypothesis and objectives

Essential methods

To recode the PTC (UGA) in a sense codon (TGG) in the CFTR mutant mRNA, we exploited two different base editor tools, based on ADAR enzymes (adenosine deaminase acting on RNA), to convert the PTC's adenine into inosine (A-to-I) and allow the completion of CFTR translation: 1) REPAIRv2 (RNA Editing for Programmable A to I Replacement, version2) and the more compact version termed mini xABE (A to I Base Editor); 2) RESTORE (Recruiting Endogenous ADARs to Specific Transcripts for Oligonucleotide-mediated RNA Editing).

Results

By using these tools, we observed by immunofluorescence the recovery of the CFTR protein on the plasma membrane in CFF-16HBEge W1282X-CFTR and G542X-CFTR human cells. The rescue of CFTR full transcript was also confirmed by RT-qPCR. The delivery of RNA base- editing constructs could be challenging for therapeutic use. Thus, we also successfully tested the recombinant Adeno-Associated Viruses (rAAVs) as a strategy to enhance the delivery in human bronchial cell lines.

Conclusions

Altogether our results suggest that UGA nonsense mutations in the CFTR transcript might be corrected by RNA editing based on ADAR enzymes (both mini xABE and ASOs). Our findings pave the way for new and promising scenarios for the treatment of stop mutations of the CFTR gene. Also, RNA editing changing the transcriptomic sequence is considered safer than DNA editing because it does not induce permanent genomic off-target effects.

Razionale dello studio

Circa il 10% delle persone con fibrosi cistica nel mondo è eterozigote o omozigote per mutazioni stop per le quali attualmente non ci sono opzioni terapeutiche approvate. Le mutazioni stop nel gene CFTR introducono un codone di stop prematuro (PTC) nell'mRNA, causando l'interruzione precoce della traduzione della proteina CFTR che sarà quindi tronca e non funzionale. Sebbene alcune molecole utilizzate per superare le mutazioni stop siano promettenti, pensiamo sia necessario investigare nuovi approcci per il recupero funzionale della proteina CFTR.

Ipotesi e obiettivi

Abbiamo valutato la possibilità di correggere la mutazione nonsenso CFTR (UGA) nell'RNA messaggero del gene CFTR, usando nuove tecniche di modifica (*editing*) sito- specifica, nelle linee cellulari bronchiali umane CFF-16HBEge con CFTR-W1282X e G542X.

Metodi Abbiamo usato differenti approcci di *editing* dell'RNA sito-specifico (REPAIRv2, minixABE e RESTORE) che usano gli enzimi ADAR (deaminasi di adenosina che agisce su RNA) per convertire l'Adenosina in Inosina (A : I) nell'RNA messaggero e così ripristinare la corretta tripletta codificante, veicolati in cellule umane *in vitro* mediante micelle lipidiche. Una difficoltà che si può incontrare utilizzando questi sistemi di terapia genica è la loro veicolazione al sito bersaglio a fini terapeutici. Pertanto, abbiamo usato anche Virus Adeno Associati (AAVs) ricombinanti per valutare se il trasporto del sistema di *editing* possa essere implementato.

Risultati Tramite RT-qPCR abbiamo confermato l'incremento dell'RNA messaggero del gene CFTR con il sistema RESTORE. Mediante immunofluorescenza abbiamo osservato il recupero della proteina CFTR nelle cellule CFF-16HBGe con CFTR-W1282X e CFTR-G542X con i sistemi REPAIRv2 e mini xABE e la sua localizzazione sulla membrana plasmatica con il sistema RESTORE. Il *delivery* del sistema di *editing* dell'RNA potrebbe risultare difficoltoso per l'uso terapeutico. Pertanto, abbiamo anche testato con successo i virus adeno-associati ricombinanti (rAAV) come strategia per migliorare il *delivery* nelle linee cellulari bronchiali umane.

Conclusioni Complessivamente, i nostri risultati suggeriscono che le mutazioni non-senso UGA nell'mRNA del gene CFTR possano essere corrette tramite *editing* dell'RNA messaggero. Queste osservazioni aprono prospettive promettenti nella correzione dei codoni di stop prematuri presenti nell'RNA messaggero CFTR attraverso la correzione dell'RNA mutato costituendo un approccio più sicuro rispetto a quelli che agiscono sul DNA mutato.

SESSION 10

Reaching out: training and informing

1 out of 30 and you don't know it. A campaign for a better comprehension and awareness of the cystic fibrosis carrier test

1 su 30 e non lo sai. Una campagna di informazione e sensibilizzazione sul test del portatore sano di fibrosi cistica



Carlo Castellani (1st on the left) and the research group

40

Carlo Castellani¹, Cinzia Colombo², Rita Banzi², Chiara Gerardi², Eleonora Allocati², Paola Mosconi², Emanuela Foglia², Lucrezia Ferrario², Francesca Romano², Giulia Candiani³, Francesca Memini³, Chiara Di Lucente³, Rossella Failla³, Lucia Benaglio

¹ Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ² Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Milan, Italy - ³ Zadig Communication Agency, Milan, Italy (**1 out of 30 and You Don't Know It, ongoing**)

Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) carrier screening aims to detect carrier adults to permit informed reproductive choices. The question of widespread provision of CF carrier testing is not supported by adequate research and is outside of public debate.

Hypothesis and objectives

The first objective of the project is to perform an analysis of the CF carrier screening according to HTA (Health Technology Assessment) methods. The Second objective is to create a service with the capacity of allowing couples who wish to have children to decide in an informed manner whether to request a CF carrier test.

Essential methods

HTA- The process followed standardized methods and was implemented by the Mario Negri Institute and the LIUC Cattaneo University.

Website- A website has been created in collaboration with the Zadig agency for scientific information (www.testfibrosicistica.it).

HTA- A general positive attitude emerged, motivated by better knowledge of the disease and the possibility of more informed reproductive choices. Despite a significant initial financial commitment, screening is economically sustainable starting from the sixth year of the program. Potential critical issues have also emerged, such as organizational issues and availability of health services. It is not known what the population's actual adherence to the screening program would be. Concerns have been expressed that people with CF may feel stigmatised. This and other information is reported in <https://zenodo.org/record/8359728>.

Website- The site helps to interpret the genetic analysis results and contributes to the knowledge of CF in the general population and to raising awareness of the problems and needs of those affected. The site is currently being disseminated through a few social media, monitoring what responses this proposal is arousing and whether and how to improve it.

Preliminary results

HTA- The ideal continuation of the process might be a pilot study on a large sample of population aimed at assessing organizational settings and methods.

Website- The launch of the website and a dedicated information campaign, starting from social media to reach traditional media, using materials for widespread dissemination, will encourage an informed choice.

Conclusions

HTA- The ideal continuation of the process might be a pilot study on a large sample of population aimed at assessing organizational settings and methods.

Website- The launch of the website and a dedicated information campaign, starting from social media to reach traditional media, using materials for widespread dissemination, will encourage an informed choice.

Razionale dello studio	Lo screening del portatore sano di fibrosi cistica (FC) mira a identificare i portatori delle mutazioni causanti FC per poter fare scelte riproduttive informate. L'argomento dell'offerta diffusa del test del portatore FC non è supportato da adeguata ricerca ed è al di fuori del dibattito pubblico.
Ipotesi e obiettivi	Il primo obiettivo del progetto è effettuare un'analisi dello screening del portatore di FC secondo le metodiche di HTA (<i>Health Technology Assessment</i>). Il secondo obiettivo è creare un servizio in grado di consentire alle coppie che desiderino avere figli di decidere in maniera informata se richiedere il test del portatore di FC.
Metodi	HTA- Il processo è stato condotto seguendo metodiche standardizzate dall'Istituto Mario Negri e della LIUC Università Cattaneo. Sito web- In collaborazione con l'agenzia di informazione scientifica Zadig è stato ideato un sito web (www.testfibrosicistica.it).
Risultati preliminari	HTA- È emersa una generale attitudine positiva, motivata dalla miglior conoscenza della malattia e dalla possibilità di scelte riproduttive più consapevoli. A fronte di un importante impegno economico iniziale, lo screening è sostenibile economicamente a partire dal sesto anno dall'inizio del programma. Sono anche emerse potenziali criticità, quali i limiti organizzativi e dei servizi sanitari disponibili. Non è noto quale sarebbe l'effettiva adesione al programma di screening da parte della popolazione. È stato espresso il timore che le persone con FC possano sentirsi stigmatizzate. Queste e altre informazioni sono riportate in https://zenodo.org/record/8359728 . Sito web- Il sito aiuta ad interpretare il risultato dell'analisi genetica e contribuisce alla conoscenza della FC nella popolazione generale e alla sensibilizzazione alle problematiche e alle necessità di chi ne sia affetto. Il sito viene per ora diffuso attraverso alcuni social media, monitorando quali risposte questa proposta stia suscitando e se e come migliorarla.
Conclusioni	HTA- L'ideale prosecuzione del processo può essere uno studio pilota su largo campione di popolazione che esamina setting e modalità organizzative. Sito web- Il lancio del sito e una campagna d'informazione dedicata, partendo dai social per arrivare ai media tradizionali, con materiali per una divulgazione capillare, favoriranno una scelta consapevole.

Inclusion and activation of CF community as partners in the various stages of the research process
Inclusione e attivazione della comunità FC come partner nella ricerca



Michele Gangemi

41

Michele Gangemi, Cesare Braggion, Roberto Buzzetti, Giuseppe Magazzù
Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
(Experts together, new)

Background and rationale

An expert patient is one who shares their personal experience of the disease with the scientific community. There are some experiences in this regard within the Italian CF community, both in the field of SIFC (IPaCOR group) and the adult group in LIFC.

Hypothesis and objectives

The project aims to create a group of people with CF and their families who can actively contribute to FFC Ricerca research activities. The specific objectives of the initial phase are both cognitive and motivational in nature. The group serves as a resource to generate hypotheses in the spirit of co-construction. By the end of the project participants should be empowered to actively participate in research, rather than merely being passive recipients. The journey involves a paradigm shift not only for the individuals involved but also for FFC Ricerca.

Essential methods

About 20 participants, including people with CF and their families, were selected through a questionnaire. Eight remote meetings are planned, with active participation from the members and the involvement of methodological instructors (Braggion, Buzzetti, Gangemi, Magazzù), as well as content experts based on the topic being addressed. The meetings will focus on the key pathogenic elements of the disease and the foundational knowledge required to ask clinical questions and use tools and methods to find the best answers in the literature. Additionally, information will be provided on the FFC Ricerca's activities and objectives, as well as the organization of the national health system concerning the introduction of new drugs. The meetings will allow ample time for discussion and interaction, despite the need for remote training to avoid unnecessary travel and potential burdensome physical demands.

Conclusions

Through a co-construction process with the participants, roles and commitments will be defined for the trained individuals, who are expected to become an asset for FFC Ricerca and capable of working as advocates for collective concerns. This is just the first step in a journey that envisions a substantial shift in the rules of participatory research, acknowledging the resistance to change that accompanies every innovative process.

Razionale dello studio	Il paziente esperto è chi mette a disposizione della comunità scientifica il suo vissuto di malattia. Esistono altre esperienze in questo senso nella comunità FC italiana sia in ambito SIFC (gruppo IPaCOR) sia il gruppo adulti in ambito LIFC.
Obiettivi	Il percorso <i>Esperti insieme</i> mira a formare un gruppo di persone con FC e familiari che possa contribuire in modo attivo all'attività di ricerca di FFC Ricerca. Gli obiettivi specifici della prima fase sono sia di natura cognitiva che motivazionale. Il gruppo agisce come risorsa per moltiplicare le ipotesi nell'ottica di una co-costruzione. Alla fine del percorso i partecipanti dovranno essere messi nelle condizioni di partecipare attivamente alla ricerca e non solo subirla. Il percorso prevede un cambio di paradigma non solo da parte dei soggetti coinvolti, ma anche da parte di Fondazione
Metodi	Sono stati selezionati tramite questionario circa 20 partecipanti suddivisi tra persone con FC e familiari. Sono previsti otto incontri a distanza che vedranno la partecipazione attiva degli aderenti e il coinvolgimento di docenti di metodo (Braggion, Buzzetti, Gangemi, Magazzù) e di contenuto in base alla tematica trattata. Gli incontri verteranno sui principali elementi patogenetici della malattia e sulle basi necessarie per porre quesiti clinici e strumenti e metodi per trovare le migliori risposte in letteratura. Verranno fornite inoltre informazioni sulle attività e gli obiettivi di FFC Ricerca e sull'organizzazione del sistema sanitario nazionale per quanto riguarda l'introduzione di nuovi farmaci. Gli incontri forniranno ampi spazi di discussione e di interazione, nonostante il ricorso alla formazione a distanza resasi necessaria per evitare inutili spostamenti e possibili carichi difficili da sopportare.
Conclusioni	Attraverso una co-costruzione con i partecipanti si definiranno ruoli e impegno da parte dei soggetti formati che si auspica possano sentirsi un patrimonio per Fondazione e in grado di lavorare rappresentando le istanze collettive. Questo è solo il primo step di un percorso che prevede un cambiamento sostanziale nelle regole di una ricerca partecipata senza sottovalutare la resistenza al cambiamento che accompagna ogni processo innovativo.

SESSION 11

Triggering the immune system

Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis

Inibire il meccanismo di attivazione piastrinica come strategia per spegnere l'infiammazione polmonare in fibrosi cistica

Background and rationale

Failure to resolve lung inflammation has detrimental effects on lives of people with cystic fibrosis (CF). Our knowledge of mechanisms underlying non-resolving inflammation in CF is therefore still incomplete. In addition to their hemostatic function, platelets (PLT) play key roles in inflammation and its resolution. Previous studies have shown that the altered, hyperreactive PLT activities support lung inflammation while dampening beneficial proresolution mechanisms. Innovative strategies to restrain the PLT-based pathology could be useful to counter regulate CF inflammation and lung damage.

Hypothesis and objectives

Therefore, the leading hypothesis of the proposed research is that reduction of the PLT-driven lung inflammation could be valuable in CF. In this project we will determine how exposure of PLT with selected pro-resolving mediators (SPM) carry beneficial actions against lung CF inflammation.

Essential methods

To this end, we used PLT and leukocytes purified from blood of CF volunteers, treated with resolvins, and monitored for their ability to promote resolution of inflammation. These studies on patient cells were accompanied by preclinical in vivo studies on mouse models of pulmonary CF infection, in order to understand whether the PLT modulation is also effective in preclinical models of the disease.

Preliminary results

*We established that, among SPM, RvD3 and RvE1 carries specific actions that selectively dampen PLT activation ex vivo in cells from CF volunteers. In particular, both RvD3 and RvE1 selectively reduced thromboxane B2 (TxB2, a marker of PLT activation) released by CF PLT through alteration of intracellular calcium concentration. Moreover, RvD3 triggered PLT to stimulate clearance of *P. aeruginosa* strain by CF neutrophils. In vivo, in CF mice RvD3 reduced PLT activation in acute pneumonia due to *P. aeruginosa* lung infection. Importantly, RvD3 also dampened bacterial load and inflammation in acute pneumonia in a TxB2-dependent manner, thus indicating that the reduced PLT activation is a key driver of lung pathology.*



Domenico Mattoscio (in the middle) and his collaborators

42

Domenico Mattoscio

Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science,
University "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Chieti, Italy
(FFC#11/2022, ongoing)

Conclusions

Results from these experiments help to define the potency and efficacy of resolvins as an antiplatelet strategy to reduce inflammation-based pathology in CF. These studies are considerably relevant to the FFC Ricerca mission (to promote innovative treatment and care for CF), since this research investigates groundbreaking approaches to improve the lung inflammatory status of people with CF.

Razionale dello studio

La mancata risoluzione dell'infiammazione polmonare ha effetti dannosi sulla vita delle persone con fibrosi cistica (FC). La nostra conoscenza dei meccanismi alla base dell'infiammazione nella FC è quindi ancora incompleta. Oltre alla loro funzione emostatica, le piastrine (PLT) svolgono un ruolo chiave anche nell'infiammazione e nella sua risoluzione. Le PLT, disfunzionali e iper-attivate in FC, contribuiscono all'infiammazione polmonare e rallentano i meccanismi benefici della sua risoluzione.

Ipotesi e obiettivi

L'ipotesi alla base del progetto è che ridurre l'attivazione delle PLT possa apportare benefici per contrastare il danno polmonare in FC. L'obiettivo del progetto è quindi quello di determinare se e come il trattamento delle PLT con molecole pro-risolutive possa spegnere l'infiammazione cronica patologica in FC.

Metodi

PLT e leucociti purificati dal sangue di persone con FC sono stati trattati con resolvine e monitorate per la loro capacità di favorire la risoluzione dell'infiammazione. Inoltre, studi preclinici *in vivo* su modelli di topo di inffezione polmonare sono stati usati per determinare se la modulazione delle PLT sia efficace anche in modelli sperimentali della malattia.

Risultati preliminari

Tra i diversi SPM, la RvD3 e la RvE1 esercitano azioni specifiche che spengono l'iperattivazione di PLT in cellule isolate da persone con FC. In particolare, sia RvD3 che RvE1 riducono selettivamente il rilascio di trombossano B2 (Tx2B, un marcatore di attivazione PLT) da parte di PLT FC attraverso l'alterazione della concentrazione di calcio intracellulare. Inoltre, la RvD3 attiva le PLT nello stimolare l'eliminazione di *P. aeruginosa* da parte dei neutrofili FC. *In vivo*, la RvD3 si è dimostrata capace di ridurre l'attivazione delle PLT in modelli murini di FC con inffezione polmonare da *P. aeruginosa*. Inoltre, la RvD3 riesce a diminuire la carica batterica totale e l'infiammazione in una maniera Tx2B-dipendente, indicando come la ridotta attivazione delle PLT sia un importante fattore della patologia polmonare.

Conclusioni

Questi studi sono molto rilevanti per la missione della FFC Ricerca (promuovere un trattamento e una cura innovativi per la FC), poiché i risultati di questi esperimenti definiranno l'efficacia delle resolvine come strategia antiplastrinica per ridurre il carico infiammatorio polmonare nella FC.

Identification of molecular mechanisms which underpin the activation of pathogenic pulmonary Th1/17 cells in cystic fibrosis

Identificazione dei meccanismi molecolari che portano all'attivazione delle cellule immunitarie Th1/17 patogeniche in fibrosi cistica



Moira Paroni (on the left) and Clelia Peano (on the right)

43

Gianmarco Conte¹, Simone Puccio², Diletta Dolfini¹, Alessandro Gramegna³, Luis J. V. Galietta⁴, Alex Costa¹, Clelia Peano², Moira Paroni¹

¹ Department of Bioscience, University of Milan, Italy - ² Institute of genetics and Biomedical Research, National Research Council (IRGB-CNR), Milan, Italy - ³ Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale

Maggiore Policlinico, Milan, Italy - ⁴ Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy (FFC#14/2023, new)

Background and rationale

The main cause of cystic fibrosis (CF) lung function decline is the persistent activation of mucosal immune system that, while failing to eradicate and prevent chronic *P. aeruginosa* (Pa) infections, promotes tissue damage and pulmonary failure. So far, current anti-inflammatory therapies fail to selectively impair the activation of pathogenic immune system components.

Activation of dendritic cells (DCs) in response to Pa infections leads to pathogenic Th1/17 cells (*pTh1/17*) generation through the secretion of pro-inflammatory cytokines. Consequently, an overly activation of *pTh1/17* cells by Pa-infected DCs leads to a huge rise of IFN γ and IL-17 secretion in CF lung, further contributing to chronic inflammation and lung injury. The yet unknown molecular mechanism by which Pa-infected DCs activate the pathogenic arms of the mucosal immune system is the main goal of this project.

We will first determine the transcriptomic profiles at the single cell level of Pa-infected DCs employing a dual-RNAseq approach to identify altered host genes/pathways as new immune checkpoints targets. Next, we will perform a functional validation and modulation of selected immunological targets and, in order to validate the role of specific host genes/pathways in promoting tissue damage, we will test them on an air-liquid interface *in vitro* co-culture model.

Human DCs secreted an altered pattern of polarizing cytokines linked to *pTh1/17* cells activation in response to clinical Pa strains. Indeed, during CF lung adaptation clinical Pa strains increase their proficiency to persist within DCs, in turn promoting a continuous secretion of high IL-1 β and IL-23 levels. Consistently, *pTh1/17* cells are significantly increased in CF lungs with Pa infection, while protective T cells are strongly reduced. Notably, CF pulmonary *pTh1/17* cells displayed a unique gene expression profile compared to protective T cells.

Preliminary results

Conclusions

By deciphering the interplay between Pa-infected DCs and pulmonary activated pTh1/17 cells at the transcriptomic level, we will identify novel targets for next-generation immunotherapies for overall inflammation in CF. Identification of new immune checkpoints and druggable targets will pave the way for novel and efficient pharmaceutical strategies to prevent CF inflammation, increasing both life quality and expectancy.

Razionale dello studio

La principale causa del declino delle funzioni polmonari nella fibrosi cistica (FC) è l'attivazione persistente e disregolata del sistema immunitario mucosale che, pur non riuscendo a eradicare e prevenire le infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), promuove danni ai tessuti e porta all'insufficienza polmonare. A oggi, le attuali terapie antinfiammatorie non riescono a sopprimere selettivamente l'attivazione delle componenti patogeneche del sistema immunitario.

Ipotesi e obiettivi

L'attivazione delle cellule dendritiche (DC) in risposta alle infezioni da Pa porta alla generazione e attivazione delle cellule Th1/17 patogeneche (pTh1/17) attraverso la secrezione di citochine proinfiammatorie. Di conseguenza, un'eccessiva attivazione delle cellule pTh1/17 da parte delle DC infettate da Pa porta a un notevole aumento della secrezione di IFN- γ e IL-17 nei polmoni delle persone con FC, contribuendo ulteriormente all'infiammazione cronica e al danno polmonare. Il meccanismo molecolare attraverso il quale le DC infettate da Pa attivano le cellule pTh1/17 a livello muosale è ancora sconosciuto ed è il principale obiettivo di questo progetto.

Metodi

Usando una tecnologia di sequenziamento di ultima generazione (dual-RNA sequencing) determineremo i profili trascrittomici delle DC infettate da Pa a livello di singola cellula. Da queste analisi bioinformatiche verranno identificati i geni e pathway regolatori alterati durante la risposta dell'ospite all'infezione di Pa e verranno caratterizzati nuovi bersagli terapeutici a livello immunologico. Successivamente, effettueremo una validazione funzionale e una modulazione dei bersagli immunologici identificati con saggi funzionali *in vitro* e in un modello di co-coltura *in vitro* di epitelio polmonare.

Risultati preliminari

I nostri risultati mostrano che le DC secernono un pattern alterato di citochine polarizzanti correlate all'attivazione delle cellule pTh1/17 selettivamente in risposta a ceppi clinici di Pa. Infatti, durante l'adattamento del Pa ai polmoni delle persone con FC, i ceppi clinici aumentano la loro capacità di persistere all'interno delle DC promuovendo una continua secrezione di elevati livelli di IL-1 β e IL-23 che giocano un ruolo chiave nell'attivazione delle pTh1/17. Effettivamente, le cellule pTh1/17 sono significativamente aumentate nei polmoni delle persone con FC con infezioni croniche polmonari da Pa, mentre le cellule T protettive sono fortemente ridotte. I nostri dati mostrano inoltre che le cellule pTh1/17 polmonari nella FC hanno un profilo di espressione genica diverso rispetto alle cellule T protettive.

Conclusioni

Grazie alla caratterizzazione funzionale e molecolare dell'interazione tra le DC infettate da Pa e le cellule pTh1/17 polmonari attivate, identifieremo nuovi bersagli che potranno essere usati per lo sviluppo di nuove immunoterapie. L'individuazione di nuovi checkpoint immunitari e bersagli farmacologicamente attaccabili aprirà la strada a strategie farmacologiche innovative ed efficienti per prevenire l'infiammazione nella FC, migliorando sia la qualità che l'aspettativa di vita delle persone che ne sono affette.

**Targeting the STING/
Transglutaminase 2-regulated
Interferon response as a novel
host-direct approach to fight
bacterial infections in cystic
fibrosis**

**Usare la proteina STING
come bersaglio specifico
per combattere le infezioni
batteriche nella fibrosi cistica**



Mauro Piacentini (in the middle)
with his collaborators

44

**Luca Occhigrossi^{1,2}, Federica Rossin¹,
Manuela D'Eletto¹, Speranza Esposito³,
Valeria Villella³, Valeria Raia³, Mauro
Piacentini^{1,2}**

¹ Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Italy - ² National Institute for Infectious Diseases, IRCCS "L. Spallanzani", Rome, Italy -

³ Regional Cystic Fibrosis Center, Pediatric Unit, Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples, Italy.

(FFC#15/2022, concluded)

Background and rationale

Bacterial infections play a pivotal role in infectious disease, such as cystic fibrosis (CF). Innate immunity is the first line of defence to fight microbial pathogens and the STING signalling is the main host pathway that triggers the immune response upon infections. STING is activated upon bacterial infection and has a major role on the induction of type I interferons (IFN1). The action of IFN1 in host defence against bacteria may be beneficial or not depending on the type of infection. We have recently shown that genetic and pharmacologic inhibition of Transglutaminase 2 (TG2), a multifunctional enzyme that catalyzes post-translational modifications of proteins, results in an enhanced anti-microbial response in CF. Interestingly, we also found that TG2 could regulate the STING pathway, highlighting the implication of the enzyme in the host response to bacteria.

Hypothesis and objectives

The goal of this project was to better characterize STING signalling in CF models with the aim to find new possible targets to develop host-directed therapies (HDTs).

Essential methods

We proposed a one-year renewal project aimed to extend the analysis of STING pathway in people with CF. Specifically, we wanted to elucidate if the alterations in the STING pathway, observed for the F508del model, could be also associated to other CFTR mutations. Moreover, we wanted to use STING agonists on human CF samples to corroborate our findings on the mouse model. Finally, we aimed to better elucidate the mechanisms underlying the defective STING pathway induction in CF.

Results

The results from our previous project indicated that this pathway is defective in CF human and mouse model. Moreover, the direct stimulation of STING through agonists was able to restore the pathway leading to IFN1 production and improved bacterial clearance. Interestingly, we found that the alteration of the STING pathway occurs also in people with CF the F508del/ F508del mutation and at least one copy of minimal residual function mutations, and that the stimulation with cGAMP is able to increase the IFN- β expression also in these CF patients derived cells.

Conclusions

This approach allows us to finally define STING signalling as an important target in CF providing the basis to manipulate immune responses in CF enhancing host cell response. The use of antibiotics has played a major role in the increasing median survival of people with CF. However, alternative therapies are required to overcome microbial resistance. In this scenario, to find novel compounds such as cGAMP able to restore the defective microbial response in CF by modulating the host immune response, will be useful to develop HDTs.

Razionale dello studio

Le infezioni batteriche svolgono un ruolo fondamentale nelle malattie infettive, come la fibrosi cistica (FC). L'immunità innata è la prima linea di difesa per combattere i patogeni micròbici e la via di segnalazione di STING è la via principale dell'ospite che innesca la risposta immunitaria alle infezioni. STING si attiva in caso di infezione batterica e svolge un ruolo importante nell'induzione dell'interferone di tipo 1 (IFN1). L'azione dell'IFN1 nella difesa dell'ospite contro i batteri può essere benefica o meno a seconda del tipo di infezione. Abbiamo recentemente dimostrato che l'inibizione genetica e farmacologica della Transglutaminasi 2 (TG2), un enzima multifunzionale che catalizza le modificazioni post-traduzionali delle proteine, si traduce in una maggiore risposta antimicrobica nella FC. Abbiamo inoltre scoperto che la TG2 potrebbe regolare la via di segnalazione di STING, evidenziando l'implicazione dell'enzima nella risposta dell'ospite ai batteri.

Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo di questo progetto era caratterizzare ulteriormente la via di segnalazione di STING nei modelli di FC con l'obiettivo di trovare nuovi possibili bersagli per lo sviluppo di terapie host-directed (HDT).

Metodi

Abbiamo proposto un progetto di rinnovo di un anno volto a estendere l'analisi della via di segnalazione STING nelle persone con FC. Nello specifico, volevamo chiarire se le alterazioni nella via STING, osservate per il modello F508del, potessero essere associate anche ad altre mutazioni CFTR. Inoltre, volevamo usare gli agonisti di STING su campioni di FC umani per corroborare i nostri risultati sul modello di topo. Infine, abbiamo mirato a chiarire meglio i meccanismi alla base della difettiva attivazione della via STING nella FC.

Risultati

I risultati del nostro precedente progetto hanno indicato che STING è difettoso nel modello umano e di topo di FC. Inoltre, la stimolazione diretta di STING attraverso molecole come il cGAMP è stata in grado di ripristinare la produzione di IFN1 e migliorare la rimozione batterica. È interessante notare che l'alterazione della via STING è presente anche nelle persone con mutazione F508del/F508del e almeno una copia di mutazioni con funzione minima residua, e che la stimolazione con cGAMP è in grado di aumentare l'espressione di IFN- β anche in questa tipologia di pazienti.

Conclusioni

Questo approccio ci ha consentito di asserire che la via STING è un obiettivo importante nella fibrosi cistica, le basi per manipolare le risposte immunitarie nella FC. L'uso di antibiotici ha svolto un ruolo importante nell'aumentare la sopravvivenza mediana delle persone con FC, tuttavia sono necessarie terapie alternative per superare la resistenza microbica. In questo scenario, trovare nuovi composti come cGAMP in grado di ripristinare la risposta microbica difettosa nella fibrosi cistica sarà utile per sviluppare HDT.

Fostering pathogen host-mediated clearance to neutralize *Mycobacterium abscessus* infection

Rieducare il sistema immunitario dell'ospite a neutralizzare l'infezione da *Mycobacterium abscessus*



Edoardo Scarpa (on the left) and collaborators

Anna Griego^{1,2}, Stefano Muzzioli^{1,2}, Beatrice Antinori^{1,2}, Giorgia Moschetti^{1,2}, Nicola Ivan Lorè³, Fabio Saliu³, Francesca Nicola³, Daniela Maria Cirillo³, Loris Rizzello^{1,2}, Edoardo Scarpa^{1,2}

¹ Department of Pharmaceutical Science, University of Milan, Italy - ² National Institute of Molecular Genetics (INGM), Milan, Italy - ³ Emerging Bacterial Pathogens Unit, IRCCS San Raffaele, Milan, Italy
(FFC#12/2023, new)

Background and rationale

Mycobacterium abscessus (*Mab*) is emerging as one of the most prevalent pathogens in people with cystic fibrosis (CF). The overuse of antiMycobacterial molecules and *Mab* intrinsic antibiotic resistance are reducing the effects of the existing chemotherapy. As a result, more efficient approaches are urgently needed. Upon infection, *Mab* is internalised by alveolar macrophages (AMs) in the lung. Interestingly, it has been proposed that histone posttranslational modifications (PTMs), such as the acetylation of H3 lysin 14 (H3K14ac), might influence AM differentiation towards a pro- or anti-inflammatory phenotype. Hence, H3K14ac could significantly impact *Mab* sensing and inflammatory response.

Hypothesis and objectives

Our hypothesis is that remodulating H3K14ac we can enhance AMs' ability to resolve *Mab* infection. The objective is to boost AMs immunity by shifting the balance from *Mab*-permissive to *Mab*-eradicating AMs.

Essential methods

We used confocal microscopy to determine H3K14ac expression in AMs and used a clinically approved histone deacetylase inhibitor (Panobinostat) to promotes AMs towards *Mab*-killing phenotype.

Preliminary results

We demonstrated the presence of two coexisting AMs subpopulations having either low or high expression of H3K14ac. Following infection with *Mab* we observed a general decrease in the signal associated with H3K14ac and a reduced variability among the AMs sub-populations. However, single-cell analysis revealed that the reduced acetylation was to be ascribed only to the infected sub-population. Therefore, we speculated that a high level of H3K14ac might regulate *Mab* clearance by AMs and could be harnessed for therapy. We probed Panobinostat ability to remodulate H3K14ac in uninfected and *Mab* infected AMs.

Conclusions

Our preliminary results suggest that Panobinostat helps infected AMs-cell to better control the infection, while possibly avoiding spreading the infection to the uninfected neighbor AMs. Hence, we are revealing the crucial role of epigenetics in controlling the progression of the infection. Overall, we want to propose a new epitherapy that will exploit alveolar macrophage functional and phenotypic plasticity and that could supplement the existing *Mab* treatment.

Razionale dello studio

Mycobacterium abscessus (*Mab*) sta emergendo come uno dei patogeni più prevalenti nelle persone con fibrosi cistica (FC). L'uso indiscriminato di antibiotici e la capacità intrinseca di *Mab* di resistere a essi, stanno riducendo l'efficacia delle terapie già esistenti. Quindi si rendono necessari terapie più efficienti. Durante l'infezione, *Mab* viene internalizzato dai macrofagi alveolari (AMs) che sono presenti nel polmone. Recentemente è stato proposto come le modifiche post-traduzionali degli istoni (PTM), tipo l'acetilazione della lisina 14 dell'istone 3 (H3K14ac), potrebbero influenzare la differenziazione dei AMs verso un fenotipo pro- o antinfiammatorio. Di conseguenza, H3K14ac potrebbe avere un ruolo significativo nella risposta all'infezione da *Mab*.

Ipotesi e obiettivi

La nostra ipotesi è che rimodulando l'espressione di H3K14ac si possa potenziare la risposta immunitaria degli AMs. L'obiettivo è di spostare l'equilibrio da cellule permissive nei confronti del patogeno, verso cellule che lo eliminino.

Metodi

Abbiamo usato la microscopia confocale per determinare l'espressione di H3K14ac nelle AMs. Inoltre, stiamo valutando la capacità di un inibitore dell'istone deacetilasi clinicamente approvato (Panobinostat) di promuovere il differenziamento degli AMs verso un fenotipo attivo contro *Mab*.

Risultati preliminari

I nostri esperimenti hanno dimostrato che le cellule non infette si dividono in due sottotipi con espressione alta o bassa di H3K14ac. Tuttavia, in seguito all'infezione da *Mab*, abbiamo notato una generale diminuzione del segnale associato ad H3K14ac e una sua ridotta variabilità tra le sottopopolazioni cellulari. Pertanto, abbiamo ipotizzato che un elevato livello di H3K14ac possa regolare l'eliminazione di *Mab* da parte degli AMs e potrebbe essere sfruttato in ambito terapeutico. Infine, abbiamo testato la capacità del Panobinostat di rimodulare H3K14ac sia negli AMs non infetti che in quelli infettati da *Mab*. I nostri risultati preliminari suggeriscono che Panobinostat aiuti le cellule infette a controllare meglio l'infezione, limitando la diffusione del patogeno alle cellule circostanti.

Conclusioni

La nostra ricerca sta rivelando il ruolo cruciale dell'epigenetica nel controllo della progressione dell'infezione. Nel complesso, la nostra idea è di proporre una nuova epiterapia che possa essere integrata al trattamento già esistente nei confronti di *Mab*.

Building simple molecules containing regions of *Pseudomonas aeruginosa* to stimulate the immune system against this pathogen

Costruire strutture derivate da *Pseudomonas aeruginosa* per stimolare il sistema immunitario dell'ospite contro il batterio



From left to right: Alice Romeo, Marco Sette, Mattia Falconi, Federico Iacovello, Stefano Fedi, Marco Rinaldo Oggioni

Marco Sette¹, Mattia Falconi², Marco Rinaldo Oggioni³

¹ Department of Chemical Sciences and Technology, University of Rome Tor Vergata, Italy

- ² Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Italy -

³ Department of Pharmacy and Biotechnologies, University of Bologna, Italy

(FFC#13/2023, new)

Background and rationale

*People with cystic fibrosis (CF) frequently encounter infections by pathogenic bacteria that increase the complications associated with the illness. *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogenic Gram-negative bacterium very resistant to antibacterial treatments, is associated with these infections. Binding to the lung system occurs through the adhesion to the epithelial cells and is mediated by several molecules. The most relevant one is the type IV pilus, a macromolecular complex composed of several proteins, in which the most abundant one, PilA, oligomerises to build the final structure.*

Hypothesis and objectives

*A region of PilA, the so-called disulfide loop, is antigenic. Still, an antibody raised against the region of the PAK strain fails to protect individuals since they are infected by several strains of *P. aeruginosa* having different amino acidic compositions in the disulfide loop region. Our strategy is to create a hybrid molecule comprising a peptidic stable scaffold linked to the disulfide loop.*

Essential methods

We plan to use a combination of bioinformatic tools (Homology Modelling and Molecular Dynamics) for the molecule's design. Experimental verification of the correct folding will be performed through Circular Dichroism (CD) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Finally, in vivo tests on mice will be used to check that the designed molecules can elicit an immune response.

Preliminary results

The first of such molecules has been modelled using the AlphaFold system, linking the disulfide loop to the scaffold in different positions. Molecular dynamics simulations suggest that one position is more stable than the others. CD spectroscopy of this molecule indicates that it forms the expected secondary structure. NMR will be used to further study this molecule to characterise in detail the three-dimensional structure.

Conclusions

The final goal is to produce a cocktail of peptides each having the same scaffold but the disulfide loop of a different strain that will be used as a vaccine to promote the production of monoclonal antibodies in patients. Since it is a modular system, other diseases can be considered equally suitable.

Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica spesso incontrano infezioni da batteri patogeni che aumentano le complicazioni associate alla malattia. *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio opportunisto patogeno Gram-negativo molto resistente ai trattamenti antibatterici, è spesso associato a queste infezioni. L'infezione si sviluppa attraverso l'adesione alle cellule epiteliali ed è mediata da diverse molecole, tra cui la più rilevante è il pilus di tipo IV, un complesso macromolecolare composto da diverse proteine, in cui quella più abbondante, PilA, oligomerizza per costruire la struttura finale.

Ipotesi e obiettivi

È stato dimostrato che una regione di PilA, il cosiddetto loop disolfuro, risulta essere antigenica, ma un anticorpo preparato contro la regione del ceppo PAK non riesce a proteggere gli individui in quanto l'infezione viene portata avanti da diversi ceppi di *P. aeruginosa* aventi diversa composizione amminoacidica nella regione del loop disolfuro. La nostra strategia è quella di creare una molecola ibrida che comprenda un'impalcatura peptidica stabile collegata al loop disolfuro.

Metodi

Useremo una combinazione di metodi informatici (modellazione per omologia e dinamica molecolare) per il design delle molecole. La verifica sperimentale che le molecole assumano il folding corretto verrà effettuata tramite spettroscopia di Dicroismo Circolare (CD) e spettroscopia di Risoneanza Magnetica Nucleare (NMR). Infine, useremo test *in vivo* su topi per verificare che le molecole stimolino la produzione degli anticorpi.

Risultati preliminari

Usando il sistema Alphafold è stato collegato il loop disolfuro all'impalcatura in diverse posizioni. Le simulazioni di dinamica molecolare suggeriscono che una posizione è più stabile delle altre. La spettroscopia CD indica che questa molecola assume la struttura secondaria prevista. Questa molecola sarà ulteriormente studiata tramite spettroscopia NMR per caratterizzare in dettaglio la sua struttura tridimensionale e quindi iniettata nei topi.

Conclusioni

L'obiettivo finale è quello di produrre un cocktail di peptidi, aventi ciascuno la stessa impalcatura ma il loop disolfuro di ceppi diversi, che verrà usato come vaccino per promuovere la produzione di anticorpi monoclonali nei pazienti stessi. Poiché si tratta di un sistema modulare, altre patologie potranno essere prese in considerazione.

**Right ventricle dysfunction
in cystic fibrosis
patients undergoing lung
transplantation**

Disfunzione del ventricolo
destro in pazienti con fibrosi
cistica sottoposti a trapianto
di polmoni



Vittorio Scaravilli

**Background
and rationale**

People with cystic fibrosis (*pwCF*) have subclinical right ventricle (RV) dysfunction. During lung transplantation (LUTX), RV failure and shock may occur. In this scenario, emergent intraoperative extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is lifesaving but associated with post-operative cardiac failure and primary graft dysfunction. Echocardiographic RV strain (RV free wall longitudinal strain: RVFWLS) has been recently described as an accurate, non-invasive index of RV dysfunction but has never been evaluated in lung transplant recipients. Levosimendan is a calcium-sensitizer inotrope used for cardiac failure, capable of improving RV function, but never documented in the CF LUTX candidates.

**Hypothesis
and objectives**

**Essential
methods**

Results

We hypothesize that in *pwCF* undergoing LUTX: 1) pre-operative RVFWLS is predictive of intraoperative RV failure; 2) in patients with RV dysfunction, levosimendan is effective in reducing RV strain.

i) Prospective observational study of RVFWLS of patients undergoing LUTX; ii) prospective interventional trial to test levosimendan in reducing RV strain in this patients' cohort.

Of the 68 *pwCF* enlisted for LUTX at our center 50 (69%) have been included, and their pre-operative echocardiography performed. Of the remaining 18 *pwCF*, 1 was included in the study but exited the list (no FC), 12 were transplanted prior to study echography, and 5 are scheduled for baseline echocardiography. Of the 50 included patients, 29 have received LUTX, and 21 are still on the waiting list. Despite minimal macroscopic morphologic alterations, RV global and free wall longitudinal strain were significantly depressed (see Table 1). Overall, RVFWLS identified the highest percentage of impaired RV function (47%) compared to conventional echocardiographic parameters (TAPSE, 32%; S', 27%; FAC, 26%) and ventriculography (15%). Of the 29 included patients who had undergone LUTX, 15 required intraoperative ECMO support. We did not document a difference in RVFWLS between ECMO (-19.7±7.9) and non-ECMO (-19.2±3.0) patients ($p=0.825$). Similarly, no other pre-operative echocardiographic parameter showed a statistically significant difference among the two cohorts. Among LUTX recipients from 2017 to 2022 (130 patients, 74 CF), 28 were treated with levosimendan for post-operative cardiac failure, with a single case of atrial fibrillation and outcomes similar to other first-line inotropes.

Conclusions

We documented that LUTX candidates have severely depressed RVFWLS, but it was not predictive of intraoperative ECMO use. The acquired data do not support using RVFWLS to select patients for levosimendan treatment. Further studies are necessary to assess the impact on secondary outcomes of RV dysfunction documented by RVFWLS.

Table 1. Right Heart echocardiographic analyses.

Index	Normal	Measured	p Z-test (vs. normal population)
Right atrium area (cm ²)	14±2	12.6±5.3	< 0.001
RV end-diastolic area (cm ²)	18±4	11.1±5.7	< 0.001
RV basal diameter (mm)	33±4	36.1±6.1	< 0.001
RV FAC (%)	49±7	38.4±12.0	< 0.001
TAPSE (mm)	23±3	18.6±4.7	< 0.001
Pulmonary Artery Acceleration Time (ms)	130±20	85.7±38.1	< 0.001
S' vel RV (cm/s)	15±2	112±2.8	< 0.001
RV global longitudinal strain (RV GLS)	-24±3	-17.2±4.9	< 0.001
RV free wall longitudinal strain (RV FWLS)	-28±5	-19.4±6.4	< 0.001

RV, right ventricle; FAC, fractional area change; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; S', tissue Doppler positive peak systolic wave velocity.

Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica (FC) che necessitano di trapianto polmonare (TX) hanno una alterazione asintomatica della funzione del ventricolo destro (VDx), che si manifesta durante l'intervento con deterioramento cardiaco acuto e necessità di circolazione extracorporea (ECMO), che può essere associata a un peggioramento della prognosi del trapianto a breve termine. La misura dello strain del VDx (Right Ventricle Free Wall Longitudinal Strain: RVFWLS) è una tecnica innovativa per studiare il VDx, mai testata in pazienti candidati a TX. Il Levosimendan è un nuovo farmaco, usato fino ad ora per pazienti con malattie cardiache, che è capace di migliorare la funzione del ventricolo destro.

Ipotesi e obiettivi

Gli obiettivi sono: i) validare il RVFWLS per la diagnosi dei pazienti a più alto rischio di disfunzione intraoperatoria del ventricolo destro; ii) verificare se il trattamento con Levosimendan possa essere efficace in questo gruppo di pazienti.

Metodi

Studio osservazionale prospettico di RVFWLS e la sua capacità di predire la necessità di ECMO e una seconda fase interventistica (trattamento con Levosimendan dei pazienti a rischio per disfuntione ventricolare destra).

Risultati

Delle 68 persone con FC candidati a TX nel nostro centro, 50 (69%) sono state incluse e studiate. Delle rimanenti 18, uno è uscito dalla lista, 12 sono stati trapiantati prima di poter ottenere una misura di RVFWLS, e 5 sono in lista in attesa di essere studiati. Dei 50 incisi, 29 sono stati trapiantati, e 21 sono in lista. Abbiamo osservato una grave riduzione del RVFWLS, a fronte di una funzione globalmente preservata (Tabella 1). Il RVFWLS ha identificato la più alta percentuale di disfuntione del VDx (47%), confrontato con le altre tecniche convenzionali (TAPSE, 32%; S' 27%, FAC, 26%) e ventricocolografia (15%). Dei 29 pazienti inclusi sottoposti a TX, 15 hanno necessitato di ECMO. Non abbiamo documentato però una differenza nella misura di RVFWLS basale tra pazienti ECMO (-19,7±7,9) e non-ECMO (-19,2±3,0), ($p=0,825$), come per le altre misure ecografiche.

Di tutti i pazienti sottoposti a TX dal 2017 al 2022 (130 pazienti, 74 FC), 28 sono stati trattati con levosimendan per disfuntione miocardica post-operatoria, con un singolo caso di fibrillazione atriale e impatto clinico simile a quelli di altri farmaci inotropi.

Conclusioni

Abbiamo documentato come le persone con FC candidate a trapianto hanno una alterazione importante dello strain del ventricolo destro, ma i dati non ne supportano l'uso per selezionare i pazienti per il trattamento con levosimendan. Il levosimendan ha dato risultati clinici simili a quelli di altri inotropi. Ulteriori studi sono necessari per valutare l'impatto clinico secondario di una alterata funzione del ventricolo destro documentata con lo strain.

Mental Health in Cystic Fibrosis patients: the prognostic role of temperament, personality and attachment styles

La salute psichica nei pazienti affetti da fibrosi cistica: il ruolo prognostico del temperamento, della personalità e degli stili di attaccamento



Gianluca Serafini (2nd from the right) and his collaborators

48

Gianluca Serafini, Riccardo Ciprandi

Department of Neuroscience, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOOGMI), Section of Psychiatry, University of Genoa, Italy

(FFC#21/2021, concluded)

Background and rationale

Depression and anxiety are among the most frequent comorbidities reported in cystic fibrosis (CF), with impact on medication adherence and health outcomes. The research hypothesis is based on the identification of temperament and personality factors as predictors for identifying patients at risk for a worse prognosis both from a clinical and therapeutic point of view.

Hypothesis and objectives

Aims of the study have been to investigate personality and temperament factors, predictors of mood and anxiety disorders, and the investigation of psychological conditions more subjected to changes over time, through the follow-up.

Essential methods

It has been conducted a prospective observational cohort study: at T0 it has been enrolled 65 patients and 10 parents (of adolescent patients), with the administration of validated psychological tests, part of which it has been re-administered through follow-up after 1 year (T1), and compared with clinical parameters.

Results

In the CF sample, from T0 to T1, it has been observed an increase of moderate anxiety symptomatology (10.8% vs 23.1%), whereas a decrease of severe anxiety (10.8% vs 3.1%). At T1 it has been registered an increase of: sub-threshold depression (27.7% vs 29.2%), mild (10.8% vs 13.8%) and severe (0% vs 1.5%). It has been reported a slight increase of pathological dissociation from T0 to T1 (6.2% vs 7.7%). The perception of the disease has changed related to the coherence and understanding of CF. This data found could be highly related to the CFTR modulators treatment, with relevant psychological effects in terms of experience of illness. Parents' sample (n=10) has worsen values of mild anxiety from T0 to T1 (30% vs 50%), whereas unaltered the severe anxiety (20%). The decrease of medication adherence was statistically significant from T0 to T1, albeit slight.

Conclusions

Data found through the follow-up highlight the importance of monitor any changes related to mental health conditions of people with CF, even more in the era of CFTR modulators, in particular connected to depression. The predominant hyperthymic temperament trait found could represent an important resource to consider for the psychological intervention in relation to the mood disorders. Furthermore, in the CF sample analyzed, the difficulties with negative emotionality and changes in the perception of disease requiring attention for the management of medication adherence with consequences on the clinical course.

Razionale dello studio

La depressione e l'ansia sono tra le comorbilità più frequenti riportate nella fibrosi cistica (FC), con un impatto sull'aderenza terapeutica e sugli esiti di salute. L'ipotesi di ricerca si basa sull'identificazione di fattori temperamentalni e di personalità per l'identificazione di persone con FC a rischio di una peggiore prognosi sia dal punto di vista clinico che terapeutico.

Ipotesi e obiettivi

Scopi dello studio sono stati quello di indagare fattori di personalità e temperamento, predittori di disturbi dell'umore e d'ansia, e l'indagine delle condizioni psicologiche più soggette a cambiamenti nel tempo.

Metodi

È stato condotto uno studio prospettico osservazionale di coorte: al T0 sono stati arruolati 65 pazienti e 10 genitori (di pazienti adolescenti), con somministrazione di test psicologici validati, parte dei quali è stata risomministrata, dopo 1 anno (T1), e confrontati con i parametri clinici.

Risultati

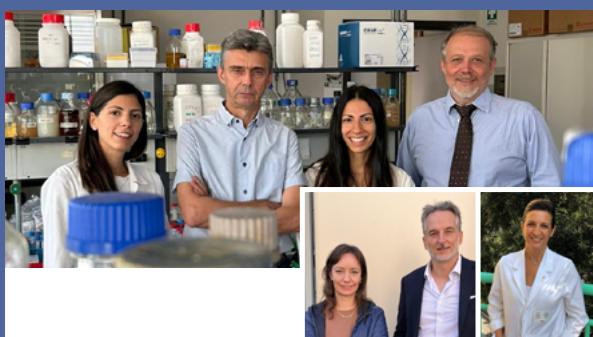
Nel campione FC, dal T0 al T1, è stato osservato un aumento della sintomatologia ansiosa moderata (10,8% vs 23,1%), mentre una diminuzione dell'ansia grave (10,8% vs 3,1%). Al T1 è stato registrato un aumento di: depressione sottosoglia (27,7% vs 29,2%), lieve (10,8% vs 13,8%) e grave (0% vs 1,5%). È stato riportato un lieve aumento della dissociazione patologica dal T0 al T1 (6,2% vs 7,7%). La percezione della malattia è cambiata relativamente alla coerenza e alla comprensione della FC. Questi dati rilevati potrebbero essere altamente correlati al trattamento con modulatori CFTR, con effetti riguardo il vissuto di malattia. Il campione dei genitori presenta valori di ansia lieve peggiorati da T0 a T1 (30% vs 50%), inalterati quelli di ansia grave (20%). La diminuzione dell'aderenza alle terapie è risultata statisticamente significativa dal T0 al T1, seppur lieve.

Conclusioni

I dati rilevati attraverso il follow-up evidenziano l'importanza di monitorare eventuali cambiamenti legati alle condizioni di salute mentale delle persone con FC, ancor più nell'era dei modulatori, in particolare relativamente alla depressione. Il tratto temperamentale ipertimico, riscontrato come più predominante, potrebbe rappresentare un'importante risorsa da considerare per l'intervento psicologico relativamente ai disturbi dell'umore. Inoltre, le difficoltà legate all'emotività negativa e ai cambiamenti nella percezione della malattia richiedono attenzione per la gestione dell'aderenza terapeutica, con conseguenze sul decorso clinico.

Actin-resistant acidic DNase for the treatment of CF pulmonary symptoms

Una DNasi acida resistente all'actina per il trattamento dei sintomi polmonari della FC



From left to right: Danila Delfino, Claudio Rivetti, Giulia Mori, Riccardo Percudani. In the picture below, Antonella Grigoletto, Gianfranco Pasut, Rosaria Casciaro

49

**Giulia Mori¹, Danila Delfino¹,
Antonella Grigoletto², Gloria Bizzotto²,
Benedetta Campara², Claudio Rivetti¹,
Nicola Tirelli⁴, Rosaria Casciaro³,
Gianfranco Pasut², Riccardo Percudani¹**

¹ Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Italy - ² Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua, Italy - ³ Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genova, Italy - ⁴ Italian Institute of Technology (IIT), Genoa, Italy (FFC#14/2022, ongoing)

Background and rationale

In a prior FFC Ricerca project, we identified DNase1L2 as a favorable mucolytic agent for its resistance to actin and acidic pH optimum of activity. We produced the enzyme in recombinant and PEGylated form, and obtained promising results in cystic fibrosis (CF) artificial mucus.

Hypothesis and objectives

We aim at finalizing the preclinical characterization of DNase1L2 in mucus of people with CF, broadening its activity spectrum through covalent modifications and protein engineering, and understanding the structural basis of its unique catalytic properties.

Essential methods

To increase the yield and solubility, we produced recombinant DNase1L2 in *Escherichia coli* as a fusion protein with the maltose-binding protein (MBP). Because DNase1L2 exists in two isoforms distinguished by the presence (DNase1L2-L) or absence (DNase1L2-S) of a 21-amino acid insertion with unknown function, we applied the same strategy to produce both isoforms. DNase activity was analyzed by using supercoiled plasmid DNA as substrate. The PEGylated form of DNase1L2 previously obtained, mPEG24mer-DNase1L2, was characterized in terms of sites of conjugation. The modification of DNase1L2 with PEG was preliminary investigated also using other PEGylation strategies. Mucus samples have been collected from consenting people with CF after a respiratory physiotherapy session and have been frozen immediately at -80°C.

Preliminary results

Expression of recombinant DNase1L2 as a fusion protein with MBP greatly increases the protein yield and prevents its accumulation in inclusion bodies. The two fusion proteins (DNase1L2-L and DNase1L2-S) are both active, but after proteolytic cleavage to release DNase1L2 from MBP, the activity increases. mPEG24mer was conjugated preferentially to three lysine residues of DNase1L2 that are far from the catalytic site. Three different conjugates of DNase1L2 were obtained by using PEG2kDa-aldehyde linked to lysines, PEG20kDa linked at the protein N-terminus or Z-Gln-Gly-mPEG 20 kDa linked to lysines. The conditions and protocols to assay the activity of DNase1L2 on patients' mucus have been established at the Italian Institute of Technology in Genoa.

Conclusions

In this first year i) we have produced two natural isoforms of DNase1L2 as fusion proteins and characterized their activity *in vitro*; ii) we have designed constructs to purify DNase1L2-L and DNase1L2-S in a more active form; iii) we preliminary investigated different PEGylation approaches of DNase1L2. We will test both DNase1L2 isoforms in native and PEGylated form on collected patient mucus.

Razionale dello studio

In un precedente progetto di FFC Ricerca, abbiamo identificato la DNase1L2 come agente mucolitico favorevole per la sua resistenza all'actina e per il pH acido ottimale di attività. Abbiamo prodotto l'enzima in forma ricombinante e PEGhilata e abbiamo ottenuto risultati promettenti nel muco artificiale della FC. Abbiamo prodotto l'enzima in forma ricombinante e pegilata e abbiamo ottenuto risultati promettenti nel muco artificiale della fibrosi cistica (FC).

Ipotesi e obiettivi

Ci proponiamo di completare la caratterizzazione preclinica della DNase1L2 nel muco dei pazienti, di ampliare il suo spettro di attività attraverso modifiche covalenti e ingegneria proteica, e di comprendere le basi strutturali delle sue uniche proprietà catalitiche.

Metodi

Per aumentare la resa e la solubilità, abbiamo prodotto la DNase1L2 ricombinante in *Escherichia coli* come proteina di fusione con la proteina legante il maltosio (MBP). Poiché la DNase1L2 esiste in due isoforme che si distinguono per la presenza (DNase1L2-L) o l'assenza (DNase1L2-S) di un'inserzione di 21 aminoacidi con funzione sconosciuta, abbiamo applicato la stessa strategia per produrre entrambe le isoforme. L'attività della DNase1L2 è stata analizzata usando come substrato il DNA plasmidico superavvolto. La forma PEGhilata di DNase1L2 precedentemente ottenuta, mPEG24mer-DNase1L2, è stata caratterizzata in termini di siti di coniugazione. La modifica della DNase1L2 con PEG è stata studiata in via preliminare anche usando altre strategie di PEGhilazione. Campioni di muco sono stati raccolti da persone con FC consenzienti dopo una sessione di fisioterapia respiratoria e sono stati congelati immediatamente a -80°C.

Risultati preliminari

L'espressione della DNase1L2 ricombinante come proteina di fusione con MBP aumenta notevolmente la resa proteica e previene l'accumulo nei corpi di inclusione. Le due proteine di fusione (DNase1L2-L e DNase1L2-S) sono entrambe attive, ma dopo il taglio proteolitico per liberare la DNase1L2 dalla MBP, l'attività aumenta. Il mPEG24mer è stato coniugato preferenzialmente a tre residui di lisina della DNase1L2 che sono lontani dal sito catalitico. Tre diversi coniugati di DNase1L2 sono stati ottenuti utilizzando PEG2kDa-aldeide legata alle lisine, PEG20kDa legato all'N-terminale della proteina o Z-Gln-Gly-mPEG 20 kDa legato alle lisine. Le condizioni e i protocolli per testare l'attività della DNase1L2 sul muco dei pazienti sono stati stabiliti presso l'Istituto Italiano di Tecnologia di Genova.

Conclusioni

In questo primo anno i) abbiamo prodotto due isoforme naturali di DNase1L2 come proteine di fusione e ne abbiamo caratterizzato l'attività *in vitro*; ii) abbiamo progettato costrutti per purificare DNase1L2-L e DNase1L2-S in una forma più attiva; iii) abbiamo studiato in via preliminare diversi approcci di PEGhilazione di DNase1L2. Testeremo entrambe le isoforme di DNase1L2 in forma nativa e PEGhilata su muco raccolto da persone con FC.

Post-marketing studies on effectiveness and safety of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) in Italian people with cystic fibrosis

Studi post-marketing sull'efficacia e sicurezza di elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) in persone italiane con fibrosi cistica



From the left, Sonia Volpi, Maria Cristina Lucanto, Cesare Braggion

Sonia Volpi¹, Maria Cristina Lucanto², Cesare Braggion³ and the Working Group for the SITTMA study and SPIKE study

¹ Centro Regionale di Riferimento per la Fibrosi Cistica, AOUI Verona - ² Centro Regionale di Riferimento per la Fibrosi Cistica, AOU Policlinico "G. Martino", Messina - ³ Direzione Scientifica FFC Ricerca, Area Ricerca Clinica (**Effetto Kaftrio, concluded; Kaftrio nella vita reale, new**)

Background and rationale

The Italian Cystic Fibrosis Foundation funded two post-marketing retrospective and observational studies, to assess the real world effectiveness and safety of ETI in people with cystic fibrosis (pwCF), 12 years of age or older and heterozygous for F508del (F) and one minimal function mutation (MFM). The first study (SITTMA) assessed pwCF with advanced lung disease through 24 months and ended in 2023. The second ongoing study (SPIKE) evaluated pwCF with normal or mild-moderate lung disease through 24 months and pwCF of the first study through 4 years.

Hypothesis and objectives

The availability of an effective treatment for people with CF facing respiratory failure, lung transplantation or death is of paramount importance, so both studies were aimed to assess effectiveness and safety of pwCF with advanced lung disease through 48 months. This group of pwCF will be compared with pwCF with milder lung disease. Our interest is also focused on the individual responsiveness to the drug, considering the correlation between the ex vivo rescue by CFTR modulators in nasal cells and the clinical benefits obtained with ETI, pharmacokinetics data and the change in phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* after prolonged treatment with ETI.

Essential methods

We reported methods and preliminary results of the SITTMA study. 20 Italian CF Centers participated in a retrospective observational study, designed to obtain real-world data in pwCF (age \geq 12 years, genotype: F/MFM) with advanced respiratory disease (FEV1 < 40% pred.). Demographic and clinical data were collected from patient files for 2 years prior to and 2 years after ETI was initiated. Outcomes included treatment-related adverse events, temporary or definitive interruption of the drug, change in FEV1, sweat chloride concentration, use of antibiotics, body mass index and quality of life.

Results

124 (48.4% males) pwCF with advanced lung disease were treated with ETI through 2 years: the mean (SD) age was 32.5 (10.5) years, the mean FEV1 was 36.2 (12.0) % pred. The absolute mean (SD) changes in percentage of predicted FEV1 at the end of the first and second year of treatment were +15 (13.9) and +17.2 (13.0) points relative to baseline, respectively. Two patients discontinued ETI after 11 and 14 months of treatment because they underwent lung transplantation. Temporary interruption of ETI occurred in 5 pwCF (2 due to skin rash and 3 due to elevated levels of aminotransferase). Greater than three-fold elevation of aminotransferase levels occurred in 6 pwCF (4.8%).

Conclusions

Short-term descriptive reports (3-6-12 months) showed a significant absolute change in FEV1 % predicted after the initiation of ETI in pwCF with advanced lung disease (1, 2). Our study showed a sustained mean improvement in percentage of predicted FEV1 of about 15 points through 24 months.

Razionale dello studio

FFC Ricerca ha finanziato due studi post marketing, osservazionali, retrospettivi - prospettici di coorte, allo scopo di verificare l'efficacia e la sicurezza di ETI nella vita reale di persone con fibrosi cistica (FC), di età uguale o superiore ai 12 anni, eterozigoti composti per la mutazione F508del (F) e una mutazione a funzione minima (MFM). Il primo studio (SITTMA) della durata di 24 mesi, conclusosi quest'anno, ha valutato persone con FC e malattia polmonare severa che hanno avviato ETI attraverso il programma "ex-compassionevole". Il secondo studio (SPIKE), in procinto di essere avviato, della durata di 24 mesi, valuterà persone FC con malattia polmonare normale o lieve-moderata che hanno avviato ETI dopo l'autorizzazione all'immissione in commercio e persone con FC del primo studio prolungando l'osservazione per 4 anni.

Ipotesi e obiettivi

Gli studi hanno l'obiettivo di valutare l'efficacia e la sicurezza di ETI in persone con FC con malattia polmonare severa a confronto con persone con FC con malattia polmonare normale o lieve-moderata. Lo studio SPIKE è inoltre seconariamente interessato a caratterizzare la responsività individuale alla terapia con ETI: verificando la correlazione tra i dati funzionali dell'attività di CFTR ottenuti *ex vivo* e la risposta clinica delle persone con FC con ETI; fornendo dati di farmacocinetica; fornendo dati sulla variazione nel fenotipo/genotipo di *Pseudomonas aeruginosa* dopo trattamento prolungato con ETI.

Metodi

Riportiamo i metodi e risultati dello studio SITTMA. 20 Centri FC italiani hanno aderito a uno studio retrospettivo, osservazionale finalizzato a valutare nella vita reale gli effetti di ETI nelle persone con FC (età \geq 12 anni, genotipo: F/MFM) con malattia polmonare severa (FEV1 < 40% pred.). Sono stati confrontati i dati demografici e clinici raccolti durante i due anni precedenti e i due successivi l'avvio della terapia. Le misure di esito sono state gli effetti avversi correlati al farmaco, la sua sospensione temporanea o definitiva, la variazione di FEV1, del cloro sudorale, del numero di cicli antibiotici, dell'indice di massa corporea e della qualità della vita.

Risultati

124 (48,4% maschi) persone con FC con malattia polmonare severa sono state trattate con ETI per 2 anni: età media (SD) di 32,5 (10,5) anni, FEV1 medio 36,2 (12,0)% predetto. La variazione assoluta in punti di percentuale predetta del FEV1 alla fine del primo e del secondo anno di trattamento è stata, rispettivamente, +15 (13,9) e +17,2 (13,0) rispetto al basale. Due persone hanno sospeso ETI dopo 11 e 14 mesi di trattamento perché sottoposte a trapianto polmonare. In 5 persone ETI è stato sospeso temporaneamente (2 per rash cutaneo e 3 per l'elevazione delle aminotrasferasi). Un aumento di più di tre volte la soglia delle aminotrasferasi è stato registrato in 6 persone (4,8%).

Conclusioni

Studi di breve durata (3-12 mesi) hanno riportato una significativa variazione assoluta nel FEV1 dopo avvio di ETI in persone con FC e malattia polmonare avanzata. Il nostro studio ha mostrato un aumento prolungato della percentuale predetta del FEV1 di circa 15 punti nell'arco dei 24 mesi di follow-up.

Investigation of Kaftrio secondary effects on sphingolipid synthesis

Studio degli effetti secondari del Kaftrio sui grassi che compongono le cellule



Clockwise: Left to right, Dinu Ciobanu, Nara Liessi, Andrea Armirotti, Valeria Capurro, Valeria Tomati, Nicoletta Pedemonte. In the picture below, from left to right, Nicoletta Loberto, Massimo Aureli, Rosaria Bassi, Dorina Dobi, Mar Garcia, Pietro Franceschi Aloy

51

Andrea Armirotti¹, Nara Liessi¹, Dinu Ciobanu¹, Valeria Tomati², Valeria Capurro², Nicoletta Pedemonte², Rosaria Bassi³, Nicoletta Loberto³, Dorina Dobi³, Massimo Aureli³, Mar Garcia Aloy⁴, Pietro Franceschi⁴

¹ Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - ² UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ³ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - ⁴ Fondazione Edmund Mach, Trento, Italy (**FFC#1/2021, concluded; FFC#1/2023, new**)

Background and rationale

The role of lipids in many processes related to CFTR trafficking has been extensively documented. We have carried out a lipidomic investigation on F508del-CFTR CFBE410- cells treated with CF drugs and we highlighted alterations in the sphingolipids metabolism. In another study, we used the same model to assess changes in expression levels and in the subcellular localization of around 5000 proteins of the human bronchial epithelium (BE) treated with VX-809. We discovered an extensive structural reorganization of mitochondria and peroxisomes associated with CFTR rescue and we validated our findings in primary cells.

Hypothesis and objectives

We performed a multi-omic investigation, focused on F508del-CFTR vs wild-type primary cells treated with ETI (elexacaftor, tezacaftor and ivacaftor) or control (DMSO) to identify changes in the lipidome and proteome of the BE associated with CFTR rescue. Data from BE from subjects carrying compound heterozygous minimal function mutations (MF/MF) allowed us to discriminate between specific effects (related with CFTR rescue) and non-specific effects (related to the drug).

Essential methods

We analysed the lipidome and the proteome of BE cells from 10 subjects homozygous for F508del, 10 non-CF and 4 MF/MF subjects treated with DMSO and ETI, for a total of 240 individual samples. On these samples, we have conducted the following studies: i) targeted quantification of sphingolipids; ii) investigation of GMI metabolism, enabled by the incorporation of 3H-sphingosine; iii) quantification of several hundred lipid species and iv) proteome-wide expression proteomics experiment.

Results

We demonstrated that an off-target effect of ETI is the alteration of the dihydroceramides/ceramides balance. Moreover, all untargeted data we collected so far, while showing a limited alteration of protein expression profiles, highlight very significant and diversified changes of the BE lipidome. These changes confirm and extend our previous findings and allowed us to clearly discriminate between specific and off-target effects of ETI.

Conclusions

We have conducted the most detailed multi-omic investigation of the F508del-CFTR BE undertaken so far and we specifically discriminated the alterations related to CFTR rescue from those related to non-specific effects of the drug. These results will hopefully lead to the development of new drugs and to the elucidation of the mechanisms behind adverse effects of ETI.

Appendix Project FFC#1/2023

We hypothesize that ETI is either a direct inhibitor of DEGSx or that it might impact on its levels of expression. DEGSx enzymes convert dihydroceramides (dhCer) into ceramides (Cer), thus controlling the homeostasis of dihydrosphingolipids in the cell. We want to investigate this hypothesis, with the aim to understand the mechanisms lying behind our observation. In the light of our data, we also want to investigate the impact of the drug on the liver, by searching for biomarkers of Kaftrio action on human hepatocytes.

Razionale dello studio

Il ruolo dei grassi in molti processi legati a CFTR è stato ampiamente documentato. Abbiamo effettuato un'analisi su cellule F508del-CFTR trattate con farmaci FC e abbiamo evidenziato alterazioni in alcuni tipi di grassi. In un altro studio abbiamo usato lo stesso modello per valutare i cambiamenti nella localizzazione di circa 5000 proteine nell'epitelio bronchiale umano (BE). Abbiamo scoperto una riorganizzazione strutturale dei mitocondri e dei perossisomi associata al recupero di CFTR e abbiamo convalidato i nostri risultati in cellule primarie.

Ipotesi e obiettivi

Abbiamo condotto esperimenti su cellule primarie ottenute da soggetti con FC e non-FC trattate con ETI (*elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor*) per identificare i cambiamenti nel lipidoma e nel proteoma del BE associati al recupero di CFTR. I dati provenienti da BE di soggetti portatori di mutazioni a funzione minima (MF/MF) ci consentono di discriminare tra effetti specifici (correlati al recupero di CFTR) ed effetti non specifici (correlati al farmaco).

Metodi

Abbiamo analizzato il lipidoma e il proteoma delle cellule BE di 10 soggetti con la mutazione F508del, 10 soggetti non FC e 4 soggetti MF/MF trattati con DMSO ed ETI, per un totale di 240 campioni. Su questi campioni, abbiamo condotto i seguenti studi: i) quantificazione mirata degli sfingolipidi; ii) studio del metabolismo di GM1; iii) quantificazione di diverse centinaia di specie lipidiche e iv) analisi dei livelli di espressione proteica.

Risultati

Abbiamo dimostrato che un effetto non-specifico di ETI è l'alterazione dell'equilibrio tra due tipi di grassi (diidroceramidi e ceramidi). Inoltre, tutti gli altri dati che abbiamo raccolto finora, pur mostrando una limitata alterazione dei profili di espressione proteica, evidenziano cambiamenti molto significativi e diversificati del lipidoma. Questi cambiamenti confermano ed estendono i nostri risultati precedenti e ci hanno permesso di discriminare chiaramente tra gli effetti specifici e quelli non-specifici di ETI.

Conclusioni

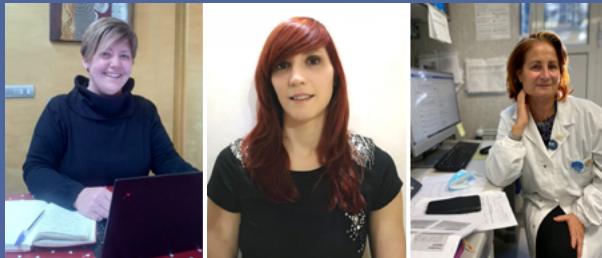
Abbiamo condotto l'indagine molecolare più dettagliata intrapresa finora del F508del-CFTR BE e abbiamo discriminato in modo specifico le alterazioni legate al recupero di CFTR da quelle legate agli effetti non specifici del farmaco. Si spera che questi risultati portino allo sviluppo di nuovi farmaci e alla delucidazione dei meccanismi alla base degli effetti avversi dell'ETI.

Appendice Progetto FFC#1/2023

Ipotizziamo che ETI sia un inibitore diretto di DEGS o che possa alterare la sua abbondanza nella cellula. DEGS è un'enzima che converte le diidroceramidi (dhCer) in ceramidi (Cer). Vogliamo indagare questa ipotesi, con l'obiettivo di comprendere i meccanismi che stanno alla base della nostra osservazione. Alla luce dei nostri dati, vogliamo anche capire l'impatto del farmaco sul fegato, studiando possibili alterazioni del rapporto dhCer/Cer e ottenere indicazioni su potenziali effetti tossici.

Linking elexacaftor/tezacaftor/ ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease

Valutazione delle proprietà antibatteriche del Kaftrio



From the left, Cristina Cigana, Daniela Girelli, Ersilia Fiscarelli

52

**Cristina Cigana¹, Daniela Girelli²,
Ersilia Fiscarelli³**

¹ Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ² Cystic Fibrosis Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - ³ Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy
(FFC#16/2021, ongoing)

Background and rationale

The CFTR modulator Kaftrio shows great promise. While it has the potential to greatly improve outcomes in people with cystic fibrosis (pwCF), marked variability in the response to treatment was reported in clinical studies.

Hypothesis and objectives

We hypothesized that Kaftrio alters the nature of *Pseudomonas aeruginosa* infection by directly affecting bacterial off-targets. We aim to identify specific bacterial genetic and phenotypic changes associated with Kaftrio treatment, which may affect antibiotic resistance and/or host response, thereby affecting the effectiveness of this new therapy.

Essential methods

Longitudinal clonally-related isolates of *P. aeruginosa*, collected from pwCF before and after Kaftrio treatment, were characterized for relevant phenotypes (mucoidy, motility, pyocyanin, protease and biofilm production) and tested for susceptibility to antibiotics by minimum inhibitory concentration assay. The impact of clonal isolates at specific stages of treatment on inflammation was evaluated using bronchial epithelial wt- and F508del-CFTR cells by ELISA. Whole genome sequencing (WGS) was performed on isolates grown for 10 days in an artificial sputum medium.

Preliminary results

We analyzed the phenotypes of 47 *P. aeruginosa* isolates from 11 pwCF. Patient-specific differences in antimicrobial susceptibility, biofilm production and impact on the host inflammatory response were observed during Kaftrio treatment. A general reduction in the motility and pyocyanin production of isolates collected during Kaftrio treatment was observed in comparison to the clonal isolates collected before treatment initiation. However, some variability was noted among clonal isolates collected concurrently. Preliminary results from WGS indicate the emergence of genetic variants during Kaftrio treatment. Ongoing analysis is exploring potential correlations between these results and clinical data.

Conclusions

To date, our results indicate patient-specific differences in *P. aeruginosa* isolates collected before and during Kaftrio treatment. Correlation analysis with clinical data will indicate whether these differences may account for varying responses to Kaftrio observed in pwCF. The overall results of this project could generate recommendations for Kaftrio use, also in combination with antibiotic treatment.

Razionale dello studio

Le nuove terapie come Kaftrio stanno dimostrando un enorme potenziale nel migliorare lo stato di salute nelle persone con fibrosi cistica (FC). Tuttavia, la risposta clinica è marcatamente variabile, suggerendo l'esistenza di meccanismi indipendenti da quelli diretti al CFTR.

Ipotesi e obiettivi

La nostra ipotesi è che Kaftrio modifichi la natura dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* agendo direttamente sui batteri, influenzando di conseguenza l'efficacia del farmaco. Il nostro obiettivo è definire se e come Kaftrio influisca sulla suscettibilità agli antibiotici e la virulenza di *P. aeruginosa*.

Metodi

Ceppi clonali di *P. aeruginosa*, isolati dagli escreti di persone con FC prima e dopo il trattamento con Kaftrio, sono stati testati per la suscettibilità agli antibiotici e caratterizzati per fenotipi rilevanti in FC, come la mucoidicità, la motilità, la produzione di biofilm e la secrezione di proteasi e piocianina. È stato valutato l'effetto di questi ceppi sullo stato infiammatorio di cellule epiteliali bronchiali con CFTR normale o omozigoti per la mutazione F508del. Inoltre, è stato sequenziato il genoma di ceppi clonali longitudinali.

Risultati preliminari

Sono stati analizzati i fenotipi di 47 ceppi di *P. aeruginosa* da 11 persone con FC. Sono state osservate differenze specifiche per ogni individuo nella suscettibilità agli antibiotici, nell'impatto sulla risposta infiammatoria delle cellule e nella produzione di biofilm dei ceppi isolati prima e durante il trattamento con Kaftrio. Inoltre, è stata osservata una riduzione generale di fattori di virulenza quali motilità e produzione di piocianina dei ceppi raccolti durante il trattamento con Kaftrio rispetto ai clonali raccolti prima dell'inizio del trattamento, nonostante un certo grado di variabilità anche tra ceppi clonali raccolti allo stesso tempo. I risultati preliminari del sequenziamento indicano che il trattamento con Kaftrio è associato alla comparsa di varianti genetiche. È in corso l'analisi di potenziali correlazioni tra questi risultati e i dati clinici.

Conclusioni

I nostri risultati indicano differenze specifiche per ogni persona con FC nei ceppi di *P. aeruginosa* raccolti prima e durante il trattamento con Kaftrio. L'analisi di correlazione con i dati clinici indicherà se queste differenze possono spiegare il diverso grado di risposta a Kaftrio riscontrato nelle persone con FC. I risultati complessivi di questo progetto potrebbero generare raccomandazioni per l'uso di Kaftrio in ambito clinico.

Early derangements of glucose tolerance in cystic fibrosis: effect of CFTR modulators

Alterazioni precoci della tolleranza al glucosio in fibrosi cistica: effetti dei modulatori di CFTR



Clockwise from the top-left: Alberto Battezzati, Carla Colombo, Andrea Mari, Maria Cristina Lucanto and Vincenzina Lucidi

53

Alberto Battezzati¹, Simona Bertoli¹, Giulia Maria De Carlo¹, Andrea Foppiani¹, Gianfranco Alicandro¹, Carla Colombo², Maria Chiara Russo², Valeria Dacco², Vincenzina Lucidi³, Fabiana Ciciriello³, Riccardo Valerio Debiase³, Anna Lisa Montemari³, Federico Alghisi³, Maria Cristina Lucanto⁴, Esterina Quattromano⁴, Simona Cristadoro⁴, Andrea Mari⁵, Roberto Bizzotto⁵, Eleonora Grespan⁵

¹ International Center for the Assessment of Nutritional Status and the development of Dietary Intervention Strategies, DeFENS, University of Milan, Italy - ² Cystic Fibrosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Milan, Italy -

³ UOC Pneumologia e Fibrosi Cistica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy - ⁴ Pediatric Gastroenterology and Cystic Fibrosis Unit, Azienda Ospedaliera Universitaria Messina, Italy - ⁵ Institute of Neuroscience, National Research Council, Padua, Italy (FFC#24/2019, concluded)

Background and rationale

Diabetes (CFRD) is a frequent and serious complication in cystic fibrosis (CF), caused by defects in insulin secretion. New modulator therapies raised the hope to prevent or treat CFRD. Current evidence does not support significant effects, but the natural history of insulin secretory defects is unclear in early life and therapy is now offered earlier.

Hypothesis and objectives

We hypothesized that CFTR modulators can ameliorate insulin secretory defects, but, in previous studies, the endocrine pancreas damage may have been too advanced for therapy to be effective. The objectives of the project are: i) to evaluate whether 1yr modulators treatment ameliorates the insulin secretory, sensitivity and glucose tolerance parameters in 6-13 years old subjects compared to conventional therapy; ii) to begin a natural history study in the carriers of mutations still not eligible for modulators.

Essential methods

In the context of a prospective multicenter study of glucose tolerance in a cohort of CF, we have assessed subjects 6-13 yr old using repeated OGTTs as previously developed, to measure the insulin secretion parameters along with clinical parameters. Subjects who become eligible to CFTR modulators have been studied at therapy onset and after 1 yr.

Results

We have shown that abnormal insulin secretion associated with high glucose response during OGTT in prepuberal people with CF predicts a decrease in adult height z-score, suggesting that insulin secretory defects in CF affect growth prior to the development of fasting hyperglycemia. We reported the distribution of OGTT-related variables in people with CF from puberty to adulthood. Data collected pre- and across puberty showed an increment in insulin secretory parameters during puberty that is not well described even in the general population.

During the project we have also found no evidence of improvements in glucose tolerance mechanisms in people with CF after one-year treatment with the CFTR modulator LUMA-IVA. Analysis is currently underway to describe the effect of different genotypes on glucose tolerance and insulin secretion (manuscript in preparation). Preliminary results show that people with CF with at least one CFTR allele with residual function have better glucose tolerance associated with better β -cell function. Analysis is currently underway to analyze prospectively the changes in parameter during the 1yr follow-up.

Conclusions

Parameters of insulin secretion are important determinants of adult height, glucose tolerance, are related to CF genotype, and are probably not easily affected by current modulator therapies.

Razionale dello studio

Il diabete in fibrosi cistica (CFRD) è una complicanza frequente e severa causata da un deficit progressivo di secrezione insulinica. Nuovi modulatori sono diventati disponibili aprendo la possibilità di prevenire o trattare il CFRD. Inizialmente non sono emersi effetti netti, ma mancano i dati nelle prime fasi della vita e oggi la terapia è offerta in età più precoce.

Ipotesi e obiettivi

Abbiamo ipotizzato che i farmaci modulatori potessero migliorare la secrezione insulinica, ma che nei primi studi la terapia sia stata somministrata in fase troppo avanzata per risultare efficace. Abbiamo quindi studiato il decorso di persone con FC tra i 6 e i 13 anni.

Metodi

Abbiamo usato due carichi orali di glucosio (OGTT) a distanza di 1 anno per identificare le alterazioni di secrezione insulinica.

Risultati

Abbiamo mostrato che una alterata secrezione insulinica associata con elevata glicemia durante l'OGTT in persone con FC in età prepuberale predice una basso z-score di altezza in età adulta, suggerendo che i difetti di secrezione insulinica influenzano la crescita prima che insorga iperglicemia. Abbiamo descritto la distribuzione di variabili collegate all'OGTT in persone con CF dalla pubertà all'età adulta. I dati relativi alla pubertà hanno mostrato un incremento di secrezione insulinica non ben descritto nemmeno nella popolazione generale. Durante il progetto non abbiamo inoltre trovato evidenza di effetti del LUMA-IVA sui parametri di secrezione dopo 1 anno di trattamento. Stiamo conducendo analisi per descrivere l'effetto del genotipo sulla tolleranza al glucosio e la secrezione di insulina (manoscritto in preparazione). I risultati preliminari mostrano che persone con FC con almeno un allele CFTR con funzionalità residua hanno migliore tolleranza al glucosio associata a migliore funzione β -cellulare. Stiamo inoltre analizzando i pazienti in follow-up di 1 anno.

Conclusioni

I parametri di secrezione insulinica sono importanti determinanti dell'altezza in età adulta, della tolleranza al glucosio, sono collegati al genotipo FC, e sono probabilmente non facilmente influenzati da terapie con modulatori.

Appendix 1

Publications from the studies funded by the Italian CF Research Foundation 2013-2023

Pubblicazioni dagli studi finanziati da FFC Ricerca dal 2013 al 2023

1. Innovative therapies to correct the basic defect and CFTR genetics

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

FFC Project #1/2013 "Mechanism of action of trimethylangelicin in rescuing F508del CFTR functional expression" Valeria Casavola (Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari)

- Rubino R, Bezzerrini V, Favia M et all "Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1" Pflugers Arch 2014 Mar 5
- Favia M. et al. "Trimethylangelicin promotes the functional rescue of mutant F508del CFTR protein in cystic fibrosis airway cells" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2014;May 9
- Abbattisciani AC. et al. "Correctors of mutant CFTR enhance subcortical cAMP/PKA signaling via ezrin phosphorylation and cytoskeleton organization" J Cell Sci, 2016 Jan 28
- Laselva O. et al. "The investigational Cystic Fibrosis drug Trimethylangelicin directly modulates CFTR by stabilizing the first membrane-spanning domain" Biochemical Pharmacology 2016 Sep 8
- Castellani S, Favia M, Guerra L et al. "Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction in cystic fibrosis airway epithelium" Histology and Histopathology, 2017 May;32(5):445-459.

FFC Project#3/2013 "ΔF508-CFTR correctors deriving from computational design and from safe natural compounds for a prompt clinical application" Mauro Mazzei (Dipartimento di Farmacia, Università di Genova), Paola Fossa (Dip. di Farmacia, Università di Genova), Maria Pascale (Dip. di Farmacia, Università del Salento)

- Nieddu E. et al. "The search for a common structural moiety among selected pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel" Future Med Chem. 2014;6(17):1857-68
- Nieddu E. et al. "Phenylhydrazones as Correctors of a Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" Arch Pharm 2016 Feb;349(2):112-23
- Marengo B, Speciale A, Senatore L et al. "Matrine in association with FD2 stimulates F508delcystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in the presence of corrector VX809" Molecular Medicine Reports 2017 Dec;16(6):8849-8853

FFC Project #6/2013 "Establishment of a semi-automated evaluation of CFTR function in blood cells for clinical applications" Claudio Sorio (Dip. di Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona), Monica Averna (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova), Mario R. Buffelli (Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona)

- Johansson J et al. "Detection of CFTR protein in human Leukocytes by Flow Cytometry" Cytometry 2014 Jul;85(7):611-20
- Ettorre M. et al. "Electrophysiological evaluation of Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) expression in human monocytes" Biochimica et Biophysica Acta vol 1840: 3088-3095

FFC Project#7/2013 "Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for cystic fibrosis and CFTR related-disorders" Giuseppe Castaldo (CEINGE-Biotecnologie Avanzate srl, Napoli)

- Terlizzi V. et al. "Genotype–phenotype correlation and functional studies in patients with cystic fibrosis bearing CFTR complex alleles" J Med Genet 2016;0:1-12

- Di Lullo AM, Scorza M, Amato F, Comegna M, Raia V "An "ex vivo model" contributing to the diagnosis and evaluation of new drugs in cystic fibrosis" Acta Otorhinolaryngologica Italica 2017 Jun;37(3):207-213

FFC Project #1/2014 "Identification and validation of novel molecules obtained by integrated computational and experimental approaches for the read-through of PTCs in CF cells" Laura Lentini (Dip. di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie -STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università di Palermo), Ivana Pibiri (Dip. di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università di Palermo)

- Pibiri I. et al. "Enhancement of premature stop codon readthrough in the CFTR gene by Ataluren (PTC124) derivatives" Eur J Med Chem. 2015 Aug 28;101:236-44
- Pibiri I. et al. "Exploring the readthrough of nonsense mutations by non-acidic Ataluren analogues selected by ligand-based virtual screening" European Journal of Medicinal Chemistry 2016 Oct 21;122:429-35
- Lentini L, Melfi R, Cancemi P et al. "Caffeine boosts Ataluren's readthrough activity" Heliyon 2019 Jun 21;5(6):e01963

FFC Project #2/2014 "A systems biology approach to the correction of Cystic Fibrosis: from building a network of proteostasis regulatory pathways to combinatorial targeting. (A rational approach to develop novel drugs for the treatment of Cystic Fibrosis)" Alberto Luini (Centro Nazionale Ricerche, Dip. di Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli)

- Hegde RN. et al. "Unravelling druggable signalling networks that control F508del-CFTR proteostasis" Elife, 2015 Dec 23;4

FFC Project#4/2014 "The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR): correctors sites" Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

- Pollock NL et al. "Structure of wild type and mutant F508del CFTR: A small-angle X-ray scattering study of the protein-detergent complexes" J Struct Biol. 2016 Apr;194(1):102-11
- Moran O. "The biophysics, biochemistry and physiology of CFTR" Cell and molecular life sciences 2017 Jan;74(1):1-2
- Moran O. "The gating of the CFTR channel" Cell and molecular life sciences 2017; 74: 85-92

FFC Project#5/2014 "An RNA based approach based on Ex-SpeU1 for correction of CFTR splicing defects: analysis of efficacy in primary bronchial cells" Franco Pagani (Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie ICIGEB, Trieste)

- Balestra D, Scaletti D, Pagani F et al. "An Exon-Specific U1snRNA Induces a Robust Factor IX Activity in Mice Expressing Multiple Human FIX Splicing Mutants" Molecular Therapy Nucleic Acids, 2016 Oct 4;5(10):e370
- Rogalska ME, Tajnik M, Licastro D et al. "Therapeutic activity of modified U1 core spliceosomal particles" Nature Communications, 2016; 7: 11168.

FFC Project#6/2014 "Development of novel methodologies for the identification of CFTR-targeted drugs: a multidisciplinary approach using Real Time Surface Plasmon Resonance interaction assay supported by bioinformatics strategies on HPC infrastructures" Marco Rusnati (Dip. di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Unità Analisi Interazione Macromolecolare-Sez. di Oncologia Sperimentale e Immunologia), Paola Fossa (Dip. di Farmacia, Genova), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate-Milano)

- Rusnati M, Sala D, Orro A et all. "Speeding Up the Identification of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Targeted Drugs: An Approach Based on Bioinformatics Strategies and Surface Plasmon Resonance" *Molecules* 2018 Jan 8;23(1).
- Fossa P "Studi strutturistici sulla proteina CFTR: opportunità e prospettive" *La chimica e l'industria*, gen/feb 2019, n.1, anno 2, pp. 48-51

FFC Project#7/2014 "A kinase-directed approach to rescue functionality of F508del CFTR" Andrea Venerando (Dip. Scienze Biomediche, Università di Padova), Valeria Rachela Villella (IERFC, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto San Raffaele, Milano)

- Ibrahim SH, Turner MJ, Saint-Criq V et all "CK2 is a key regulator of SLC4A2-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in human airway epithelia" *European Journal of Physiology* 2017 Sep;469(9):1073-1091.

FFC Project#8/2014 "Design and synthesis of improved analogs of trimethylangelicin (TMA) for personalized treatment of cystic fibrosis" Roberto Gambari (Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologie, Sez. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara) Adriana Chilin (Dip. di Farmaceutica e Scienze Farmacologiche, Università di Padova)

- Gambari R, Breveglieri G, Salvatori F et al. "Therapy for Cystic Fibrosis Caused by Nonsense Mutations" *Intech Open* 2015, 309-326

FFC Project#9/2014 "Cystic fibrosis modifier genes related to Pseudomonas aeruginosa lung disease" Alessandra Bragonzi (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Iraqi Fuad (Clinical Microbiology and Immunology, Tel Aviv University)

- Lorè NI. et al. "Host genetic diversity influences the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the Collaborative Cross mice" *BMC Genet.* 2015 Aug 28;16:106

FFC Project#26/2014 "Impaired secretory IgA and mucosal immunity in cystic fibrosis: contribution to lung pathology and impaired defence against bacterial infection, and role of CFTR-related epithelial changes in the regulation of the receptor-mediated IgA transcytosis" Charles Pilette (Université Catholique de Louvain, Brussels), Virginia De Rose (Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino)

- Collin AM, Lecocq M, Noel S et al, "Lung immunoglobulin A immunity dysregulation in cystic fibrosis" *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:102974.

FFC Project#1/2015 "Relationship between mitochondria and F508del-CFTR in Cystic Fibrosis" Anna Atlante (IBBE Istituto delle Biomembrane e Bioenergetica, CNR Bari)

- Atlante A. et al. "Mitochondria and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dialogue: Some News" *J Bioenerg Biomembr*
- De Bari L, Favia M, Bobba A et all. "Aberrant GSH reductase and NOX activities concur with defective CFTR to pro-oxidative imbalance in cystic fibrosis airways" *J Bioenerg Biomembr* 2018 Mar 9.
- Favia M, de Bari L, Lassandro R et al. "Modulation of glucose-related metabolic pathways controls glucose level in airway surface liquid and fight oxidative stress in cystic fibrosis cells" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2019 Apr 27

FFC Project#2/2015 "RNF5/RMA1 ubiquitin ligase as a drug target for mutant CFTR rescue" Andrea Cavalli (Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie Università di Bologna) Nicoletta Pedemonte (U.O.C. Genetica Medica Istituto G. Gaslini, Genova)

- Li H, Pesce M, Sheppard DN et al "Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: From discovery to drug development" *J Cyst Fibros.* 2018 Mar;17(2S):S14-S21
- Tomati V, Caci E, Ferrera L et al. "Thymosin α -1 does not correct F508del-CFTR in cystic fibrosis airway epithelia" *JCI Insight* 2018 Feb 8;3(3)
- Ashiqul Haque AKM, Dewerth A, Antony JS et al. "Chemically modified hCFTR mRNAs recuperate lung function in a mouse model of cystic fibrosis" *SCI REP* 2018 Nov 13;8(1):16776
- Sondo E, Pesce E, Tomati V et al. "RNF5, DAB2 and Friends: Novel Drug Targets for Cystic Fibrosis" *Current Pharmaceutical Design* 2017;23(1):176-186

FFC Project#5/2015 "The plant cytokine kinetin and its analogues as potential therapeutic agents to correct CFTR splicing defects" Stefano Duga (Università Humanitas, Milano), Lucy Costantino (UOS Lab. di Genetica Medica Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Christian Orrenius (Computational Sciences Chemical Core Technologies Department Nerviano Medical Sciences Srl, Nerviano, Milano)

- Straniero L, Soldà G, Costantino L et al. "Whole-gene CFTR sequencing combined with digital RT-PCR improves genetic diagnosis of cystic fibrosis" *J Hum Genet* 2016 Dec;61(12):977-984

FFC Project#7/2015 "Aminoarylthiazole derivatives as correctors of the chloride transport defect in novel cystic fibrosis: computer assisted drug design, synthesis and biological evaluation" Enrico Millo (CEBR, Centro Eccellenza Ricerca Biomedica, Università di Genova), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Sezione di Chimica Medica Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche, Università di Genova)

- Liessi N, Cichero E, Pesce E et al. "Synthesis and biological evaluation of novel thiazole-VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors by QSAR-based filtering tools" *Eur J Med Chem.* 2017 Dec 8;144:179-200.

FFC Project#8/2015 "Dissecting the role of TG2 in cystic fibrosis pathogenesis: identification of possible novel therapeutic targets" Mauro Piacentini (Dipartimento di Biologia Università di Tor Vergata, Roma), Luigi Maiuri (IERFC, Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Diaz-Hidalgo L. et al. "Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions" *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 (2016) 2084–2092
- Antonioli M. et al. "Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy" *Trends in Biochemical Sciences* 2016 Oct 17
- Rossin F, Villella V, D'Eletto M et all "TG2 regulates the heat shock response by the post-translational modification of HSF1", *Embo Reports*, 2018 May 11
- Maiuri L, Raia V, Piacentini M et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and autophagy: hereditary defects in cystic fibrosis versus gluten-mediated inhibition in celiac disease" *Oncotarget*, 2019 Jul 8;10(43):4492-4500

FFC Project#9/2015 "Identification of molecular targets to reduce the side effect of gating potentiators on the F508del-CFTR plasma membrane stability" Anna Tamanini (Laboratorio di Patologia Molecolare, UOC Laboratorio Analisi sede di Borgo Trento, Dipartimento di Patologia e Diagnostica Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona), Massimo Aureli (Dip. di Biotecnologia Medica e Medicina Traslazionale Università di Milano)

- Schiumarini D, Loberto N, Mancini G et all. "Evidence for the involvement of lipid rafts and plasma membrane sphingolipid-hydrolases in *Pseudomonas aeruginosa* infection of cystic fibrosis bronchial epithelial cells" *Mediators of Inflammation*, 2017;2017:1730245

FFC Project#1/2016 “New generation trimethylangelicin (TMA) analogues for selective modulation of defective CFTR or inflammation” Adriana Chilin (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova)

- Lampronti I, Manzzone MG, Sacchetti G et all “Differential Effects of Angelicines Analogues on NF- κ B activity and IL-8 expression in cystic fibrosis IB3-1cells” *Mediators of Inflammation*, Volume 2017 (2017), Article ID 2389487
- Laselva O, Marzaro G, Vaccarin C et all. “Molecular mechanism of action of Trimethylangelicin derivatives as CFTR modulators” *Frontiers in Pharmacology* 2018, July 4
- Marzaro G, Lampronti I, D’Aversa E et all “Design, synthesis and biological evaluation of novel trimethylangelicin analogues targeting nuclear factor kB (NF- κ B)” *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018 May 10;151:285-293
- Vaccarin V, Gabbia D, Franceschinis E et al. “Improved Trimethylangelicin Analogs for Cystic Fibrosis: Design, Synthesis and Preliminary Screening” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11528.

FFC Project#3/2016 “MicroRNA Therapeutics in CF: Targeting CFTR and inflammation networks (MicroRNA-CF)” Roberto Gambari (Dipartimento di Scienze della vita e Biotecnologie, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara), Roberto Corradini (Dipartimento di Chimica, Università di Parma)

- Lampronti A, Finotti A, Bianchi N et all “Natural substances in the treatment of cystic fibrosis” *Clinical Immunology, Endocrine and Metabolic Drugs* 2016, 3, 130-139
- Fabbri E, Tamanini A, Jakova T et all. “A Peptide Nucleic Acid against MicroRNA miR-145-5p Enhances the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in Calu-3 Cells” *Molecules* 2017 Dec 29;23(1)
- Finotti A, Gasparello J, Fabbri E et al. “Enhancing the expression of CFTR using antisense molecules against microRNA miR-145-5p” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2019 Feb 27.
- Gasparello J, Papi C, Zurlo M et al. “Demonstrating specificity of bioactive peptide nucleic acids (PNAs) targeting microRNAs for practical laboratory classes of applied biochemistry and pharmacology” *PLoS ONE* 2019 Sep 11;14(9):e0221923

FFC Project#5/2016 “Implementation of a new imaged-controlled sweat test for in vivo quantification of CFTR function: value for diagnosis and efficacy of new therapies” Teresinha Leal (Louvain Center for Toxicology and Applied Pharmacology, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique; Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium), Stefano Ceri (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, Università di Milano); Nguyen-Khoa Thao (Necker-Enfants Malades Hospital, AP-HP Laboratory of General Biochemistry, Paris)

- Bergamini G, Tridello G, Calcaterra E et all “Ratiometric sweat secretion optical test in cystic fibrosis, carriers and healthy subjects” *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018 Mar;17(2):186-189
- Treggiari D, Kleinfelder K, Bertini M et al. “Optical Measurements of Sweat for in vivo Quantification of CFTR Function in Individual Sweat Glands” *J Cyst Fibros.* 2021 Sep;20(5):824-827.

FFC Project#6/2016 “Understanding the mode of action of regulatory pathways controlling F508del-CFTR proteostasis and developing drugs that rescue F508del-CFTR by targeting these pathways synergistically” Alberto Luini (Consiglio Nazionale delle Ricerche, Dipartimento Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli)

- Hedge RN, Subramanian A, Pothukuchi P et al. “Rare ER protein misfolding-mistrafficking disorders: Therapeutic developments” *Tissue and Cell* 2017 Apr;49(2 Pt A):175-185
- Subramanian A, Capalbo A, Iyengar NR et al. “Auto-regulation of Secretory Flux by Sensing and Responding to the Folded Cargo Protein Load in the Endoplasmic Reticulum” *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1461-1476.e23.

FFC Project#8/2016 “Identification of the binding sites of CFTR correctors” Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

- Amico G, Brandas C, Moran O et al. “Unravelling the Regions of Mutant F508del-CFTR More Susceptible to the Action of Four Cystic Fibrosis Correctors” *Int. J. Mol. Sci.* 2019 Nov 1;20(21)

FFC Project#10/2016 “Modulation of proteinkinase CK2 in the regulation of chaperone machinery leading the F508del-CFTR fate” Mauro Salvi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova)

- Franchin C, Borgo C, Cesaro L et all “Re-evaluation of protein kinase CK2 pleiotropy: new insights provided by a phosphoproteomics analysis of CK2 knockout cells” *Cellular and Molecular Life Sciences* 2018 Jun;75(11):2011-2026.
- Borgo C, Vilardell J, Travain-Bosello V et all. “Dependence of HSP27 cellular level on protein kinase CK2 discloses novel therapeutic strategies” *BBA General Subjects* 2018 Dec;1862(12):2902-2910

FFC Project#11/2016 “Myriocin potential as a phenotype-modifying therapeutic in cystic fibrosis” Paola Signorelli (Dipartimento di Scienze della Salute, Ospedale San Paolo, Università di Milano)

- Caretti A, Vasso M, Bonezzi FT et all “Myriocin treatment of CF lung infection and inflammation: complex analyses for enigmatic lipids” *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2017 Aug;390(8):775-790.
- Dei Cas M, Zulueta A, Mingione A et al. “An Innovative Lipidomic Workflow to Investigate the Lipid Profile in a Cystic Fibrosis Cell Line” *Cells* 2020 May; 9(5): 1197
- Mingione A, Dei Cas M, Bonezzi F et al. “Inhibition of Sphingolipid synthesis as a phenotype-modifying therapy in cystic fibrosis” *Cellular Physiology and Biochemistry* 2020 Jan 31;54(1):110-125
- Mingione A, Ottaviano E, Barcella M et al. “Cystic Fibrosis Defective Response to Infection Involves Autophagy and Lipid Metabolism” *Cells* 2020 Aug 6;9(8):E1845
- Signorelli P, Pivari F, Barcella M et al. “Myriocin modulates the altered lipid metabolism and storage in cystic fibrosis” *Cell Signal.* 2021 May;81:109928.

FFC Project#12/2016 “Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate” Loretta Ferrera (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “G. Gaslini”, Genova)

- Ferrera L, Baroni D, Moran O “Lumacaftor-rescued F508del-CFTR has a modified bicarbonate permeability” *Journal of Cystic Fibrosis* 2019 Feb 6

FFC Project#1/2017 “SpliceFix: fixing splicing defects in the CFTR gene through CRISPR/Cas9 technology” Anna Cereseto (Centro per la Biologia Integrata CIBIO, Università degli Studi di Trento), Zeger Debyser (Lab. for Molecular Virology & Gene Therapy, Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, KU Leuven); Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, CNR, Trento)

- Maule G, Casini A, Montagna C et al. “Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing” *Nature Communications*, 2019 Aug 7;10(1):3556.
- Maule G, D’Arosio D, Cereseto “Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing” *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(11), 3903

FFC Project#2/2017 “Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue” Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Pesce E, Sondo E, Ferrera L et al. “The Autophagy Inhibitor Spautin-1 Antagonizes Rescue of Mutant CFTR Through an Autophagy-Independent and USP13-Mediated Mechanism” *Frontiers in Pharmacology* 2018 Dec 13;9:1464

FFC Project#3/2017 “Optimization of a new lead promoting the readthrough of nonsense mutations for the CFTR rescue in human CF cells” Laura Lentini (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Sez. Biologia Cellulare, Università degli Studi di Palermo), Ivana Pibiri (Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Sez. Biochimica, Università degli Studi di Palermo)

- Pibiri I, Lentini L, Melfi R et all. “Rescuing the CFTR protein function: Introducing 1,3,4-oxadiazoles as translational *readthrough* inducing drugs” European Journal of Medicinal Chemistry 2018 Nov 5;159:126-142.
- Campofelice A, Lentini L, Di Leonardo A et al. “Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational *Readthrough*-Inducing Drugs (TRIDs)” Molecular Science 2019 Jul 6;20(13).
- Tutone M, Pibiri I, Lentini L et al. “Deciphering the Nonsense *Readthrough* Mechanism of Action of Ataluren: An *in silico* Compared Study” ACS Medicinal Chemistry Letters 2019 Feb 7;10(4):522-527
- Melfi R, Cancemi P, Chiavetta R et al. “Investigating REPAIRv2 as a Tool to Edit CFTR mRNA with Premature Stop Codons” International Journal of Molecular Sciences 2020 Jul;21(13): 4781
- Pibiri I, Melfi R, Tutone M et al. “Targeting Nonsense: Optimization of 1,2,4-Oxadiazole TRIDs to Rescue CFTR Expression and Functionality in Cystic Fibrosis Cell Model Systems International” Journal of Molecular Sciences 2020 Sep 3;21(17):E6420
- Tutone M, Pibiri I, Perriera R et al. “Pharmacophore-Based Design of New Chemical Scaffolds as Translational *Readthrough*-Inducing Drugs (TRIDs)” ACS Med. Chem. Lett. 2020, 11, 5, 747-753

FFC Project#6/2017 “Pharmacophore and pharmacokinetic filtering tools guiding for the design and synthesis of novel thiazole-containing and VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors” Enrico Millo (Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica CEBR, Università degli Studi di Genova), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Sezione di Chimica Medica Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche, Università di Genova)

- Parodi A, Righetti G, Pesce E et al. “Discovery of novel VX-809 hybrid derivatives as F508del-CFTR correctors by molecular modeling, chemical synthesis and biological assays” European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 208, 15 December 2020, 112833
- Liessi N, Pesce E, Salis A et al. “Synthesis and Structure-activity Relationship of Aminoarylthiazole Derivatives as Potential Potentiators of the Chloride Transport Defect in Cystic Fibrosis” Med Chem. 2021;17(6):646-657.
- Righetti G, Casale M, Liessi N et al. “Molecular Docking and QSAR Studies as Computational Tools Exploring the Rescue Ability of F508del CFTR Correctors” Int J Mol Sci. 2020 Oct 29;21(21):8084.
- Righetti G, Casale M, Tonelli M et al. “New Insights into the Binding Features of F508del CFTR Potentiators: A Molecular Docking, Pharmacophore Mapping and QSAR Analysis Approach” Pharmaceuticals (Basel). 2020 Dec 4;13(12):445.
- Parodi A, Righetti G, Pesce E et al. “Journey on VX-809-based hybrid derivatives towards drug-like F508del-CFTR correctors: from molecular modeling to chemical synthesis and biological assays” Pharmaceuticals (Basel) 2022 Feb 23;15(3):274.

FFC Project#8/2017 “A novel Full Thickness Cystic Fibrosis model on a microfluidic chip to study pathogenic mechanisms and evaluate therapeutic strategies” Paolo Netti (Centro per Biomateriali avanzati per la Sanità CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia, Napoli), Diego di Bernardo (Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università degli Studi di Napoli Federico II)

- Genovese M, Borrelli A, Venturini A et al. “TRPV4 and purinergic receptor signalling pathways are separately linked in airway epithelia to CFTR and TMEM16A chloride channels” Journal of Physiology 2019 Oct 17
- Mazio C, Scognamiglio LS, De Cegli R et al. “Intrinsic Abnormalities of Cystic Fibrosis Airway Connective Tissue Revealed by an *In vitro* 3D Stromal Model” Cells 2020 Jun 1;9(6):1371.

FFC Project#9/2017 “RNF5 inhibitors as potential drugs for Cystic Fibrosis basic defect” Nicoletta Pedemonte (Istituto “G. Gaslini”, U.O.C. Genetica Medica, Genova), Andrea Cavalli (Dip. di Farmacia e Biotecnologie, Università degli Studi di Bologna)

- Amaral DM, Hutt DM, Tomati V et al. “CFTR processing, trafficking and interactions” Journal of Cystic Fibrosis 2020 Mar;19 Suppl 1:S33-S36
- Lopes-Pacheco M, Pedemonte N, Kicic A “Editorial: emerging therapeutic approaches for cystic fibrosis” Frontiers in Pharmacology, 2019 Nov 29;10:1440
- Pesce E, Pedemonte N, Leoni A et al. “Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives on basic defects underlying cystic fibrosis” Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2020 Aug 9;30(21):127473

FFC Project#10/2017 “Alternative strategies for F508del-CFTR repair: novel targets for drug discovery approach in cystic fibrosis” Giorgio Cozza (Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova), Antonella Tosco (Dip. di Scienze mediche traslazionali, Università di Napoli Federico II, Centro Regionale Fibrosi Cistica); Eleonora Ferrari (IERFC presso Istituto San Raffaele, Milano)

- Purzner T, Purzner J, Buckstaff T et all “Developmental phosphoproteomics identifies the kinase CK2 as a driver of Hedgehog signaling and a therapeutic target in medulloblastoma” Science Signaling 2018 Sep 11;11(547).
- Cozza G, Zonta F, Dalle Vedove A et al “Biochemical and cellular mechanism of protein kinase CK2 inhibition by deceptive curcumins” FEBS J 2019 Oct 29

FFC Project#12/2017 “Modulation of protein kinases in the regulation of chaperone machinery leading F508del-CFTR fate” Mauro Salvi (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova)

- D’Amore C, Salizzato V, Borgo C et al. “A Journey through the Cytoskeleton with Protein Kinase CK2” Curr Protein Pept Sci 2019 20(6):547-562.
- D’Amore C, Borgo C, Bosello-Travaini V et al. “Deciphering the role of protein kinase CK2 in the maturation/stability of F508del-CFTR” BBA Molecular Basis of Disease 2020 Mar 1;1866(3):165611

FFC Project#1/2018 “Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF” Andrea Armirotti (Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)

- Braccia C, Tomati V, Caci E et al. “SWATH label-free proteomics for cystic fibrosis research” Journal of Cystic Fibrosis, 2018 Oct 19
- Armirotti A, Tomati V, Matthes E et al. “Bioactive Thymosin Alpha-1 Does Not Influence F508del-CFTR Maturation and Activity” SCI REP 2019 Jul 16;9(1):10310
- Liessi N, Pedemonte N, Armirotti A et al. “ArnT inhibitors for Cystic Fibrosis Research” International Journal of Molecular Sciences, 2020 Aug; 21(15): 5439
- Liessi N, Pedemonte N, Armirotti A et al. “Proteomics and Metabolomics for Cystic Fibrosis Research” Int J Mol Sci. 2020 Jul 30;21(15):5439.

FFC Project#2/2018 “Lipid-based therapeutic strategies to optimize the effectiveness of innovative drugs to rescue F508del-CFTR” Massimo Aureli (Università di Milano, Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale), Anna Tamanini (Lab. Patol. Molecolare, UOC Laboratorio Analisi, Dip. Patologia e Diagnostica, AOUI Verona)

- Loberto N, Mancini G, Bassi R et al. “Sphingolipids and plasma membrane hydrolases in human primary bronchial cells during differentiation and their altered patterns in cystic fibrosis” Glycoconjugate Journal, 2020 Jul 14.
- Mancini G, Loberto N, Olioso D et al. “GM1 as Adjuvant of Innovative Therapies for Cystic Fibrosis Disease” International Journal of Molecular Sciences 2020 Jun 24;21(12):4486

FFC Project#4/2018 "Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems" Paola Barraja (Università degli Studi di Palermo, Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche STEBICEF, Lab. Sintesi degli Eterocicli), Paolo Scudieri (Telethon Institute of Genetics and Medicine, TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Carbone A, Montalbano A, Musante I et al. "Furocoumarins as multi-target agents in the treatment of cystic fibrosis" European Journal of Medicinal Chemistry (2019), 180, 283
- Spanò V, Barreca M, Cilibri V et al. "Evaluation of Fused Pyrrolo-thiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein" Molecules. 2021 Feb 26;26(5):1275.
- Spanò V, Venturini A, Genovese M et al. "Current development of CFTR potentiators in the last decade" Eur. J. Med. Chem., (2020), 204, 112631.
- Spanò V, Montalbano A, Carbone A et al. "An overview on chemical structures as ΔF508-CFTR correctors" Eur. J. Med. Chem., (2019), 180, 430-448.

FFC Project#3/2018 "Dissecting the rescue mechanisms mediated by CFTR correctors" Debora Baroni (Ist. Biofisica, CNR, Genova)

- Brandas C, Ludovico A, Parodi A et al. "NBD2 Is Required for the Rescue of Mutant F508del CFTR by a Thiazole-Based Molecule: A Class II Corrector for the Multi-Drug Therapy of Cystic Fibrosis" Biomolecules. 2021 Oct; 11(10): 1417

FFC Project#6/2018 "Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis" Luca Frulloni (Università degli Studi di Verona, Dip. Medicina, Unità di Gastroenterologia), Vincenzina Lucidi (Ospedale Bambino Gesù, Roma); Hugo de Jonge (Dept. of Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands)

- Caldrer S, Bergamini G, Sandri A et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functional evaluations in a G542X+/IVS8Tn: T7/9 patient with acute recurrent pancreatitis" World Journal of Clinical Cases, 2019 Nov 26;7(22):3757-3764

FFC Project#7/2018 "Revealing the microRNAs-transcription factors network in cystic fibrosis: from microRNA therapeutics to precision medicine (CF-miRNA-THER)" Roberto Gambari (Università degli Studi di Ferrara, Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologia, Sez. Biochimica e Biologia molecolare), Roberto Corradini (Università degli Studi di Parma, Dip. di Chimica, Scienze della Vita e Sostenibilità ambientale)

- Finotti A, Fabbri E, Lampronti I et al. "MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in Genetic Diseases" Molecular Diagnosis & Therapy, 2019 Jan 4.
- Gasparello J, Manicardi A, Casnati A et al. "Efficient cell penetration and delivery of peptide nucleic acids by an argininocalix[4] arene" SCI REP 2019 Feb 28;9(1):3036.
- Manicardi A, Gambari Rde Cola et al. "Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine" Methods in Mol Biol 2018;1811:49-63.
- Gambari R "Targeting microRNAs in Cystic Fibrosis (CF)" International Journal of Molecular Medicine 44: supplement, 2019, page S22
- Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. "Peptide Nucleic Acids for MicroRNAs Targeting" Methods in Mol Biol. submitted
- Sultan S, Fabbri E, Tamanini A et al. "A PNA-based masking strategy for CFTR upregulation by targeting miR-145-5p binding sites of CFTR mRNA" International Journal of Molecular Medicine 44: supplement, 2019, page S22
- Manicardi A, Gambri R, de Cola et al. "Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine" Methods in Mol Biol, 2018;1811:49-63.
- Fabbri E, Tamanini A, Jakova T et al. "Treatment of human airway epithelial Calu-3 cells with a peptide-nucleic acid (PNA) targeting the microRNA miR-101-3p is associated with increased expression of the cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator () gene" European Journal of Medicinal Chemistry, 2 October 2020, 112876

- Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. "Peptide Nucleic Acids for MicroRNA Targeting" Methods Mol Biol. 2020;2105:199-215
- Gasparello J, Lomazzi M, Papi C et al. "Efficient delivery of MicroRNA and AntimiRNA molecules using an Argininocalix[4] arene macrocycle" Molecular Therapy Nucleic Acids 2019 Dec 6;18:748-763
- Sultan S, Rozzi A, Gasparello J et al. "A Peptide Nucleic Acid (PNA) Masking the miR-145-5p Binding Site of the 30UTR of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) mRNA Enhances CFTR Expression in Calu-3 Cells" Molecules 2020 Apr 5;25(7):1677
- Tamanini A, Fabbri E, Jakova T et al. "A Peptide-Nucleic Acid Targeting miR-335-5p Enhances Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene with the Possible Involvement of the CFTR Scaffolding Protein NHERF1" Biomedicines. 2021 Jan 26;9(2):117.
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" Front Immunol. 2020 Aug 4;11:1438.
- Papi C, Gasparello J, Zurlo M et al. "Combined Treatment of Bronchial Epithelial Calu-3 Cells with Peptide Nucleic Acids Targeting miR-145-5p and miR-101-3p: Synergistic Enhancement of the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene" Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 9348.
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. "Overview of CF lung pathophysiology" Curr Opin Pharmacol. 2022 Jun;64:102214.

FFC Project#8/2018 "In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3Kγ-mediated regulation of CFTR" Emilio Hirsch (Università degli Studi di Torino, Dip. Biotecnologia molecolare e Scienze per la Salute, Centro di Biotecnologia Molecolare)

- Sala V, Murabito A, Ghigo A "Inhaled Biologicals for the Treatment of Cystic Fibrosis" Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2019;13(1):19-26
- Sala V, Della Sala A, Ghigo A et al. "Roles of phosphatidyl inositol 3 kinase gamma (PI3K γ) in respiratory diseases" Cell Stress. 2021 Mar 8;5(4):40-51.

FFC Project#9/2018 "Therapeutic potential of a long-acting lung-specific DNase (DNase2b) for the treatment of CF" Gianfranco Pasut (Università degli Studi di Padova, Dip. Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche), Riccardo Percudani (Università degli Studi di Parma, Dip. Scienze Chimiche, della Vita, e della Sostenibilità ambientale)

- Delfino D, Mori G, Rivetti C et al. "Actin-Resistant DNase1L2 as a Potential Therapeutics for CF Lung Disease" Biomolecules. 2021 Mar 10;11(3):410.
- Mori G, Delfino D, Pibiri P et al. "Origin and significance of the human DNase repertoire" Sci Rep. 2022 Jun 20;12(1):10364.

FFC Project#10/2018 "Dissecting the mechanism of action of the TG2 inhibitor cysteamine on Cystic Fibrosis" Mauro Piacentini (Università Roma Tor Vergata, Dip. Biologia), Luigi Maiuri (Istituto Europeo Ricerca Fibrosi Cistica IERFC c/o Istituto San Raffaele, Milano), Giovanni Delogu (Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Gemelli, Istituto di Microbiologia, Roma)

- Villella VR, Esposito S, Ferrari E et al. "Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis" Cell Death and Disease, 2019 Mar 15;10(4):258
- Esposito S, Villella VR, Ferrari E et al. "Genistein antagonizes gliadin-induced CFTR malfunction in models of celiac disease" Aging 2019 Apr 12
- Villella VR, Speranza E, Ferrari E et al. "Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis" Cell Death and Disease (2019) 10:258
- Di Rienzo M, Mauro Piacentini M, Fimia GM "A TRIM32-AMBRA1-ULK1 complex initiates the autophagy response in atrophic muscle cells" Autophagy. 2019 Sep;15(9):1674-1676
- Di Rienzo M, Romagnoli A, Antonioli M "TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses" Cell Death Differ. 2020 Mar;27(3):887-902

FFC Project#11/2018 “Rescuing defective CFTR applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays” Marco Rusnati (Università degli Studi di Brescia, Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Sez. Oncologia e Immunologia), Paola Fossa (Università degli Studi di Genova, Dip. di Farmacia), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie biomediche, CNR, Milano)

- D’Ursi et al. “Exploitation of a novel biosensor based on the full-length human F508del-CFTR with computational studies, biochemical and biological assays for the characterization of a new Lumacaftor/Tezacaftor analogue” *Sensor and Actuators B: Chemical*, 2019 301:127131

FFC Project#13/2018 “Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic” Claudio Sorio (Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina)

- Caldrer S, Bergamini G, Sandri A et al. “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functional evaluations in a G542X+/IVS8Tn:T7/9 patient with acute recurrent pancreatitis” *World Journal of Clinical Cases*, submitted
- Conti C, Sorio S and Melotti 2 P “Organoid Technology and Its Role for Therotyping Applications in Cystic Fibrosis” *Children (Basel)*. 2022 Dec 20;10(1):4.
- Kleinfelder K, Elena Somenza E, Farinazzo A et al. “CFTR Modulators Rescue the Activity of CFTR in Colonoids Expressing the Complex Allele p.[R74W;V201M;D1270N]/dele22_24” *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 8;24(6):5199.

FFC Project#1/2019 “Proteomic profiling of F508del-CFTR cells to identify new pharmacological targets for CF” Andrea Armirotti (Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova)

- Braccia C, Christopher JA, Crook OM et al. “CFTR Rescue by Lumacaftor (VX-809) Induces an Extensive Reorganization of Mitochondria in the Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium” *Cells* 2022, 11, 1938

FFC Project#2/2019 “Bridging airway mucus-microbiota-host genotype to define novel cystic fibrosis animal models” Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Giacomo Rossi (Università di Camerino, Sez. di Patologia Veterinaria)

- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. “Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for *Pseudomonas aeruginosa*” *European Respiratory Journal*, 2019 Oct 17

FFC Project#3/2019 “Harnessing CRISPR/Cas9 technology to revert F508del-CFTR defect” Anna Cereseto (Centro per la Biologia Integrata CIBIO, Università degli Studi di Trento), Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, CNR, Trento)

- Maule G, Arosio D and Cereseto A, “Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing”, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(11), 3903
- Maule G, Ensincic M, Bulcaenc M “Rewriting CFTR to cure cystic fibrosis” *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 182 (2021): 185-224
- Amistaldi S, Maule G, Ciciani M et al. “Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor”, *Mol Ther.* 2023 Mar 8;S1525-0016(23)00125-9.

FFC Project#4/2019 “Restoring defective proteostasis in Cystic Fibrosis: novel strategies for F508del-CFTR repair” Giorgio Cozza (Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. Chimica Biologica)

- Zanin S, Molinari S, Cozza G et al. “Intracellular protein kinase CK2 inhibition by ferulic acid-based trimodal nanodevice” *Int Biol Macromol*, 2020 Sep 30;165(Pt A):701-712

FFC Project#6/2019 “Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue” Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Scudieri P, Musante I, Venturini A et al. “Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells” *Cells* 2020 Sep 13;9(9):2090
- Venturini A, Borrelli A, Musante I et al. “Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11972.
- Galietta LJV “TMEM16A (ANO1) as a therapeutic target in cystic fibrosis” *Curr Opin Pharmacol.* 2022 Jun;64:102206.

FFC Project#8/2019 “Antimicrobial peptides from amphibian skin for treatment of lung pathology in cystic fibrosis: advanced in vitro and in vivo functional characterization” Maria Luisa Mangoni (Università La Sapienza Roma, Dip. di Scienze Biochimiche, Lab. di Peptidi Bioattivi)

- Cappiello F, Carnicelli V, Casciaro B et al. “Antipseudomonal and Immunomodulatory Properties of Esc Peptides: Promising Features for Treatment of Chronic Infectious Diseases and Inflammation” *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 8;22(2):557.
- Ferrera L, Cappiello F, Loffredo MR et al. “Esc peptides as novel potentiatotrs of defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an unprecedented property of antimicrobial peptides” *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021 Dec 31;79(1):67.

FFC Project#10/2019 “Rescuing defective CFTR-F508del applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays” Marco Rusnati (Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale Sez. di Oncologia e Immunologia, Università di Brescia), Paola Fossa (Università di Genova, Dip. di Farmacia, Sez. di Chimica del Farmaco e del prodotto cosmetico), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Milano)

- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20)
- Rusnati M, D’Ursi P, Pedemonte N et al. “Recent Strategic Advances in CFTR Drug Discovery: An Overview” *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 31;21(7):2407.
- Orro A, Uggeri M, Rusnati M et al. “*In silico* drug repositioning on F508del-CFTR: A proof-of-concept study on the AIFA library” *Eur J Med Chem.* 2021 Mar 5;213:113186.
- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20), 12274

FFC Project#11/2019 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)

- Salvi M “Non-Histone Protein Methylation: Molecular Mechanisms and Physiopathological Relevance” *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(7):640-641
- D’Amore C, Borgo G, Salvi M “A mutational approach to dissect the functional role of the putative CFTR “PTM-CODE”” *J Cyst Fibros.* 2021 Sep;20(5):891-894.
- Borgo C, D’Amore C, Sarno S et al. “Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases” *Signal Transduct Target Ther.* 2021 May 17;6(1):183.
- D’Amore C, Borgo C, Bosello Travain V et al. “KDM2A and KDM3B as Potential Targets for the Rescue of F508del-CFTR” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9612.

FFC Project#12/2019 “Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX-770” Monica Averna (Università di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale), Emilio Marengo (Università del Piemonte Orientale, Dip. di Scienze e Innovazione Tecnologica, Torino)

- Pedrazzi M, Vercellone S, Barberis E et al. “Identification of Potential Leukocyte Biomarkers Related to Drug Recovery of CFTR: Clinical Applications in Cystic Fibrosis” *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 10;22(8):3928

- Averna M, Melotti P, Sorio C “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” Cells 2021, 10, 3380.

FFC Project#14/2019 “Investigating epithelial-stromal crosstalk in full thickness cystic fibrosis model on chip for evaluating novel therapeutic strategies” Paolo Netti (Istituto Italiano di Tecnologia, Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli), Diego Di Bernardo (Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli)

- Mazio M, Scognamiglio LS, Passariello R et al. “Easy-to-Build and Reusable Microfluidic Device for the Dynamic Culture of Human Bronchial Cystic Fibrosis Epithelia”, ACS Biomater Sci Eng. 2023 May 8;9(5):2780-2792.

FFC Project#1/2020 “Peptide-nucleic acids as potential CFTR amplifier molecules for cystic fibrosis treatment” Felice Amato (CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Lab. di ricerca in fibrosi cistica)

- Comegna M, Conte G, Falanga AP et al. “Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles” Sci Rep. 2021 Mar 18;11(1):6393.

FFC Project#6/2020 “Validation of the distribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems” Laura Lentini and Ivana Pibiri (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), University of Palermo, Palermo)

- Corrao F, Zizzo MG, Tutone M et al. “Nonsense codons suppression. An acute toxicity study of three optimized TRIDs in murine model, safety and tolerability evaluation” Biomedicine & Pharmacotherapy in press. October 2022.
- Pibiri I, Melfi R, Tutone M et al. “Targeting nonsense: Optimization of 1,2,4-oxadiazole trids to rescue cftr expression and functionality in cystic fibrosis cell model systems” International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17), pp. 1–18, 6420.
- Tutone M, Pibiri I, Perriera R et al. “Pharmacophore-Based Design of New Chemical Scaffolds as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)” ACS Medicinal Chemistry Letters Open Access Volume 11, Issue 5, Pages 747 75314 May 2020.
- Carollo PS, Tutone M, Culletta G et al. “Investigating the Inhibition of FTSJ1, a Tryptophan tRNA-Specific 20-O-Methyltransferase by NV TRIDs, as a Mechanism of Readthrough in Nonsense Mutated CFTR”, Int J Mol Sci. 2023 Jun 1;24(11):9609.
- Perriera R, Vitale E, Pibiri I et al. “Readthrough Approach Using NV Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs): A Study of the Possible Off-Target Effects on Natural Termination Codons (NTCs) on TP53 and Housekeeping Gene Expression” Int J Mol Sci. 2023 Oct 11;24(20):15084.

FFC Project#7/2020 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)

- Borgo C, D'Amore C, Capurro V et al. “Targeting the E1 ubiquitinactivating enzyme (UBA1) improves elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants” Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:192.
- Kleinfelder K, Villella VR, Hristodor AM et al. “Therotyping of the Rare CFTR Genotype A559T in Rectal Organoids and Nasal Cells Reveals a Relevant Response to Elexacaftor (VX-445) and Tezacaftor (VX-661) Combination” Int J Mol Sci. 2023 Jun 19;24(12):10358.

FFC Project#9/2020 “Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators” Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, AOUI Verona)

- Ciciriello F, Bijvelds JCM, Alghisi F et al. “Therotyping of the Rare CFTR Variants E193K and R334W in Rectal Organoid-Derived Epithelial Monolayers” J. Pers. Med. 2022, 12, 632.
- Averna M, Melotti P, Sorio C. “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” Cells. 2021 Dec 1;10(12):3380

FFC Project#2/2021 “Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del and 2789+5G>A CFTR defects” Anna Cereseto (CIBIO - Centro per la Biologia Integrata, Università degli Studi di Trento), Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Trento)

- Amistaldi S, Maule G, Ciciani M et al. “Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor”, Mol Ther. 2023 Mar 8;S1525-0016(23)00125-9.

FFC Project#4/2021 “Oxidative stress and autophagy in Cystic Fibrosis: Novel biochemical characterizations and drug discovery approaches” Giorgio Cozza (Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova), Federica Rossin (Dipartimento di Biologia dell’Università Tor Vergata di Roma)

- Palucci I, Salustri A, De Maio F et al. “Cysteamine/Cystamine Exert Anti-Mycobacterium abscessus Activity Alone or in Combination with Amikacin”, 2023, Int J Mol Sci. 24:1203.

FFC Project#5/2021 “In vitro evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript” Aldo Di Leonardo (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF, Università degli Studi di Palermo)

- Chiavetta RF, Titoli S, Barra V et al. “Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells” International Journal of Molecular Sciences 24, no. 13: 10940.

FFC Project#9/2021 “Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis” Enrico Millo (Dip. di Medicina Sperimentale DIMES, Università degli Studi di Genova), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Università degli Studi di Genova), Santina Bruzzone (Dip. Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova)

- Sabbadini R, Pesce E, Parodi A et al. “Probing Allosteric HSP70 Inhibitors by Molecular Modelling Studies to Expedite the Development of Novel Combined F508del CFTR Modulators” Pharmaceuticals 2021, 14, 1296.

FFC Project#11/2021 “Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect” Paolo Scudieri (Dipartimento di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova), Fabiana Ciciriello (IRCSS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma)

- Gorrieri G, Zara F, Scudieri P “SLC26A9 as a Potential Modifier and Therapeutic Target in Cystic Fibrosis Lung Disease” Biomolecules 2022, 12, 202.
- Debczynski M, Gorrieri G, Mojsak D et al. “ATP12A Proton Pump as an Emerging Therapeutic Target in Cystic Fibrosis and Other Respiratory Diseases”, Biomolecules 2023, 13(10), 1455.
- Dębczynski M, Mojsak D, Tamburro S et al, “Generation of an induced pluripotent stem cell line (IGGi002A) from nasal cells of a cystic fibrosis patient homozygous for the G542X-CFTR mutation”, Stem Cell Res. 2023 Oct 18;72:103232.

FFC Project#1/2022 “A lipid-based therapeutic approach to rescue CFTR with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis” Massimo Aureli (Dip. Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale, Università di Milano), Anna Tamanini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)

- Dobi D, Loberto N, Bassi R et al. “Cross-talk between CFTR and sphingolipids in cystic fibrosis” FEBS Open Bio. 2023 Sep;13(9):1601-1614. doi: 10.1002/2211-5463.13660. Epub 2023 Jun 22.

FFC Project#4/2022 “Esculetin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease” Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma), Arianna Venturini (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA), Mattia Mori (Dip. Biotecnologie mediche, Università di Siena)

- Loffredo MR, Casciaro B, Bellavita R et al. “A strategic single-residue substitution in the antimicrobial peptide Esc(1-21) confers activity against *Staphylococcus aureus*, including drug-resistant and biofilm phenotype” *In preparation*

FFC Project#9/2022 “Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis English version” Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Guidone D, Buccirossi M, Scudieri P et al. “Airway surface hyper-viscosity and defective mucociliary transport by IL-17/TNF- α are corrected by beta-adrenergic stimulus” *JCI Insight*. 2022

2. PERSONALIZED THERAPIES - THERATYPING

Terapie personalizzate

FFC Project#12/2018 “Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (therotyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches” Adriana Eramo (Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità), Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie Cellulari e Ematologia, La Sapienza, Roma)

- Sette G, Lo Cicero S, Blaconà G et al. “Therotyping cystic fibrosis in vitro in ALI-culture and organoid models generated from patient-derived nasal epithelial Conditionally Reprogrammed Stem Cells” *Eur Respir J*. 2021 Aug 19;2100908

FFC Project#9/2019 “Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNF5 inhibitors” Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto “G. Gaslini”, UOC Genetica Medica, Genova), Andrea Cavalli (Istituto Italiano di Tecnologia, Biologia Computazionale e Chimica, Genova)

- Pesce E, Pedemonte N, Leoni A et al. “Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives on basic defects underlying cystic fibrosis” *Bioorg Med Chem Lett*. 2020 Nov 1;30(21):127473.
- Capurro V, Tomati V, Sondo E et al. “Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment” *Int J Mol Sci*. 2021 May 17;22(10):5262
- Martina MG, Sannio F, Crespan E et al. “Towards Innovative Antibacterial Correctors for Cystic Fibrosis Targeting the Lung Microbiome with a Multifunctional Effect” *ChemMedChem* 2022, 17, e202200277
- Brusa I, Sondo E, Falchi F et al. “Proteostasis Regulators in Cystic Fibrosis: Current Development and Future Perspectives” *J. Med. Chem.* 2022, 65, 5212–5243
- Sondo E, Cresta F, Pastorino C et al. “The L467F-F508del Complex Allele Hampers Pharmacological Rescue of Mutant CFTR by Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis Patients: The Value of the *Ex vivo* Nasal Epithelial Model to Address Non-Responders to CFTR-Modulating Drugs” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3175.
- Principi E, Sondo E, Bianchi G et al. “Targeting of Ubiquitin E3 Ligase RNF5 as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroectodermal Tumors” *Cancers* 2022, 14, 1802.
- Brusa I, Sondo E, Pesce E et al. “Innovative Strategy toward Mutant CFTR Rescue in Cystic Fibrosis: Design and Synthesis of Thiadiazole Inhibitors of the E3 Ligase RNF5”, *J Med Chem*. 2023 Jul 27;66(14):9797-9822.

FFC Project#7/2021 “Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test: validation phase” Carlo Laudanna (Università degli Studi di Verona, Dip. Di Medicina)

- Toffali L, D’Ulivo B, Giagulli C et al. “An isoform of the giant protein titin is a master regulator of human T lymphocyte trafficking”, *Cell Rep*. 2023 May 30;42(5):112516. Abstracts

- Melotti P, Conti J, Kleinfelder K et al. “Effects of ivacaftor therapy confirm the results of therotyping using rectal and nasal epithelial cells of a CF patient carrying the ultra-rare CFTR genotype W57G/A234D” European Cystic Fibrosis Society, 17th ECFS Basic Science Conference
- Melotti P, Montresor A, Kleinfelder K et al. “Monocyte integrin activation as a CFTR-targeted drugs evaluation test in cystic fibrosis patients: preliminary analysis” *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022
- Conti J, Melotti P, Kleinfelder K et al. “Effects of ivacaftor therapy confirm the results of therotyping using rectal and nasal epithelial cells of a cystic fibrosis patient carrying the ultra-rare CFTR genotype W57G (c.169T > G)/A234D (c.701C > A)” *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022
- Murabito A, Sala V, Pisano AR et al. “A PI3K γ mimetic peptide triggers CFTR gating, bronchodilation and reduced inflammation in obstructive airway diseases” *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022

FFC Project#8/2021 “Therotyping of cystic fibrosis” Marco Luquarelli (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma), Adriana Eramo (Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare, Roma)

- Lo Cicero S, Castelli G, Blaconà G et al., “L1077P CFTR pathogenic variant function rescue by Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor in cystic fibrosis patient-derived air-liquid interface (ALI) cultures and organoids: in vitro guided personalized therapy of non-F-508del patients” *Respiratory Research* (2023) 24:217.
- Bruno SM, Blaconà G, Lo Cicero S et al., “Quantitative evaluation of CFTR gene expression: a comparison between relative quantification by real-time PCR and absolute quantification by droplet digital PCR” *Genes* (2023) 14(9):1781
- Kleinfelder K, Lotti V, Eramo A et al., “In silico analysis and therotyping of an ultra-rare CFTR genotype (W57G/A234D) in primary human rectal and nasal epithelial cells” *iScience* (2023) accepted

FFC Project#10/2021 “Therotyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs” Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova), Renata Bocciardi (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili - DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

- Pedemonte N “Nasal epithelial cells as a gold-standard predictive model for personalized medicine in cystic fibrosis” *J Physiol*. 2022 Mar;600(6):1285-1286.
- Baldassarri M, Zguro K, Tomati V et al., “Gain- and Loss-of-Function CFTR Alleles Are Associated with COVID-19 Clinical Outcomes”, *Cells*. 2022 Dec 16;11(24):4096.
- Farinha CM, Brodsky JL, Pedemonte N, “Fundamental and translational research in Cystic Fibrosis –why we still need it”, *J Cyst Fibros*. 2023 Mar;22 Suppl 1:S1-S4.
- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 14;23(20):12274.
- Oliver KE, Carlon MS, Pedemonte N et al., “The revolution of personalized pharmacotherapies for cystic fibrosis: what does the future hold?” *Expert Opin Pharmacother* . 2023 Sep-Dec;24(14):1545-1565.
- Terlizzi V, Pesce E, Capurro V et al. “Clinical Consequences and Functional Impact of the Rare S737F CFTR Variant and Its Responsiveness to CFTR Modulators” *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 31;24(7):6576.
- Tomati V, Costa S, Capurro V et al. “Rescue by elexacaf tor-tezacaftor-ivacaf tor of the G1244E cystic fibrosis mutation’s stability and gating defects are dependent on cell background”, *J Cyst Fibros*. 2023 May;22(3):525-537.

3. MICROBIOLOGY

Terapie dell'infezione broncopolmonare

FFC Project#10/2013 "Anti-virulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*: identification of antibiofilm drugs and development of inhalable Niclosamide and Flucytosine formulations" Livia Leoni (Dip. di Scienze, Università "Roma Tre"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II), Francesco Imperi (Dip. di Biologia e Biotecnologia, Università "La Sapienza", Roma), Ersilia Fiscarelli (Ospedale e Ist. di ricerca "Bambin Gesù", Lab. Microbiologico fibrosi cistica, Rome)

- D'Angelo I. et al. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 30: 92-111
- Imperi F. et al. "Antivirulence activity of aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*" *Frontiers in Microbiology* 2014;5: 178
- Llamas MA. Et al. "Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress response, iron transport and pathogenicity" *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38:569-97
- Lo Sciuto A, Martorana AM, Fernandez-Pinar R et al. "*Pseudomonas aeruginosa* LptE is crucial for LptD assembly, cell envelope integrity, antibiotic resistance and virulence" *Virulence* 2018;9(1):1718-1733
- Imperi F, Fiscarelli EV, Visaggio D et al. "Activity and Impact on Resistance Development of Two Antivirulence Fluoropyrimidine Drugs in *Pseudomonas aeruginosa*" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019 Mar 11;9:49.

FFC Project#11/2013 "Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application" Eugenio Notomista (Dip. Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- D'Angelo I. et al. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014 Aug 30;75C:92-111

FFC Project#12/2013 "Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials" Alessandro Pini (Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena)

- Brunetti J. et al. "A Novel Phage-Library-Selected Peptide Inhibits Human TNF- α Binding to Its Receptors" *Molecules* 2014; 19:7255-7268
- Falciani C. et al. "Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase" *AminoAcids* 2014; 45(5):1403-1407
- Brunetti J. et al. "In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate" *Sci Rep.* 2016 May 12;6:26077
- Ceccherini F. et al. "Antimicrobial activity of levofloxacin-M33 peptide conjugation or combination" *MedChemComm* 2016;7,258

FFC Project#11/2014 "Development and preclinical testing of a novel antimicrobial peptide to treat *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infections" Maria Luisa Mangoni (Dip. di Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma)

- Cappiello F. et al. "Esculetin-1a-Derived Peptides Promote Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Internalized in Bronchial Cells of Cystic Fibrosis Patients and Lung Cell Migration: Biochemical Properties and a Plausible Mode of Action" *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Sep 26
- Ghosh A. et al. "NMR structure and binding of esculetin-1a (1-21)NH₂ and its diastereomer to lipopolysaccharide: Correlation with biological functions" *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1858(4):800-12
- Chen C, Mangoni ML, Di YP "In vivo therapeutic efficacy of frog skin-derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pulmonary infection" *Sci. Rep.* 2017 Aug 17;7(1):8548
- Loffredo MA, Ghoshb A, Harmouche N et all "1c: Correlation

with their antipseudomonal and cytotoxic activity" *BBA – Biomembranes* 1859 (2017) 2327-2339

- Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML "A Novel *In vitro* Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration" *Journal of Visualized Experiments* 2018 Mar 17;(133)

FFC Project#12/2014 "Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application" Eugenio Notomista (Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli "Federico II")

- D'Angelo I. et al. "Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide" *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015 Aug 22;135:717-725
- Oliva R, Chino M, Pane K et all "Exploring the role of unnatural amino acids in antimicrobial peptides" *SCI REP* 2018 Jun 11;8(1):8888.
- Oliva R, Chino M, Lombardi A et al. "Similarities and differences for membranotropic action of three unnatural antimicrobial peptides" *Journal of Peptide Science* 2020 Aug;26(8):e3270

FFC Project#14/2014 "Development of BMAP18 as a peptide drug in the lung bacterial infections: a study to improve its effectiveness in the CF pulmonary environment" Marco Scocchi (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste)

- Mardirossian M, Pompilio A, Degasperi M et all. "D-BMAP18 Antimicrobial Peptide Is Active *In vitro*, Resists to Pulmonary Proteases but Loses Its Activity in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection" *Frontiers in Chemistry* 2017 Jun 19;5:40
- Mardirossian M, Pompilio A, Crocetta V et al. "*In vitro* and *in vivo* evaluation of BMAP-derived peptides for the treatment of cystic fibrosis-related pulmonary infections" *Amino Acids*, 2016 Sep;48(9):2253-60

FFC Project#18/2014 "GSH inhalation therapies in CF: how useful, how safe? Set-up of a CF murine model for monitoring of inflammation in vivo and assessment of convenient alternatives" Alessandro Corti (Dip. di Ricerca Traslazionale NTMS Lab. Patologia Generale, Università di Pisa)

- Corti A, Griese M, Hector A et al. "Increasing sputum levels of gamma-glutamyltransferase may identify cystic fibrosis patients who do not benefit from inhaled glutathione", *Journal of Cystic Fibrosis*, 2017, May;16(3):342-345
- Corti A, Pompella A, Bergamini G et al. "Glutathione inhalation treatments in cystic fibrosis: the interference of airway γ -Glutamyltransferase" *American Journal of Respiratory and Critical care Medicine*, 2014 Jan 15;189(2):233-4
- Corti A, Belcastro E, Dominici S et al. "The dark side of gamma-glutamyltransferase (GGT): Pathogenic effects of an 'antioxidant' enzyme" *Free Radical Biology and Medicine* 2020 Sep 9;160:807-819
- Piaggi S, Marchi E, Carnicelli V et al. "Airways glutathione S-transferase omega-1 and its A140D polymorphism are associated with severity of inflammation and respiratory dysfunction in cystic fibrosis" *J Cyst Fibros.* 2021 Feb 11;S1569-1993(21)00033-3.

FFC Project#19/2014 "Mitochondrial Ca²⁺-dependent inflammasome activation exacerbates the *P. aeruginosa*-driven inflammatory response" Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

- Giorgi C, Missiroli S, Paterniani S et al. "Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiological Implications" *Antioxidant & redox signaling* 22 (12), 995-1019

FFC Project#21/2014 "Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis" Antonio Recchiuti (Dip. di Scienze Cliniche e Sperimentale e Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento-CeSI, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara)

- Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A et all. "Resolvin D1 enhances

the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection" *Mucosal Immunology* 2017 Apr 19

FFC Project#23/2014 "Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in cystic fibrosis" Mario Romano (Dip. di Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. di Medicina Molecolare, Università G. D'Annunzio, Chieti-Pescara)

- Plebani R, Tripaldi R, Lanuti P et all. "Establishment and long-term culture of human cystic fibrosis endothelial cells" *Laboratory Investigation* 2017 Jul 31
- Totani L, Plebani R, Piccoli A et all "Mechanisms of endothelial cell dysfunction in cystic fibrosis" *Biochimica et Biophysica Acta* 2017 Aug 25

FFC Project#24/2014 "The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies" Sandro Sonnino (Dip. di Biochimica Medica e Medicina Traslazionale, Università di Milano)

- Aureli M. et al. "Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease" *Chem Phys Lipids* 2016 Aug 31;200:94-103

FFC Project#10/2015 "A CF, IL-8 transgenic mouse model for the in vivo, long-term monitoring of the antiinflammatory role of metallo-protease inhibitors and antibiotics with mechanisms of action similar to that of azithromycin" Maria M. Lleò (Dipartimento di Patologia e Diagnostica, sezione di Microbiologia Università di Verona)

- Sandri A, Ortombina A, Boschi F et all "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors reduces lung inflammation in CF mice" *Virulence* 2018;9(1):1008-1018.

FFC Project#12/2015 "Anti-inflammatory and anti-bacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models" Francesca Berluti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive Università La Sapienza, Roma)

- Valenti P, Frioni A, Rossi A et all "Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" *Biochemistry and Cell Biology* 2017 Feb;95(1):41-47
- Cutone A, Lepanto MS, Rosa L et al. "Aerosolized bovine lactoferrine counteracts infections, inflammation and iron dysbalance in a cystic fibrosis mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection" *International Journal of Molecular Science* 2019, 20(9), 2128

FFC Project#13/2015 "Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials" Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze – Università degli Studi di Milano)

- Ferrara S, Falcone M, Macchi R et al. "The PAPI-1 pathogenicity island-encoded small RNA PesA influences *Pseudomonas aeruginosa* virulence and modulates pyocin S3 production" *PLoS ONE* 2017 Jun 30;12(6):e0180386
- Silvia F, Carrubba R, Santoro S et al. "The Small RNA ErsA Impacts the Anaerobic Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* Through Post-Transcriptional Modulation of the Master Regulator Anr" *Front Microbiol.* 2021 Aug 20
- Ferrara S, Rossi A, Ranucci S et al. "The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Airway Infections" *mSphere* 2020 Oct 14;5(5):e00909-20

FFC Project#14/2015 "Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy" Anna Maria Bevivino (Unità Tecnica per lo Sviluppo e Innovazione del Sistema Agroindustriale ENEA Agenzia Nazionale Italiana per le Nuove Tecnologie, Energie e Sviluppo Economico Sostenibile, Laboratorio di Microbiologia, Centro Ricerche Casaccia, Roma), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università di Firenze); Giovanni Taccetti (Dip. di Pediatria, Centro fibrosi

cistica, Firenze), Ersilia Vita Fiscarelli (Ospedale dei Bambini, Istituto di Ricerca Bambino Gesù, Lab. di Microbiologia per fibrosi cistica), Alessandra De Alessandri (Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Scienze Pediatriche, Pneumologia e Allergologia Istituto G. Gaslini, Genova)

- Bacci G, Mengoni A, Fiscarelli E et all. "A Different Microbiome Gene Repertoire in the Airways of Cystic Fibrosis Patients with Severe Lung Disease" *International Journal of Molecular Sciences* 2017 Jul 29;18(8).
- Bevivino A, Bacci G, Drevinek P et al. "Deciphering the Ecology of Cystic Fibrosis Bacterial Communities: Towards Systems-Level Integration" *Trends Mol Med* 2019

FFC Project#16/2015 "Development of metallo-enzyme inhibitors to overcome *P. aeruginosa* antibiotic-resistance in cystic fibrosis patients" Sandra Gemma (Dipartimento di Biotecnologia, Chimica e Farmacia Università di Siena), Jean-Denis Docquier (Dip. di Biotecnologia Medica Università di Siena)

- Brindisi M. et al. "Targeting clinically-relevant metallo-β-lactamases: from high-throughput docking to broad-spectrum inhibitors", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*

FFC Project#19/2015 "Inhalable formulations of new molecules effective against *Burkholderia cenocepacia*: from in vitro to in vivo applications" Giovanna Riccardi (Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Pavia), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia Università degli Studi Federico II, Napoli)

- Scoffone VC. et al. "Discovery of new diketopiperazines inhibiting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing in vitro and in vivo" *Sci Rep.* 2016 Sep 1;6:32487
- Israyilova A, Buroni S, Forneris F et al. "Biochemical Characterization of Glutamate Racemase-A New Candidate Drug Target against *Burkholderia cenocepacia* Infections" *PLoS ONE* 2016 Nov 29;11(11)
- Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespidi G et al. "*Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches" *Frontiers in Microbiology* 2017 Aug 22;8:1592
- Pellosi Silva D, d'Angelo I, Maiolino S et all "In vitro/in vivo investigation on the potential of Pluronic® mixed micelles for pulmonary drug delivery" *European journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2018 Jun 8
- Hogan AM, Scoffone VC, Makarov V et al. "Competitive Fitness of Essential Gene Knockdowns Reveals a Broad-Spectrum Antibacterial Inhibitor of the Cell Division Protein FtsZ." *Antimicrob Agents Chemother*, 2018 Nov 26;62(12).
- Costabile G, Provenzano R, Azzalin A et al. "PEGylated mucus-penetrating nanocrystals for lung delivery of a new FtsZ inhibitor against *Burkholderia cenocepacia* infection" *Nanomedicine* 2020 Jan;23:102113

FFC Project#21/2015 "Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection" Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia Università di Roma Tre, Roma), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze Università Bicocca, Milano), Raffaella Sorrentino (Dip. di Farmacia Università Federico II, Napoli)

- Hijazi S, Visca P, Frangipani E "Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017 Jan 26;7:12
- Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A et all "The ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*" *J Bacteriol* 2017 Aug 28
- Porcaro F, Bonchi C, Ugolini A et all "Understanding the biomimetic properties of gallium in *Pseudomonas aeruginosa*: an XAS and XPS study" *Dalton Trans* 2017 May 30;46(21):7082-7091
- Costabile G, d'Angelo I, d'Emmanuele R et all "Development of inhalable hyaluronan/mannosid composite dry powders for flucytosine repositioning in local therapy of lung infections" *J Control Release*, 2016 Sep 28;238:80-91

FFC Project#14/2016 “Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials” Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

- Falcone M, Ferrara S, Rossi E et all. “The Small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Biofilm Development and Motility through Post-transcriptional Modulation of AmrZ” Frontiers in Microbiology 2018 Feb 15;9:238
- Carloni S, Macchi R, Sattin S et al. “The small RNA ReaL: a novel regulatory element embedded in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing networks” Environmental Microbiology 2017 Oct;19(10):4220-4237
- Ferrara S, Rossi A, Ranucci S et al. “The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Airway Infections” mShpere, September/October 2020 Volume 5 Issue 5 e00909-20

FFC Project#15/2016 “Cystic fibrosis modifier genes related to *Pseudomonas aeruginosa* lung disease” Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Cigana C, Sipione B et all. “The impact of host genetic background in the *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections” Mammalian Genome 2018 Jun 12.
- Bragonzi A, Horati H, Kerrigan L et al. “Inflammation and host-pathogen interaction: cause and consequence in cystic fibrosis lung disease” Journal of Cystic Fibrosis, 2018 Mar;17(2S):S40-S45.

FFC Project#16/2016 “Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients” Daniela Erica Ghisotti (Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano)

- Forti F, Roach DR, Cafora M et all. “Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models” Antimicrob Agents Chemother 2018 Mar 19

FFC Project#17/2016 “Development of inhalable particles for optimal delivery of a potent antimicrobial molecule in *Pseudomonas aeruginosa* infected lungs” Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologia Medica, Università di Siena)

- Puglia M, Landi C, Gagliardi A et all. “The proteome speciation of an immortalized cystic fibrosis cell line: New perspectives on the pathophysiology of the disease” Journal of Proteomics 2018 Jan 6;170:28-42
- Brunetti J, Roscia G, Lampronti I et al. “Immunomodulatory and anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* of novel antimicrobial candidate” Journal of Biological Chemistry, 2016 Dec 2;291(49):25742-25748
- Quercini L, Brunetti J, Riolo G et al. “An Antimicrobial Molecule Mitigates Signs of Sepsis *in vivo* and Eradicates Infections From Lung Tissue” FASEB Journal 2020 Jan;34(1):192-207.

FFC Project#4/2017 “Phenotyping new genetically-diverse mouse models mirroring the complexity of the cystic fibrosis pathology” Nicola Ivan Lorè (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Ospedale San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Sipione B, He G et all. “Collaborative cross mice yield modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection in human lung disease” Genome Research, submitted
- Sipione B, Lorè NI, Rossi G et al. “Phenotypic and genotypic characterisation of a novel mouse model of F508del-CFTR in genetically diverse collaborative cross” 44th European Cystic Fibrosis Conference, 9–12 June 2021, J Cystic Fibrosis, Vol. 20 Supp. 1 (2021)

FFC Project#13/2017 “Induction of viable but non-culturable forms, possibly responsible for treatment failure, in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Role of antibiotics and antibiotic concentrations” Francesca Biavasco (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche)

- Mangiattera G, Amiri M, Di Cesare A et all. “Detection of viable but non-culturable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis by qPCR: a validation study” BMC Infection Disease, 2018 Dec 27;18(1):701
- Mangiattera G, Cedraro N, Vaiasicca S et al. “Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in an *In vitro* Biofilm Model” Antibiotics, 2020 Jul 10;9(7):399

FFC Project#14/2017 “Preclinical study of a host-directed therapy based on Metformin and bioactive liposomes for the control of multidrug resistant *P. aeruginosa* infection” Maurizio Fraziano (Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata)

- Nisini R, Poerio N, Mariotti S et all. “The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases” Frontiers in Immunology 2018 Feb 5;9:155
- Poerio N, De Santis F, Rossi A et al. “Liposomes loaded with phosphatidylinositol 5phosphate improve the antimicrobial response to *P. aeruginosa* in impaired macrophages from Cystic Fibrosis patients and limit airway inflammatory response” Frontiers in Immunology, 2020; 11: 532225

FFC Project#15/2017 “Frog skin-derived peptides for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection and bronchial epithelial repair: advanced *in vitro* and *in vivo* characterization and development of polymeric nanoparticles for lung delivery” Maria Luisa Mangoni (Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università La Sapienza)

- Casciaro B, d'Angelo I, Zhang X et al. “Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: *in vitro* and *in vivo* Studies” Biomacromolecules, 2019 Apr 23
- Casciaro B, Cappiello F, Loffredo MR et al. “The Potential of Frog Skin Peptides for Anti-Infective Therapies: the Case of Esculentin-1a(1-21)NH2” Curr Med Chem 2019, Jul 21
- Casciaro B, Lin Q, Afonin S et al. “Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and expression of virulence genes by selective epimerization in the peptide Esculentin-1a(1-21)NH2” FEBS J 2019 Oct;286(19):3874-3891
- Cappiello F, Ranieri D, Carnicelli V et al. “Bronchial epithelium repair by Esculentin-1a-derived antimicrobial peptides: involvement of metalloprotease-9 and interleukin-8, and evaluation of peptides' immunogenicity” SCI REP 2019 Dec 12;9(1):18988
- Casciaro B, Cappiello F, Verrusio W et al. “Antimicrobial Peptides and their Multiple Effects at Sub-Inhibitory Concentrations” Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1264-1273.
- Casciaro B, Ghirga F, Quaglio D et al. “Inorganic Gold and Polymeric Poly(Lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Novel Strategies to Ameliorate the Biological Properties of Antimicrobial Peptides” Curr Protein Pept Sci 2020;21(4):429-438

FFC Project#16/2017 “Pre-clinical effectiveness of three human cryptic antibiofilm peptides (GVF27, HVA36 and IMY47): efficacy against lung pathogens and studies in animals” Eliodoro Pizzo (Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II)

- Pane K, Cafaro V, Avitabile A et all. “Identification of novel cryptic multifunctional antimicrobial peptides from the human stomach enabled by a computational-experimental platform” ACS Synthetic Biology 2018 Sep 21;7(9):2105-2115
- Bosso A, Di Maro A, Cafaro V et al. “Enzymes as a Reservoir of Host Defence Peptides” Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1310-1323
- Gaglione R, Pizzo E, Notomista E et al. “Host Defence Cryptides from Human Apolipoproteins: Applications in Medicinal Chemistry” Current Topics in Medicinal Chemistry 2020;20(14):1324-1337
- Zanfardino A, Bosso A, Gallo G et al. “Human apolipoprotein E as a reservoir of cryptic bioactive peptides: The case of ApoE 133-167” Journal of Peptide Science 2018 Jul;24(7):e3095
- Gaglione R, Cesaro A, Dell'Olmo E et al. “Cryptides Identified in Human Apolipoprotein B as New Weapons to Fight Antibiotic Resistance in Cystic Fibrosis Disease” Int J Mol Sci. 2020 Mar 17;21(6):2049.

FFC Project#17/2017 "Identification of new efflux pumps inhibitors able to contrast Nontuberculous Mycobacterial infections in cystic fibrosis patients" Stefano Sabatini (Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia)

- Felicietti T, Machado D, Cannalire R et al. "Modifications on C6 and C7 positions of 3-phenylquinolone efflux pump inhibitors led to potent and safe anti-Mycobacterial treatment adjuvants." ACS Infectious Diseases 2019 Mar 25

FFC Project#18/2017 "Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection" Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca), Raffella Sorrentino (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M et al "Antimicrobial activity of Gallium compounds on ESKAPE pathogens" Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018 Sep 10;8:316

FFC Project#19/2017 "A longitudinal metagenomic analysis to uncover microbial signatures of CF lung disease: unravelling host-microbial community interactions in humans and animal models" Annamaria Bevvino (ENEA, Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Lab. Sostenibilità, Qualità e Sicurezza delle Produzioni Agroalimentari, Centro Ricerche Casaccia, Roma), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università degli Studi di Firenze), Nicola Segata (CIBIO, Laboratorio di Metagenomica computazionale, Università di Trento)

- Bacci G, Taccetti G, Dolce D et al. "Untargeted Metagenomic Investigation of the Airway Microbiome of Cystic Fibrosis Patients with Moderate-Severe Lung Disease" Microorganism 2020 Jul 4;8(7):1003.
- Bacci G, Rossi A, Armanini F, et al. "Lung and Gut Microbiota Changes Associated to *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mouse Models of Cystic Fibrosis" Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 12169.

FFC Project#20/2017 "Establishment of animal model to investigate pathogenesis of infection by *Mycobacterium abscessus* complex members in cystic fibrosis patients" Enrico Tortoli (Unità Batteri Patogeni Emergenti, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele, Milano)

- Riva C, Tortoli E, Cugnata F et al. "A New Model of Chronic *Mycobacterium abscessus* Lung Infection in Immunocompetent Mice" International Journal of Molecular Sciences 2020 Sep; 21(18): 6590

FFC Project#22/2017 "In vivo validation of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections using the new Zebrafish (*Danio rerio*) animal model" Anna Silvia Pistocchi (Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)

- Cafora M, Deflorian G, Forti F et all. "Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model" SCI REP, 2019 Feb 6;9(1):1527
- Brix A, Cafora M, Aureli M et al. "Animal Models to Translate Phage Therapy to Human Medicine" International Journal of Molecular Sciences 2020 May 25;21(10):3715
- Cafora M, Foti F, Briani F et al. "Phage Therapy Application to Counteract *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Zebrafish Embryos" Journal of Visualized Experiments 2020 May 12;(159)

FFC Project#14/2018 "Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus-bacteria interactions in cystic fibrosis patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy" Guido Antonelli (Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, La Sapienza Roma; Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I)

- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. "Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients Affected by Cystic Fibrosis" Viruses, 2019 Jun 21;11(6)

- Antonelli G "No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy" J Cyst Fibros 2020 Sep; 19(5): 837-838
- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. "Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients Affected by Cystic Fibrosis" Viruses 2019 Jun 21;11(6):571
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. "Differential toll like receptor expression in cystic fibrosis patients' airways during rhinovirus infection" Journal of Infection 2020 Nov;81(5):726-735
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. "No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy" J Cyst Fibros 2020 Sep; 19(5):837-838
- Bitossi C, Frasca F, Viscido A et al. "SARS-CoV-2 Entry Genes Expression in Relation with Interferon Response in Cystic Fibrosis Patients" Microorganisms, 2021 Jan 3;9(1):93.
- Bitossi C, Viscido A, Prezioso C et al. "High prevalence of Merkel cell polyomavirus is associated with dysregulation in transcript levels of TLR9 and type I IFNs in a large cohort of CF patients from the Italian (Lazio) reference center for cystic fibrosis" Microb Pathog. 2022 Aug;169:105644.

FFC Project#17/2018 "Drug repurposing for antivirulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*" Livia Leoni (Università Roma Tre, Dip. Scienze, Lab. Microbiologia dei microrganismi)

- D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N et al. "Identification of FDA-Approved Drugs as Antivirulence Agents Targeting the pqs Quorum-Sensing System of *Pseudomonas aeruginosa*" Antimicrob Agents Chemother 2019 Oct 24;62(11).
- Mellini M, Di Muzio E, D'Angelo F et al. "In silico Selection and Experimental Validation of FDA-Approved Drugs as Anti-quorum Sensing Agents" Frontiers in Microbiology 2019 Oct 10;10:2355
- Baldelli V, D'Angelo F, Pavoncello V et al. "Identification of FDA-approved antivirulence drugs targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing effector protein PqsE" Virulence 2020 Dec;11(1):652-668
- Collalto D, Giallonardi G, Fortuna A et al. "In vitro Activity of Antivirulence Drugs Targeting the las or pqs Quorum Sensing Against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Isolates" Front. Microbiol. 2022, 13:845231

FFC Project#18/2018 "In vitro and in vivo efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens" Eugenio Notomista (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia), Eliodoro Pizzo (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia)

- Siepi M, Donadio G, Dardano P et al. "Denatured lysozyme-coated carbon nanotubes: a versatile biohybrid material" SCI REP 2019 Nov 12;9(1):16643
- Siepi M, Oliva R, Masino A et al. "Environment-Sensitive Fluorescent Labelling of Peptides by Luciferin Analogues" Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 13312.
- Cafaro V, Bosso A, Di Nardo I et al., "The Antimicrobial, Antibiofilm and Anti-Inflammatory Activities of P13#1, a Cathelicidin-like Achiral Peptoid", Pharmaceuticals 2023, 16(10), 1386.

FFC Project#19/2018 "New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other Nontuberculous Mycobacteria" Maria Rosalia Pasca (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia Lazzaro Spallanzani, Lab. Microbiologia molecolare)

- Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR et al. "*Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients" Int J Mol Sci. 2019 Nov 22;20(23):5868.
- Chiarelli LR, Degiacomi G, Egorova A et al. "Nitric oxide-releasing compounds for the treatment of lung infections" Drug Discov Today. 2021 Feb;26(2):542-550.

FFC Project#20/2018 “Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections” Maurizio Sanguinetti (*Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*), Alberto Vitali (*Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR-ICRM*); Michele Iafisco (*Istituto di Scienza e Tecnologia dei materiali ceramici ISTEC CNR, Faenza*), Daniele Catalucci (*Istituto di Genetica e Ricerca biomedicale -IRGB, Milano*)

- Velino C, Carella F, Adamiano A et al. “Nanomedicine Approaches for the Pulmonary Treatment of Cystic Fibrosis” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019 Dec 17;7:406
- Bugli F, Martini C, Di Vito M et al. “Antimicrobial peptides for tackling cystic fibrosis related bacterial infections: A review” *Microbiological Research* 263 (2022) 127152
- Iafisco M, Carella F, Degli Esposti L et al. “Biocompatible antimicrobial colistin loaded calcium phosphate nanoparticles for the counteraction of biofilm formation in cystic fibrosis related infections” *J Inorg Biochem.* 2022 May;230:111751.

FFC Project#15/2019 “Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens” Fiorenza Ascenzioni (*Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma*)

- Ghirga F, Stefanelli R, Cavinato L et al. “A novel colistin adjuvant identified by virtual screening for ArnT inhibitors” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020 Sep 1;75(9):2564-2572
- Quaglio D, Mangoni ML, Stefanelli R et al. “ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors” *Journal of Organic Chemistry* 2020 Aug 21;85(16):10891-10901

FFC Project#16/2019 “Fighting Pseudomonas aeruginosa persisters in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies” Francesca Biavasco (*Dip. Scienze Ambientali e della Vita, Università Politecnica delle Marche, Ancona*)

- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiasicca S et al. “Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in an *In vitro* Biofilm Model” *Antibiotics* (Basel). 2020 Jul 10;9(7):399.
- Mangiaterra G, Amiri M, Cedraro N et al. “*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Cystic Fibrosis: The Challenge of Persisters” *IntechOpen, Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation, Infections and Treatments*, June 9th 2021
- Mangiaterra G, Carotti E, Vaiasicca S et al. “Contribution of Drugs Interfering with Protein and Cell Wall Synthesis to the Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: An *In vitro* Model” *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 5;22(4):1628.

FFC Project#18/2019 “Investigating Achromobacter xylosoxidans pathogenicity and clinical role in CF lung infection” Maria M. Lleò (*Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona*)

- Veschetti L, Boaretti M, Saitta GM et al. “Achromobacter spp. prevalence and adaptation in cystic fibrosis lung infection” *Microbiological Research* 263 (2022) 127140
- Sandri A, Veschetti L, Saitta GM et al. “Achromobacter spp. Adaptation in Cystic Fibrosis Infection and Candidate Biomarkers of Antimicrobial Resistance *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9265.

FFC Project#19/2019 “Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery of inhalable formulations to the clinic” Paolo Visca (*Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre*), Raffella Sorrentino (*Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II*)

- Visaggio D, Frangipani E, Hijazi S et al. “Variable Susceptibility to Gallium Compounds of Major Cystic Fibrosis Pathogens” *ACS Infect Dis.* 2022; 8:78-85.
- Mitidieri E, Visaggio D, Frangipani E et al. “Intra-tracheal adm-

nistration increases gallium availability in lung: implications for antibacterial chemotherapy” *Pharmacol Res.* 2021; 170:105698

- Costabile G, Mitidieri E, Visaggio D et al. “Boosting lung accumulation of gallium with inhalable nano-embedded microparticles for the treatment of bacterial pneumonia” *Int J Pharm.* 2022 Dec 15;629:122400.

FFC Project#21/2019 “Preclinical study of a combined host-and pathogen directed approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against *Mycobacterium abscessus* infection” Maurizio Fraziano (*Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma*)

- Nisini R, Oggioni MR, Rossolini GM “Editorial: Exploiting Novel Combined Host-and Pathogen-Directed Therapies for Combating Bacterial Multidrug Resistance” *Frontiers in Immunology*, *Front Immunol.* 2020 Nov 4;11:616486.
- Rinaldi F, Hanieh P, Sennato S et al. “Rifampicin-Liposomes for *Mycobacterium abscessus* Infection Treatment: Intracellular Uptake and Antibacterial Activity Evaluation” *Pharmaceutics.* 2021 Jul 13;13(7):1070.
- Grassi G, Vanini V, De Santis F et al. “PMN-MDSC Frequency Discriminates Active Versus Latent Tuberculosis and Could Play a Role in Counteracting the Immune-Mediated Lung Damage in Active Disease” *Front Immunol.* 2021 Apr 26;12:594376.
- Poerio N, Riva C, Olimpieri T et al. “Combined Host-and Pathogen-Directed Therapy for the Control of *Mycobacterium abscessus* Infection” *Microbiol Spectr.* 2022 Feb 23;10(1):e0254621.
- Poerio N, Olimpieri T, De Angelis LH et al. “Fighting MDR-Klebsiella pneumoniae Infections by a Combined Host-and Pathogen-Directed Therapeutic Approach” *Front Immunol.* 2022 Feb 14;13:835417.
- De Santis F, Borrajo Lopez A, Virtuoso S et al. “Phosphatidylcholine Liposomes Down-Modulate CD4 Expression Reducing HIV Entry in Human Type-1 Macrophages” *Front Immunol.* 2022 May 19;13:830788.

FFC Project#11/2020 “Disrupting *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing signalling in cystic fibrosis patients as a new frontier for antibacterial therapy” Paola Brun (*Università degli Studi di Padova, Dip. di Medicina Molecolare*)

- Bernabè G, Marzaro G, Di Pietra G et al. “A novel phenolic derivative inhibits AHL-dependent quorum sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*” *Front. Pharmacol.* 13:996871.

FFC Project#14/2020 “New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other Nontuberculous Mycobacteria” Maria Rosalia Pasca (*Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Lab. Microbiologia molecolare*), Vladimir Makarov (*Federal Research Center, Moscow*), Santiago Ramón-García (*University of Zaragoza*), Enrico Tortoli (*Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive HSR, Milano*)

- Degiacomi G, Chiarelli LR, Recchia R et al. “The Antimalarial Mefloquine Shows Activity against *Mycobacterium abscessus*, Inhibiting Mycolic Acid Metabolism” *Int J Mol Sci.* 2021 Aug; 22(16): 8533.
- Egorova A, Jackson M, Gavriluk V et al. “Pipeline of anti-*Mycobacterium abscessus* small molecules: Repurposable drugs and promising novel chemical entities” *Med Res Rev.* 2021 Jul;41(4):2350-2387

FFC Project#15/2020 “Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis” Mauro Piacentini (*Università di Roma Tor Vergata, Dip. di Biologia*), Valeria Raia (*Università degli Studi di Napoli, Dip. di Scienze Mediche Traslazionali*)

- Occhigrossi L, D'Eletto M, Barlev N et al. “The Multifaceted Role of HSF1 in Pathophysiology: Focus on Its Interplay with TG2” *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 14;22(12):6366
- Occhigrossi L, Rossini R, D'Eletto M et al. “Transglutaminase 2 Regulates Innate Immunity by Modulating the STING/TBK1/IRF3 Axis” *J Immunol.* 2021 May 15;206(10):2420-2429.

- Rossin F, Costa R, Bordi M et al. “Transglutaminase Type 2 regulates the Wnt/β-catenin pathway in vertebrates” *Cell Death Dis.* 2021 Mar 5;12(3):249.
- Alonzi T, Aiello A, Petrone L et al. “Cysteamine with In vitro Anti-viral Activity and Immunomodulatory Effects Has the Potential to Be a Repurposing Drug Candidate for COVID-19 Therapy” *Cells*, 2022 11:52.
- Alonzi T, Aiello A, Repele F et al. “Cysteamine exerts in vitro anti-viral activity against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants” *Cell Death Discov.* 8:288.
- Occhigrossi L, D'Eletto M, Vecchio A et al. “Transglutaminase type 2-dependent crosslinking of IRF3 in dying melanoma cells. 2022, *Cell Death Discov.* 8:498.

FFC Project#14/2021 “Targeting small RNA-mediated regulation of virulence and antibiotic resistance to develop non-traditional therapeutic options against *Pseudomonas aeruginosa*”
Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

- Santoro S, Paganin C, Gilardi S et al. “Multifaceted Interplay between Hfq and the Small RNA GssA in *Pseudomonas aeruginosa*” *mBio*. 2023 Feb 28;14(1):e0241822.

FFC Project#15/2021 “Tackling phage resistance to increase the robustness of phage therapy for curing *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis (PhaCfy)”, Federica Briani (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

- Lokareddy RK, Hou CD, Doll SG, et al. “Terminase Subunits from the *Pseudomonas*-Phage E217”, *J. Mol. Biol.* 434(20):167799
- Cafora M, Poerio N, Forti F et al., “Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models”, *Front. Microbiol.* 13
- Li F, Hou CD, Lokareddy RK et al., “High-resolution cryo-EM structure of the *Pseudomonas* bacteriophage E217”, *Nat Commun.* 2023 Jul 8;14(1):4052.

FFC Project#16/2021 “Linking elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease” Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano), Daniela Girelli (Lab. Microbiologia FC, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano); Ersilia Vita Fiscarelli (Lab. Microbiologia FC, Ospedale Bambino Gesù, Roma)

- Cigana C, Giannella R, Colavolpe A et al., “Mutual Effects of Single and Combined CFTR Modulators and Bacterial Infection in Cystic Fibrosis”, *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0408322.

FFC Project#17/2021 “New drug combinations against non-tuberculous Mycobacteria infections in cystic fibrosis” Lanfranco Fattorini (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Malattie infettive, Roma)

- Lanni A, Borroni E, Iacobino A et al “Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions” *Microorganisms*. 2022 Jul 14;10(7):1421

FFC Project#5/2022 “Nontuberculous Mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *M. abscessus* iron acquisition pathways” Chiarelli Laurent Roberto (Lab. Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Università di Pavia)

- Mori M, Stelitano G, Cazzaniga G et al., “Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria?”, *Pharmaceutics* (2023) 15:502.
- Recchia D, Stelitano G, Stamilla A et al. “*Mycobacterium abscessus* infections in cystic fibrosis individuals: a review on therapeutic options” *Int J Mol Sci* (2023) 24:4635.
- Stelitano G, Cocorullo M, Mori M et al. “Iron acquisition and metabolism as a promising target for antimicrobials (bottlenecks and opportunities): where do we stand?” *Int J Mol Sci* (2023) 24:6181.
- Cocorullo M, Chiarelli LR, Giovanni Stelitano G, “Improving Pro-

tection to Prevent Bacterial Infections: Preliminary Applications of Reverse Vaccinology against the Main Cystic Fibrosis Pathogens”, *Vaccines* (Basel). 2023 Jul 9;11(7):1221.

FFC Project#8/2022 “Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis” Mauro Piacentini (Dip. Biologia, Università Roma Tor Vergata), Valeria Raia (Dip. di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II)

- Occhigrossi L, Rossin F, Villella VR et al. “The STING/TBK1/IRF3/IFN type I pathway is defective in cystic fibrosis” *Front Immunol.* 14:1093212.
- Rossin F, Ciccosanti F, D'Eletto M et al. “Type 2 transglutaminase in the nucleus: the new epigenetic face of a cytoplasmic enzyme”, 2023, *Cell Mol Life Sci.* 80:52.
- Palucci I, Salustri A, De Maio F et al. “Cysteamine/Cystamine Exert Anti-*Mycobacterium abscessus* Activity Alone or in Combination with Amikacin”, 2023 *Int J Mol Sci.* 24:1203.
- Occhigrossi L, D'Eletto M, Vecchio A et al. “Transglutaminase type 2-dependent crosslinking of IRF3 in dying melanoma cells” 2022, *Cell Death Discov.* 8:498.
- Alonzi T, Aiello A, Petrone L, Najafi Fard S, D'Eletto M, Falasca L, Nardacci R, Rossin F, Delogu G, Castilenti C, Capobianchi MR, Ippolito G, Piacentini M, Goletti D. 2022. Cysteamine with In Vitro Antiviral Activity and Immunomodulatory Effects Has the Potential to Be a Repurposing Drug Candidate for COVID-19 Therapy. *Cells* 11:52.
- Alonzi T, Aiello A, Repele F, Falasca L, Francalancia M, Garbuglia AR, Delogu G, Nicastri E, Piacentini M, Goletti D. 2022. Cysteamine exerts in vitro antiviral activity against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants. *Cell Death Discov.* 8:288.

FFC Project#9/2023 “Evaluation of the efficacy of the “VOMG” new antibiotic against *Mycobacterium abscessus*” Maria Rosalia Pasca (Dip. di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Università degli Studi di Pavia), Riccardo Manganelli (Dip. di Medicina Molecolare, Università di Padova), Fabio Saliu (Infection and Cystic Fibrosis Unit San Raffaele Scientific Institute, Milano)

- Degiacomi G, Chiarelli LR, Riabova O et al. “VOMG kills *Mycobacterium abscessus* and other pathogens by inhibiting cell division”, Manuscript in preparation to be submitted to “Nature Microbiology” by November 2023

4. INFLAMMATION

Terapie dell’infiammazione polmonare

FFC Project#13/2013 “Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airway epithelium” Francesca Berluti (Dip. Salute Pubblica e Malattie infettive, Università “La Sapienza”, Roma)

- Frioni A. et al. “Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases” *Biometals* 2014 Oct;27(5):843-56
- Valentini P. et al. “Lactoferrin and cystic fibrosis airway infection. In “Diet and Exercise in Cystic Fibrosis” (Ronald Ross Watson) Academic Press, Waltham” Book: WATSON-9780128000519 Chapter: 09

FFC Project#14/2013 “Pathophysiological relevance of glycosaminoglycans in *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infections and validation of new therapeutic approaches to modulate inflammation and tissue remodeling” Cristina Cigana (Infections and Cystic Fibrosis Unit, HSR, Milano), Annamaria Naggi (Ist. Ricerche Chimiche e Biochimiche G. Ronzoni), Carla Colombo (Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Yonker LM. et al. “Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis” *J Cyst Fibros.* 2015 Jul;14(4):431-9
- Cigana C. et al. “Tracking the immunopathological response to *Pseudomonas aeruginosa* during respiratory infections” *Sci Rep.*

2016 Feb 17;6:21465

- Lorè IN. et al. "IL-17A impairs host tolerance during airway chronic infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Sci Rep. 2016 May 18;6:25937

FFC Project#17/2013 "Preclinical study of a novel aerosol immunotherapeutic approach based on Janus-faced liposomes to enhance innate antimicrobial immunity" Maurizio Fraziano (Dip. di Biologia, Università Tor Vergata, Roma), Roberto Nisini (Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, ISS, Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia, Università Cattolica, Roma)

- Poerio N, Bugli F, Taus F et all "Liposomes loaded with bioactive lipids enhance antibacterial innate immunity irrespective of drug resistance" SCI REP 2017 Mar 27;7:45120

FFC Project#18/2013 "Development of a CF, IL-8/NF-KB transgenic mouse model for the in vivo long-term monitoring of the inflammatory response induced by bacteria treated or not with azithromycin" Maria M. Lleò (Dip. di Patologia e Diagnostica, Sez. Microbiologia, Università di Verona)

- Stellari F. et al. "In vivo imaging of the lung inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* and its modulation by azithromycin" J Transl Med. 2015 Aug 4;13:251
- Stellari F, Bergamini G, Ruscitti F et all "In vivo monitoring of lung inflammation in CFTR-deficient mice" J Transl Med 2016, Jul 18; 14(1): 226

FFC Project#19/2013 "The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation" Mario Romano (Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara), Licia Totani (Dip. di Farmacologia Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud), Marco Marchisio (Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara)

- Romano M. et al. "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation" Eur J Pharmacol. 2015 Aug 5;760:49-63

FFC Project#20/2013 "Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection" Paola Signorelli (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), Elisa Borghi (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), Silvano Sozzani (Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia)

- Perdoni F. et al. "Antifungal activity of Myriocin on clinically relevant *Aspergillus fumigatus* strains producing biofilm" BMC Microbiol. 2015 Oct 30; 15:248
- Ghidoni R. et al. "Role of Sphingolipids in the Pathobiology of Lung Inflammation" Mediators Inflamm. 2015; 2015:487508
- Caretti A. et al., "Inhibition of ceramide de novo synthesis by myriocin produces the double effect of reducing pathological inflammation and exerting antifungal activity against *A. fumigatus* airways infection", Biochim Biophys Acta 2016 Jun;1860(6):1089-97

FFC Project#13/2014 " Targeting extracellular Protein Disulphide Isomerase to control Burkholderia cenocepacia lung infections" Francesca Pacello (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

- Pacello F. et al. "An ERp57-mediated disulphide exchange promotes the interaction between *Burkholderia cenocepacia* and epithelial respiratory cells" Sci Rep. 2016 Feb 16;6:21140

FFC Project#17/2014 "TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung" Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Romina Nassini (Dip. di Scienze Sanitarie, Unità di Farmacologia Clinica e Oncologica, Università di Firenze)

- Prandini P. et al. "TRPA1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Cystic Fibrosis Patients" Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Jun 9

- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" Mucosal Immunology, 2020 Aug 4;11:1438
- Ribeiro CMP, McElvaney NG and Cabrini G "Editorial: Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies" Front. Pharmacol. 12:794854.
- Cabrini G "Innovative therapies for cystic fibrosis: the road from treatment to cure" Molecular Diagnosis & Therapy, 2018 Nov 26
- Rimessi A, Bezzerrini V, Salvatori F et al. "PLCB3 Loss of Function Reduces *Pseudomonas aeruginosa*-Dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis" American Journal of Respiratory cell and Molecular biology, 2018 Oct;59(4):428-436.

FFC Project#19/2014 "Mitochondrial Ca²⁺-dependent inflmasome activation exacerbates the *P. aeruginosa*-driven inflammatory response" Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

- Rimessi A. et al. "Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa* driven inflammatory response in cystic fibrosis" Nat Commun. 2015 Feb 4;6:6201
- Rimessi A, Vitto VAM, Patergnani S et al. "Update on Calcium Signaling in Cystic Fibrosis Lung Disease" Front Pharmacol. 2021 Mar 11;12:581645.

FFC Project#20/2014 "Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease" Eliodoro Pizzo (Lab. di Struttura e Funzione delle Proteine-SFP, Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Emilia Maria Pedone (Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, C.N.R Napoli)

- Pizzo E. et al. "A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating protein of *Phytolacca dioica* L: A new function of RIPs for plant defence" FEBS Lett. 2015 Sep 14;589(19 Pt B):2812-8
- Notomista E. et al. "The identification of a novel Sulfolobus islandicus CAMP-like peptide points to archaeal microorganisms as cell factories for the production of antimicrobial molecules" Microb Cell Fact. 2015 Sep 4;14:126
- Pane K. et al. "Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in *Escherichia coli*" PLoS ONE 2016 Jan 25;11(1):e0146552
- Pane K. et al. "A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells" FEBS J 2016 Jun;283(11):2115-31
- Gaglione R, Pane K, Dell'Omo E et al. "Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*" New Biotechnology 2019 Jul 25;51:39-48

FFC Project#22/2014 “Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: from drug discovery to preclinical validation” Luigina Romani (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Perugia)

- Zelante T. et al. “Tryptophan Feeding of the IDO1-AhR Axis in Host-Microbial Symbiosis” *Front Immunol.* 2014 Dec 15;5:640
- Borghi M. et al. “Antifungal Th Immunity: Growing up in Family” *Front Immunol.* 2014 Oct 15;5:506
- Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V et al. “IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis” *Nature Communications*, 2016 Mar 14;7:10791
- De Luca A, Pariano M, Cellini B et all. “The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes Respiratory Allergy in the Proximal Airways” *Cell Reports* 2017 Aug 15;20(7):1667-1680
- Piliponsky AM, Romani L “The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity” *Immunological Reviews* 2018 Mar;282(1):188-197
- Costantini C, Renga G, Oikonomou V et al. “The Mast Cell-Aryl Hydrocarbon Receptor Interplay at the Host-Microbe Interface” *Mediators of Inflammation*, 2018 Oct 28;2018:7396136
- Puccetti M, Paolicelli G, Oikonomou V et al. “Towards Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor in Cystic Fibrosis” *Mediators of Inflammation*, 2018 Feb 18;2018:1601486”
- Pariano M, Pieroni S, De Luca A et al. “Anakinra Activates Superoxide Dismutase 2 to Mitigate Inflammasome Activity” *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 18;22(12):6531.
- Van de Veerdonk FL, Renga G, Pariano M et al. “Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy” *J Clin Invest.* 2022 Jan 18;132(2):e144983.
- Pariano M, Costantini C, Santarelli I et al. “Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis” *Vaccines* 2021, 9, 1311.

FFC Project#12/2015 “Anti-inflammatory and antibacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models” Francesca Berluti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive Università La Sapienza, Roma)

- Valenti P, Frioni A, Rossi A “Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections” *Biochemistry and Cell Biology* 2017 Feb;95(1):41-47

FFC Project#20/2015 “Mitochondrial quality control machinery a role in the *P. aeruginosa*-triggered inflammatory response in cystic fibrosis” Alessandro Rimessi (Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Laboratorio Trasduzione Segnali Università di Ferrara)

- Rimessi A. et al. “Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies” *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Jun 29
- Yoboue ED, Rimessi A, Anelli T et all “Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane” *Antioxidant & redox signalling* 2017 Sep 20;27(9):583-595

FFC Project#22/2015 “A systematic investigation of miglustat-derivative iminosugar clusters as possible anti-inflammatory agents for cystic fibrosis lung disease” Maria Cristina Dechechchi (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dipartimento di Patologia e Diagnostica Università di Verona), Massimo Aureli (Dip. di Biotecnologia Medica e Medicina Traslazionale Università di Milano)

- Munari S. et al. “Neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulation of the sphingolipid metabolism” *JSM Genetics & Genomics*, 3 September 2016
- Lampronti I, Dechechchi MC, Rimessi A et all. “ β -Sitosterol Reduces the Expression of Chemotactic Cytokine Genes in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells” *Frontiers in Pharmacology* 2017 May 12;8:236

- Chiricozzi E, Loberto N, Schiumarini D et all. “Sphingolipids role in the regulation of inflammatory response: from leukocyte biology to bacterial infection” *J Leukoc Biol.* 10.1002/JLB.3MR0717-269R
- Dechechchi MC, Tamanini A, Cabrini G “Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside” *Annals of Translational Medicine* 2018 Sep;6(17):334
- De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A et al. “Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of N-alkyl-deoxyimino-sugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections for application in CF lung disease” *Eur J Med Chem* 2019 Aug 1;175:63-71.

FFC Project#24/2015 “CFTR-defective biliary cells from human induced pluripotent-stem cells (iPSC) as a model to study the role of innate immunity in cystic fibrosis liver disease” Mario Strazzabosco (Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Laboratorio di Epatologia Università degli Studi Milano-Bicocca)

- Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V et all “Src kinase inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in Δ F508 human cholangiocytes and improves CFTR correctors efficacy” *Hepatology* 2017 Jul 24
- Strazzabosco M, Fiorotto R, Cadamuro M et al. “Pathophysiological implications of innate immunity and autoinflammation in the biliary epithelium” *BBA Molecular Basis of Disease* 2018 Apr;1864(4 Pt B):1374-1379.

FFC Project#18/2016 “Interfering with glycosaminoglycans during *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection: pre-clinical exploitation of a novel therapeutic strategy for cystic fibrosis” Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, Divisione Immunologia, Trapianto e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Veraldi N, Riva C et all. “Synthesized Heparan Sulfate Competitors Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection” *International Journal of Molecular Science* 2018 Jan 9;19(1)

FFC Project#19/2016 “Resolvin D1 for targeting chronic lung inflammation, infection, and damage in cystic fibrosis” Antonio Recchiuti (Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologie Centro di Eccellenza delle Scienze dell’Invecchiamento, Università G. D’Annunzio, Chieti-Pescara)

- Pierdomenico AM, Patruno S, Codagnone M et all. microRNA-181b is increased in cystic fibrosis cells and impairs lipoxin A4 receptor-dependent mechanisms of inflammation resolution and antimicrobial defense” *SCI REP* 2017 Oct 18;7(1):13519 11-mag-18
- Isopi E, Mattoscio D, Codagnone M et al. “Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection” *Mucosal Immunol.* 2018 Jan;11(1):35-49
- Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E “Roles, action, and therapeutic potential of specialized pro-resolving lipid mediators for the treatment of inflammation in cystic fibrosis” *Frontiers in Pharmacology* 2019 Apr 2;10:252.

FFC Project#21/2017 “Testing the anti-inflammatory effects of matrix metalloprotease inhibitors in *P. aeruginosa*-infected CFTR-knockout mice by in vivo imaging techniques” Federico Boschi (Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona)

- Sandri A, Lleo MM, Signoretto C et al. “Chemotaxis anti-inflammatory effects in CF mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *The Journal of Translational Immunology*, 18 September 2020
- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. “Longitudinal monitoring of sinonasal and oral bacterial reservoirs to prevent chronic lung infection in people with cystic fibrosis” *European Respiratory Journal* 2020 Jul; 6(3): 00115-2020
- Sandri A, Lleo MM, Boschi F et al. “Protease inhibitors elicit anti-inflammatory effects in mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *Clin Exp Immunol.* 2021 Jan;203(1):87-95.

FFC Project#22/2018 "Preclinical testing in cystic fibrosis of a repurposed molecule targeting HMGB1" Marco Emilio Bianchi (Divisione Genetica e Biologia Cellulare, Unità dinamica della cromatina, Ospedale San Raffaele, Milano)

- De Leo F, Rossi A, De Marchis F et al. "Pamoic acid is an inhibitor of HMGB1-CXCL12 elicited chemotaxis and reduces inflammation in murine models of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia" Molecular Medicine (2022) 28:108

FFC Project#23/2018 "Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo" Maria Cristina Dechechchi (Dip. Patologia e Diagnostica, Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona), Annalisa Guaragna (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Scienze Chimiche)

- Esposito A, D'Alonzo D, De Fenza M et al. "Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis" Int J Mol Sci. 2020 May 9;21(9):3353

FFC Project#24/2018 "Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis" Luigina Romani (Università degli Studi di Perugia, Dip. Medicina Sperimentale)

- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. "Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans" Frontiers in Immunology, 2019 May 7;10:890
- van de Veerdonk F, Servillo G, De Luca A et al. "Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy" Science, submitted
- Costantini C, Puccetti M, Pariano M et al. "Selectively targeting key inflammatory pathways in cystic fibrosis" European Journal of Medicinal Chemistry 2020 Aug 9;206:112717
- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. "Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans" Frontiers in Immunology 2019; 10: 890
- Puccetti M, Pariano M, Renga G et al. "Targeted Drug Delivery Technologies Potentiate the Overall Therapeutic Efficacy of an Indole Derivative in a Mouse Cystic Fibrosis Setting" Cells. 2021 Jun 25;10(7):1601
- Pariano M, Puccetti M, Stincardini C et al. "Aryl Hydrocarbon Receptor Agonism Antagonizes the Hypoxia-driven Inflammation in Cystic Fibrosis" Am J Respir Cell Mol Biol. 2022 Oct 17.

FFC Project#25/2018 "Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation: therapeutic potential of hybrid lipid/polymer nanoparticles" Francesca Ungaro (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Farmacia), Olivia Monica Merkel (Dept. Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München)

- Conte G, Costabile G, Baldassi D et al. "Hybrid Lipid/Polymer Nanoparticles to Tackle the Cystic Fibrosis Mucus Barrier in siRNA Delivery to the Lungs: Does PEGylation Make the Difference?" ACS Appl. Mater. Interfaces 2022, 14, 7565–7578

FFC Project#18/2019 "Investigating *Achromobacter xylosoxidans* pathogenicity and clinical role in CF lung infection" Maria M. Lleò (Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona)

- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. "Genomic characterization of *Achromobacter* species isolates from chronic and occasional lung infection in cystic fibrosis patients" Microb Genom. 2021 Jul;7(7):000606
- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. "Mobilome Analysis of *Achromobacter* spp. Isolates from Chronic and Occasional Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients" Microorganisms. 2021 Jan 8;9(1):130.

FFC Project#20/2019 "Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of β -sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-miglustat" Maria Cristina Dechechchi (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Laboratorio di Patologia Molecolare-Laboratorio Analisi), Annalisa Guaragna (Università di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche)

- De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A et al. "Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of Nalkyl-deoxyiminosugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas*" aeruginosa infections for application in CF lung disease" Eur J Med Chem, 2019 Aug 1;175:63-71
- De Gregorio E, Esposito A, Vollario A et al. "N-Nonyloxyphenyl-l-Deoxynojirimycin Inhibits Growth, Biofilm Formation and Virulence Factors Expression of *Staphylococcus aureus*" Antibiotics 2020 Jun 26;9(6):362
- Esposito A, D'Alonzo D, De Fenza M et al. "Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis" International Journal of Molecular Sciences 2020 May; 21(9): 3353

FFC Project#22/2019 "Multi-task evaluation of TMA analogues as anti-inflammatory treatments for CF lung disease" Ilaria Lampronti (Dip. Scienze della vita e biotecnologie, Sez. biochimica e biologia molecolare, Università di Ferrara)

- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti E et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" Frontiers in Immunology, 2020 Aug 4;11:1438
- Rimessi A, Pozzato C, Carparelli L et al. "Pharmacological modulation of mitochondrial calcium uniporter controls lung inflammation in cystic fibrosis" Science Advances 2020 May; 6(19): eaax9093

FFC Project#23/2019 "Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis" Anna Silvia Pistocchi (Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)

- Cafora M, Brix A, Forti F et al. "Phages as immunomodulators and their promising use as anti-inflammatory agents in a cftr loss-of-function zebrafish model" J Cyst Fibros. 2020 Dec 6;S1569-1993(20)30927-9.
- Cafora M, Poerio N, Forti F et al. "Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models" 2022 Front. Microbiol. 13:979610.

FFC Project#17/2020 "Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis" Stefano Giovagnoli (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Scienze Farmaceutiche)

- Puccetti P, Pariano P, Stincardini C et al. "Pulmonary drug delivery technology enables anakinra repurposing in cystic fibrosis", J Control Release. 2023 Jan:353:1023-1036.

FFC Project#20/2020 "Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis" Vincenzo Summa (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Farmacia), Lucia Altucci (Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dip. di Medicina di Precisione)"

- Barone S, Cassese E, Alfano AI et al. "Chasing a Breath of Fresh Air in Cystic Fibrosis (CF): Therapeutic Potential of Selective HDAC6 Inhibitors to Tackle Multiple Pathways in CF Pathophysiology" Published as part of the Journal of Medicinal Chemistry special issue "Epigenetics 2022", J Med Chem. 2022 Feb 24;65(4):3080-3097

FFC Project#13/2021 "Probiotics: an emerging strategy to fight bacterial pulmonary infections in CF" Giovanna Batoni (Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)

- Kaya E, Batoni G, Di Luca M et al. "Planktonic and Biofilm-Associated *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* Elicit Differential Human Peripheral Blood Cell Responses" Microorganisms. 2021 Aug 31;9(9):1846.
- Batoni G, Maisetta G, Kaya E et al. "Lung-Directed Bacteriotherapy in Cystic Fibrosis: Could It Be an Option?" Antibiotics 2022, 11, 326.

FFC Project#10/2022 "Towards the development of GY-971a as anti-inflammatory drug in Cystic Fibrosis" Ilaria Lampronti (Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)

- Vaccarin C, Gabbia D, Franceschinis E et al. "Improved Trimethylangelicin Analogs for Cystic Fibrosis: Design, Synthesis and Preliminary Screening", Int J Mol Sci 2022;23:11528.
- Tupini C, Chilin A, Rossi A et al. "New TMA (4,6,4'-Trimethyl angelicin) Analogues as Anti-Inflammatory Agents in the Treatment of Cystic Fibrosis Lung Disease, Int J Mol Sci 2022; 23a:14483.
- Ribeiro CMP, Higgs MG, Muhlebach MS et al. "Revisiting Host-Pathogen Interactions in Cystic Fibrosis Lungs in the Era of CFTR Modulators", Int J Mol Sci. 2023 Mar 5;24(5):5010.

5. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH

Ricerca clinica ed epidemiologica

FFC Project#21/2013 "Clinical implications of the natural history of insulin secretory and sensitivity defects in cystic fibrosis" Alberto Battezzati (International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) DeFENS Università di Milano), Carla Colombo (Dip. Scienze Materno Infantili, Università di Milano, Centro regionale FC), Andrea Mari (Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova)

- Battezzati A. et al. "Ageand Sex-Dependent Distribution of OGTT-Related Variables in a Population of Cystic Fibrosis Patients" J Clin Endocrinol Metab. 2015 Aug;100(8):2963-71
- Alicandro G, Battezzati A, Bianchi ML et al. "Estimating body composition from skinfold thicknesses and bioelectrical impedance analysis in cystic fibrosis patients" Journal of Cystic Fibrosis, 2015 Nov;14(6):784-91

FFC Project#22/2013 "Citizens' jury and decision making on cystic fibrosis carrier screening: to screen or not to screen?" Paola Mosconi (Ist. di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" Laboratory for medical research and consumer involvement), Carlo Castellani (Centro fibrosi cistica, AOUI Verona)

- Colombo C. et al. "Alla scoperta del portatore sano della fibrosi cistica" Ric&Pra 2015;31(2):82-85
- Mosconi P. et al. "Giurie dei cittadini: coinvolgere e deliberare nell'interesse pubblico. Anche l'Italia è un paese di Giurie di cittadini" Ric&Pra 2015;31(4):149-158
- Mosconi P, Colombo C, Roberto A et al. "Deciding on cystic fibrosis carrier screening: three citizens' juries and an online survey" Eur J Public Health. 2018 Mar 19

FFC Project#23/2013 "The impact of chest computed tomography on clinical management of CF lung disease" Harm Tiddens (Erasmus Medical Centre, Sophia Children's hospital, Department of Paediatric Pulmonology and Department of Radiology, Rotterdam), Baroukh Maurice Assael (Centro fibrosi cistica, AOUI Verona)

- Bortoluzzi CF, Pontello E, Pintani E et al. "The impact of chest computed tomography and chest radiography on clinical management of cystic fibrosis lung disease" Journal of Cystic Fibrosis, 2019 Sep 4

FFC#27/2014 "Transmissibility and clinical significance of *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis" Tortoli Enrico (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Div. di Immunologia, trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Lisa Cariani (Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Clelia Di Serio (CUSSB-Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano), Stefan Niemann (Molecular Mycobacteriology, Research Center Borstel)

- Tortoli E, Kohl TA, Brow-Elliott BA et all. "Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov." Int. J Systematic and Evolut. Microbiology 2016 Nov;66(11):4471-4479.
- Tortoli E, Kohl TA, Trovato A et all "Mycobacterium abscessus in patients with cystic fibrosis: low impact of inter-human transmission in Italy" European Respiratory Journal 2017 Jul 13;50(1)
- Trovato A, Baldan R, Costa D et all. "Molecular typing of *Mycobacterium abscessus* isolated from cystic fibrosis patients" International Journal of Mycobacteriology 2017 Apr-Jun;6(2):138-141.

FFC Project#28/2014 "In vitro study of potential pro-fibrotic effect of Everolimus in different human airway cell lines. Searching for new biomarkers to optimize MTOR-inhibitor immunosuppressive treatment of cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation" Gianluigi Zaza (Unità di Nefrologia, Dip. di Medicina, Azienda Universitaria Ospedaliera, Verona), Marco Chilosi (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

- Tomei P. et al. "Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation" J Nephrol. 2016 Dec;29(6):881-891
- Granata S, Santoro G, Masola V et all. "In vitro Identification of New Transcriptomic and miRNomic Profiles Associated with Pulmonary Fibrosis Induced by High Doses Everolimus: Looking for New Pathogenetic Markers and Therapeutic Targets" Int. J. Mol. Sci. 2018 Apr 20;19(4).

FFC Project#29/2014 "Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate" Olga Luisa A. Zegarra (U.O.C. Genetica Medica, Istituto "Giannina Gaslini", Genova)

- Stigliani M. et al. "Rheological properties of Cystic Fibrosis bronchial secretion and *in vitro* drug permeation study: the effect of sodium bicarbonate" J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2016 Aug;29(4):337-45
- Gianotti A. et al. "Pharmacological rescue of mutant CFTR protein improves the viscoelastic properties of CF mucus" J Cyst Fibros. 2016 May;15(3):295-301

FFC Project#27/2015 "Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations" Natalia Cirilli (Centro di Riferimento per fibrosi cistica, Ospedale dei Bambini G. Salesi, Dipartimento Materno Infantile degli Ospedali Riuniti, Ancona)

- Cirilli N, Raia V, Rocco I et all. "Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations in CF, CFTR dysfunction, and healthy pediatric subjects" Pediatr Pulmonol 2018 Jun;53(6):728-734

FFC Project#29/2015 "Testing CFTR repair in cystic fibrosis patients carrying nonsense and channel gating mutations" Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia e Diagnostica Università di Verona), Monica Averna (Dip. di Medicina Sperimentale, sez. di Biochimica Università di Genova)

- Sorio C. et al. "Mutations of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Cause a Monocyte-Selective Adhesion Deficiency" Am J Respir Crit Care Med. 2016 May 15;193(10):1123-33
- Averna M. et al. "Abnormal activation of calpain and protein kinase Ca promotes a constitutive release of matrix metalloproteinase 9 in peripheral blood mononuclear cells from cystic fibrosis patients" Arch Biochem Biophys. 2016 Aug 15;604:103-12

- Bergamini G, Stellar F, Sandri A et all. "An IL-8 Transiently Transgenic Mouse Model for the *In vivo* Long-term Monitoring of Inflammatory Responses" J Vis Exp. 2017 Jul 7;(125)

FFC Project#20/2016 "Italian multicenter study of glucose tolerance defects in cystic fibrosis" Alberto Battezzati (Centro Internazionale per l'Inquadramento dello Stato Nutrizionale-ICANS, DeFENS, Università degli Studi di Milano)

- Colombo C, Alicandro G, Gambazza S et al. "Ventilation inhomogeneity is associated with OGTT-derived insulin secretory defects in cystic fibrosis" Pediatr Pulmonol 2018 Dec 21

FFC Project#22/2016 "Environmental and human reservoirs of Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species colonizing the lower airways of cystic fibrosis patients" Caterina Signoretto (Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia, Università di Verona)

- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. "Toothbrushes may convey bacteria to the cystic fibrosis lower airways" Journal of Oral Microbiology, 2019 Aug 7;11(1):1647036

FFC Project#27/2018 "Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis" Alessandro Palleschi (Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Pennati F, Salito C, Borzani I et al. "Quantitative Multivolume Proton-Magnetic Resonance Imaging in Lung Transplant Recipients: Comparison With Computed Tomography and Spirometry" Acad Radiol. 2021 Oct;28(10):e297-e305.

FFC Project#30/2018 "Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome" Vito Terlizzi (Centro FC, AOU Meyer, Firenze), Rita Padoan (Centro supporto FC, Spedali Civili, Brescia); Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Terlizzi V, Mergni G, Buzzetti R et al. Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): experience in Tuscany, Italy, Journal of Cystic Fibrosis, 2019 Jul;18(4):484-490
- Taccetti G, Botti M, Terlizzi V et al. "Clinical and Genotypical Features of False-Negative Patients in 26 Years of Cystic Fibrosis Neonatal Screening in Tuscany, Italy" Diagnostics (Basel) 2020 Jul 1;10(7):446
- Terlizzi V, Mergni G, Centrone C et al. "Trend of sweat chloride values in a cohort of patients carrying CFTR mutations of varying clinical consequence: Is there a risk of increasing sweat chloride over time?" Pediatr Pulmonol 2020 May;55(5):1089-1093
- Castaldo A, Cimbalo C, Castaldo RJ et al. "Cystic Fibrosis-Screening Positive Inconclusive Diagnosis: Newborn Screening and Long-Term Follow-Up Permits to Early Identify Patients with CFTR-Related Disorders" Diagnostics (Basel) 2020 Aug 8;10(8):E570
- Terlizzi V, Padoan R, Claut L et al. "CRMS/CFSPID Subjects Carrying D1152H CFTR Variant: Can the Second Variant Be a Predictor of Disease Development?" Diagnostics (Basel). 2020 Dec 12;10(12):1080.
- Terlizzi V, Claut L, Tosco A et al. "A survey of the prevalence, management and outcome of infants with an inconclusive diagnosis following newborn bloodspot screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) in six Italian centres" J Cyst Fibros. 2021 Sep;20(5):828-834.
- Terlizzi V, Padoan R "Infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis and acute recurrent pancreatitis: what definition?" J Med Screen. 2021 Jul 13;9691413211031613.
- Botti M, Terlizzi V, Francalanci M et al. "Cystic fibrosis in Tuscany: evolution of newborn screening strategies over time to the present" Ital J Pediatr. 2021 Jan 6;47(1):2.
- Terlizzi V, Claut L, Colombo C et al. "Outcomes of early repeat sweat testing in infants with cystic fibrosis transmembrane con-

ductance regulator-related metabolic syndrome/CF screen-positive, inconclusive diagnosis" Pediatr Pulmonol. 2021 Sep 22.

FFC Project#24/2019 "Early Derangements of Glucose Tolerance in Cystic Fibrosis: effect of CFTR Modulators" Alberto Battezzati (Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea, DeFENS, Università di Milano), Carla Colombo (Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Clinica Pediatrica De Marchi, Centro Regionale FC, Milano), Vincenzina Lucidi (Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Roma), Maria Cristina Lucanto (AOU Messina, Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica); Andrea Mari (Istituto di Neuroscienze, CNR, Padova)

- Battezzati A, Foppiani A, Alicandro G et al. "Prepuberal insulin secretory indices are long-term predictors of short adult stature in cystic fibrosis" Endocr Connect. 2022 May 10;11(5):e220056.
- Andrea F, Ciciriello F, Bisogno A et al. "Distribution of OGTT-Related Variables in Patients with Cystic Fibrosis from Puberty to Adulthood: An Italian Multicenter Study", J Pers Med. 2023 Mar 3;13(3):469.
- Colombo C, Foppiani A, Bisogno A et al. "Lumacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis: Effects on Glucose Metabolism and Insulin Secretion", J Endocrinol Invest. 2021 Oct;44(10):2213-2218

FFC Project#27/2019 "Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation" Vittorio Scaravilli (Dipartimento Anestesiologia, Rianimazione ed Emergenza, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano)

- Scaravilli V, Scansani S, Grasso A et al. "Right Ventricle Dysfunction in Patients With Adult Cystic Fibrosis Enlisted for Lung Transplant" Transplant Proc. Jan-Feb 2021;53(1):260-264
- Scaravilli V, Merrino A, Bichi F et al. "Longitudinal assessment of renal function after lung transplantation for cystic fibrosis: transition from post-operative acute kidney injury to acute kidney disease and chronic kidney failure" Journal of Nephrology (2022) 35:1885-1893
- Scaravilli V, Guzzardella A, Madotto F et al. "Hemodynamic failure and graft dysfunction after lung transplant: A possible clinical continuum with immediate and long-term consequences", Clin Transplant. 2023 Sep 11;e15122.

FFC Project#23/2020 "Unravelling novel biomarkers to define the progression of Mycobacterium abscessus lung disease in cystic fibrosis", Nicola Ivan Lorè (Università Vita-Salute, Ospedale San Raffaele, Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive)

- Lorè NI, Saliu F, Spitaleri A et al. "The aminoglycoside modifying enzyme Eis2 represents a new potential *in vivo* target for reducing antimicrobial drug resistance in *Mycobacterium abscessus* complex" Eur Respir J. 2022 Dec 1;60(6):2201541

FFC Project#24/2020 "Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome" Vito Terlizzi (Centro FC, AOU Meyer, Firenze), Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Terlizzi V, Motisi MA, Pellegrino R et al. "Risk factors for severe COVID-19 in people with cystic fibrosis: A systematic review" Front Pediatr. 2022 Aug 8;10:958658
- Tosco A, Castaldo A, Colombo C et al. "Clinical outcomes of a large cohort of individuals with the F508del/5T;TG12 CFTR genotype" J Cyst Fibros. 2022; 21:850-855.
- Dolce D, Claut L, Colombo C et al. "Different management approaches and outcome for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) and *Pseudomonas aeruginosa* isolation" J Cyst Fibros. 2023 Jan;22(1):73-78

FFC Project#21/2021 "Mental Health in Cystic Fibrosis patients: the prognostic role of temperament, personality and attachment styles" Gianluca Serafini (DINOGLMI, Università di Genova)

- Amerio A, Magnani L, Castellani C et al. "The Expression of Affective Temperaments in Cystic Fibrosis Patients: Psychopathological Associations and Possible Neurobiological Mechanisms" Brain Sci. 2023 Apr 5;13(4):619
- Ciprandi R, Pescini R, Serafini G et al., "Mental health in cystic fibrosis patients: predictive factors and psychopathology" Journal of Cystic Fibrosis, 2023, vol 22, suppl 2, S174.

FFC Project#15/2022 "Study on anti-fungal IMMUNOglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for Allergic Bronchopulmonary ASPERgillosis in Children with CysTic Fibrosis" Teresa Zelante (Dip. di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia)

- Gago S, Mandarano M, Floridi C et al. "Host, pathogenic fungi and the microbiome: A genetic triangle in infection" Front Immunol. 2023 Jan 17;13:1078014

FFC RICERCA FACILITIES

Cystic Fibrosis animal Core facility (CFaCore) Alessandra Bragonzi (Istituto di Ricerca San Raffaele, Milano)

- Facchini M. et al. "Long-term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice" J Vis Exp. 2014 Mar 17;(85)
- Kukavica-Ibrulj I FM et al. "Assessing *Pseudomonas aeruginosa* virulence and the host response using murine models of acute and chronic lung infection" Methods Mol Biol. 2014;1149:757-71
- Facchini M, De Fino I, Riva C, Bragonzi A "Long term chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection in mice" J Vis Exp 2014 Mar 17;(85)
- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. "Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for *Pseudomonas aeruginosa*" Eur Respir J. 2020 Mar 5;55(3):1802456.

Cystic Fibrosis Database (CFDB) Roberto Buzzetti, Donatello Salvatore (Centro FC, Osp. S. Carlo, Potenza), Valeria Raia (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Minicucci (Centro FC, Osp. Gaslini, Genova), Natalia Cirilli (Centro FC, Ospedali Riuniti, Ancona), Daniele Alessio (OnLime, Milano)

- Buzzetti R et al. "CFDB (cystic fibrosis database): a new web-based tool for cystic fibrosis specialists". Pediatr Pulmonol. 2014 Sep;49(9):938-40.

Servizio Colture Primarie Valeria Capurro (U.O.C. Genetica Medica, Istituto "G. Gaslini", Genova), Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Prandini P, De Logu F, Fusi C, Provezza L et all. "Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Patients with Cystic Fibrosis" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2016 Nov;55(5):645-656.
- Gianotti A, Capurro V, Del Piano L et al. "Small Molecule Anion Carriers Correct Abnormal Airway Surface Liquid Properties in Cystic Fibrosis Airway Epithelia" International Journal of Molecular Sciences 2020 Feb 21;21(4)
- Gianotti A, Delpiano L, Caci E "In vitro Methods for the Development and Analysis of Human Primary Airway Epithelia" Frontiers in Pharmacology 2018 Oct 26;9:1176
- Ferrera L, Capurro V, Delpiano L et al. "The Application of Bicarbonate Recovers the Chemical-Physical Properties of Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis Epithelia Models" Biology (Basel). 2021 Mar 29;10(4):278.
- Ludovico A, Moran O and Baroni D "Modulator Combination Improves In vitro the Microrheological Properties of the Airway Surface Liquid of Cystic Fibrosis Airway Epithelia" Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 11396.

STRATEGIC PROJECTS

FFC/TFCF "Task Force for Cystic Fibrosis", Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova), Nicoletta Pedemonte (Lab. Genetica Medica, Istituto G. Gaslini, Genova), Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Liessi N, Pesce E, Braccia C et al. "Distinctive lipid signatures of bronchial epithelial cells associated with cystic fibrosis drugs, including Trikafta" Journal of Clinical Investigation 2020 Aug 20; 5(16): e138722.
- Brindani N, Gianotti A, Giovani S, et al. "Identification, Structure-Activity Relationship, and Biological Characterization of 2,3,4,5-Tetrahydro-1 H-pyrido[4,3b]indoles as a Novel Class of CFTR Potentiators" Journal of medicinal chemistry, 2020 Oct 8;63(19):11169-11194
- Pedemonte N, Bertozi F, Caci E et al. "Discovery of a picomolar potency pharmacological corrector of the mutant CFTR chloride channel" Science Advances, 21 Feb 2020: Vol. 6, no. 8, eaay9669

"Molecole 3.0", Paola Barraja (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo), Luis J.V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Renda M, Barreca M, Borrelli A et al. "Novel tricyclic pyrrolo-quinolines as pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel" Scientific Reports, (2023), 13, 7604.
- Spanò V, Barreca M, Cilibiasi V et al. "Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein", Molecules (2021), 26, 1275.

Appendix 2

Institutes and Laboratories involved in the projects presented at the 21st FFC Ricerca Convention

Istituti e Laboratori attivi nei progetti presentati durante la XXI Convention di FFC Ricerca

ITALY

ABRUZZO

- Dipartimento di Scienze Mediche, Oraali e Biotecnologiche, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

CAMPANIA

- Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Federico II, Napoli
- Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Di.S.T.A.Bi.F, Seconda Università di Napoli
- Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA

EMILIA ROMAGNA

- Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara
- Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FABIT), Università degli Studi di Bologna
- Dipartimento di Chimica, Scienze delle Vita e della Sostenibilità ambientale, Università degli Studi di Parma

FRIULI VENEZIA GIULIA

- Istituto di Cristallografia, CNR, Trieste

LAZIO

- Dipartimento di Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli", Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin", Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"
- Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Laboratorio Immunologia e Patologia
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata"
- Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre, Roma
- Dipartimento di Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore Sanità (ISS), Roma
- Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma
- Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Laboratorio Microbiologia Fibrosi Cistica, Roma
- Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Roma

LIGURIA

- Centro Fibrosi Cistica, Istituto "G. Gaslini", Genova
- UOC Genetica Clinica, Istituto "G. Gaslini", Genova
- Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOGLMI)
- Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Genova
- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova
- Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), D3 PharmaChemistry Research line, Genova
- Istituto Italiano di Tecnologia, Analytical Chemistry Facility, Genova

LOMBARDIA

- Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea (ICANS), Dipartimento di Scienze per gli alimenti, la nutrizione e l'ambiente, Università di Milano
- Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia
- Lab. Microbiologia molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologia "Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia
- Dipartimento di Biotecnologie mediche e Medicina translazionale (BioMeTra), Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano
- Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, Emerging Bacterial Pathogens Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, Infection and Cystic Fibrosis Unit, IRCCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, Laboratory of Experimental Gastroenterology, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Dipartimento Anestesia, Rianimazione ed Emergenza
- Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Clinica Pediatrica De Marchi, Centro Regionale FC, Milano
- Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Microbiologia FC, Milano
- Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Milano
- Istituto Nazionale Genetica Molecolare (INGM), Milano

MARCHE

- Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"
- Dipartimento Materno Infantile, Centro Regionale FC, Ospedali Riuniti, Ancona
- Centro di Epidemiologia, Biostatistica e Informatica Medica, Università Politecnica delle Marche, Ancona
- Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

PIEMONTE

- Dipartimento di Biotecnologie molecolari e Scienze per la Salute, Università degli Studi di Torino

PUGLIA

- Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia

SICILIA

- Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica, AOU Messina
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli Studi di Palermo

TOSCANA

- Dipartimento di Biotecnologia, Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Siena

TRENTINO ALTO-ADIGE

- Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata (CIBio), Università degli Studi di Trento
- Istituto di Biofisica, CNR, Trento

UMBRIA

- Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

VENETO

- Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOUI Verona
- Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova
- Dipartimento di Farmacia e Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Padova
- Istituto di Neuroscienze, CNR, Padova
- Laboratorio Analisi, AOUI, Verona

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova

EUROPE

PORTOGALLO

- Biosystems and Integrative Sciences Institute (BioISI), University of Lisboa, Portugal

REGNO UNITO

- Queen Mary University of London, United Kingdom

Appendix 3

International Reviewers of FFC Ricerca Projects (2002-2023)

ASIA AND MIDDLE EAST

HONG KONG

- Dennis Lo Yuk Ming

INDIA

- Vasundhra Bandahri
- Vikas Gautam
- Amit Misra

ISRAEL

- Batsheva Kerem
- Orit Reish
- Hanoch Senderowitz
- Michael Wilschanski

IRAN

- Esmaeil Mortaz

JAPAN

- Hiroshi Kubo

TURCHIA

- Duygu Gözen

AUSTRALIA

- Scott Bell
- Margaret Cooley
- Martin Delatycki
- Manohar Garg
- Allan Glanville
- Phil Hansbro
- Ameneh Khatami
- Anthony Kicic
- Tim Kidd
- John Massie
- John Mattick
- (Keith) Chee Ooi
- Sarah Ranganathan
- David Reid
- Louis Rendina
- Geraint Rogers
- Claudia Trappetti
- Tony Velkov
- Shafagh Waters
- Cynthia Withchurch

CANADA

- Diana Averill-Bates
- Christine Bear
- André Cantin
- Tom Clandinin
- Elizabeth Cowley
- Lori Burrows

- Peter Durie
- Tanja Gonska
- Hartmut Grasemann
- Bob Hancock
- John W. Hanrahan
- Yeger Herman
- Waliul Khan
- Susan Koval
- Sheila Innis
- Roger Levesque
- Paul Linsdell
- Gergerly Lukacs
- Tong-jun Lin
- George A Mackie
- François Malouin
- Liu Mingyao
- Robert Newton
- Michael Parkins
- Grace Parraga
- Paul Pencharz
- Martin Post
- Danuta Radzioch
- Felix Ratjen
- Johanna Rommens
- Daniela Rotin
- Andrew Sandford
- Molly Schmid
- Aaron Shawn
- Christopher Sibley
- Pamela Sokol
- David Speert
- Michael G Surette
- Mark J. Turner
- Miguel Valvano
- Valerie Waters
- Michael Wheeler
- Herman Yeger
- Jason C. Young
- Julian Zielenky

NEW ZEALAND

- Shyamal Das

EUROPE

AUSTRIA

- Thomas Eiwegger
- Peter Jacksch
- Robert Knobler

BELGIUM

- Karim Amighi
- Gilles Brackman

- Marianne Carlon
- Jean Jacques Cassiman
- Tom Coenye
- Pierre Cornelis
- Paul Cos
- Aurélie Crabbé
- Harry Cuppens
- Christiane De Boeck
- Sophie Gohy
- Ingeborg Liebaers
- Savvas Savvides
- Peter Vandamme
- Brieuc Van Nieuwenhuyse
- François Vermeulen

CZECH REPUBLIC

- Jan Krejsek

DENMARK

- Thomas Bjarnsholt
- Oana Ciofu
- Niels Høiby
- Christian Koch
- Marie Johannesson
- Jette Elisabeth Kristiansen
- Søren Molin
- Peter E. Nielsen

FRANCE

- Emmanuel Andres
- Frederic Becq
- Frank Brouillard
- Mireille Claustres
- Christelle Coraux
- Celine Cougoule
- Laurent Debarbieux
- Laurence Delhaes
- Isabelle Durieu
- Alexander Edelman
- Brigitte Fauroux
- Claude Ferec
- Chantal Gauthier
- Jean-Marc Ghigo
- Emanuelle Girodon
- Vincent Goffin
- Aurélie Goyenvalle
- Genevieve Hery Arnaud
- Alexandre Hinzpeter
- Jacky Jaquot
- Eric Kipnis
- Laurent Kremer
- Jean Paul Latgé
- Frederic Laurent

- Rozenn Le Berre
- Fabien Lecaille
- Patricia Lemarchand
- Christine Linard
- Olivier Mignen
- Anne Munck
- Patrizia Paterlini-Bréchot
- Jean-Marc Rolain
- Marie Catherine Romey
- Juliet Royet
- Magali Taulan-Cadars
- Vinciane Saint-Criq
- Isabelle Sermet
- Virginie Scotet
- Olivier Tabary
- Lhoussaine Touqui
- Pascal Trouvè
- Clarisse Vandebrouck
- Guillaume Van Niel

GERMANY

- Robert Bals
- Wolfgang H. Binder
- Michael De Vreese
- Jahn Dieter
- Gerd Döring
- Stephan Fischer
- Christoph Freiberg
- Matthias Grieser
- Erick Gulbins
- Dominik Hartl
- Andreas Hector
- Jürgen Heesemann
- Barbara Kahl
- Winfried Kern
- Wolfgang Kuebler
- Karl Kunzelmann
- Peter Imming
- Jochen G. Mainz
- Frank-Michael Müller
- Mareike Müller
- Markus Pietsch
- Hermann Schillers
- Ursula Seidler
- Markus Sperandio
- Stefan Stamm
- Megan Stanifer
- Gratiana Steinkamp
- Burkhard Tuemmler
- Martin Ulrich
- Christiane Wolz

GREECE

- George Makrydimas

IRELAND

- Judith Coppinger
- Colum Dunne
- Elena Fernandez Fernandez
- Emer Fitzpatrick
- Catherine Greene
- Patrick T. Harrison
- Brian Harvey
- Siobhán McClean
- Gerry McElvaney
- Irene Oglesby
- Cian O'Leary
- Emer P. Reeves

ITALY

- Marco Agostini
- Guido Antonelli
- Tiziano Bandiera
- Giovanna Batoni
- Flavia Bazzoni
- Alessandra Bragonzi
- Carlo Castellani
- Paola Catastini
- Antonio De Flora
- Lucia De Franceschi
- Fabrizio De Ponti
- Marco D'Andrea
- Luis Juan Vicente Galletta
- Silvio Garattini
- Alessandro Grottesi
- Marco Lucarelli
- Silvia Mandillo
- Giancarlo Mansueto
- Giuseppe Magazzù
- Sara Montagnese
- Oscar Moran
- Nicoletta Pedemonte
- Marco Trabucchi

PORTUGAL

- Margarida Amaral
- Luka Alexander Clarke
- Carlos Farinha
- Jorge Leitão
- Miqueias Lopes-Pacheco
- Raquel Sabin

SPAIN

- Raquel Barrio
- Jaume Bertranpetit
- Ana Bustamante-Aragones
- Rafael Cantón
- Xavier Estivill
- Gertrudis Horna
- Maria Milagro Montero
- Pedro Mondejar-Lopez
- Guillermo Mtz. de Tejada de Garaizábal
- Francisco Sanchez Madrid
- Jaime Esteban Moreno
- Roberto Quesada Pato

SWEDEN

- Gunnar C. Hansson
- Georgia Mitropoulou
- Lisa Pahlman
- Ute Romling
- Birgitta Strandvik
- Craig Wheelock
- Peter Zygmunt

SWITZERLAND

- Leo Eberl
- Lukas Ebner
- Dieter Haas
- Hans Peter Fisher
- Adin Ross-Gillespie
- Georgia Mitropoulou
- Bernard Rossier

- Peter Sander

THE NETHERLANDS

- Jeffrey Beekman
- Piet Cools
- Touw Daan
- Hugo De Jonge
- Peter Klijn
- Lidewij Henneman
- Harry Heijerman
- Erik Hulzebos
- Peter JFM Merkus
- Charlotte Robroeks
- Bob Scholte
- Harm Tiddens
- Bernt Van Der Blink
- Kors van der Ent

U.K.

- Charlotte Addy
- Lucy Allen
- Matthew Avison
- Maria G. Belvisi
- Charlotte Billington
- James Birchall
- Marina Botto
- Steve Brochini
- Malcolm Brodlie
- Alan Brown
- Andrew Bush
- Philip Calder
- Steven Conway
- Alan R. Cowley
- Ruxandra Dafinca
- Jane Davies
- Louise Donnelly
- Robert Dorner
- Alistair Duff
- Stuart Elborn
- Madeleine Ennis
- Glenda Esmond
- Thomas Evans
- Alain Filloux
- Andres Floto
- Paul Foster
- Jo Fothergill
- Peter Gahan
- Erol Gaillard
- Claire Glasscoe
- John Govan
- Michael Gray
- Robert Gray
- Andrew Greening
- Uta Griesenbach
- Katja Hill
- Alexander Horsley
- Eshwar Mahenthiralingam
- Anil Mehta
- Daniel Neill
- Maurice Hallett
- Andrew Jones
- Aras Kadioglu
- Julian Parkhill
- Mauro Perretti
- Tyrone Pitt
- Daniela Riccardi
- Geraint Rogers
- Giovanni Satta
- Martin Savage
- David Sheppard
- Nicholas Simmonds
- David Smith
- Liz Sockett
- Kevin Southern
- Giulia Spoletoni
- Maurice Super
- Hui-leng Tan
- Tunney Michael
- Sabeel Valappil

- Ludovic Vallier

- Paola Vergani
- Rebecca Weiser
- John Widdicombe
- Craig Winstanley

HUNGARY

- Mónika Homa

MEXICO

- Paul Sujay

SOUTH AMERICA**ARGENTINA**

- Tomás A. Santa Coloma

BRAZIL

- Margaret Cristina da Silva Boguszewski
- André Kipnis
- Veralice Meireles Sales de Bruin
- Luiz F Onuchic
- Mauro M. Teixeira

CHILE

- Carlos Alejandro Flores Pinilla

COSTA RICA

- Arturo Solis

VENEZUELA

- Juan Bautista De Sanctis

U.S.A.**ALABAMA**

- Bakhrum K. Berdiev
- David Bedwell
- John Paul Clancy
- Jennifer Guimbellot
- Kim Keeling
- Stefanie Krick
- Sadis Matalon
- Camilla Margaroli
- Lisa Schwiebert
- Robert Wang

CALIFORNIA

- Myriam Amsallem
- William Balch
- Annelise Barron
- Carroll Cross
- Beate Illek
- Ryan Hunter
- Ronald Kopito
- Klaus Ley
- Terry Machen
- Richard Moss
- Malla M. Reddy
- Matthew Porteus
- Evan Powers
- Paul Quinton
- Minnie Sarwal
- David A. Stevens
- Charles M. Strom
- Alan Verkman
- Jeffrey Wine

COLORADO

- Frank Accurso
- Charles L. Daley
- Brian Day
- Brian Doctor
- Jonathan Harris
- Stacey Martiniano
- Jerry A. Nick
- Scott Sagel
- Herbert Schweizer
- Jeff Wagener
- Marty Zamora

CONNECTICUT

- Nadia Ameen
- Emanuela Bruscia
- Marie E. Egan
- Peter Glazer
- Diane Krause
- Joseph L. Kuti
- Curt Scharfe
- Mario Strazzabosco
- Li Tianbo

FLORIDA

- Alexander Cole
- Alexandra Quittner

GEORGIA

- Nael A McCarty
- Scott Grosse
- Rabindra M. Tirouvanziam

ILLINOIS

- John Christman
- Ann Harris
- Anver Kuliev
- Ajay Rana
- Le Shen
- Ashvani Singh
- Lee Shulman
- Jerrold Turner

INDIANA

- Crislyn D'Souza-Schorey
- Roman Dziarski
- Won Kyoo Cho
- Irina Petrache

IOWA

- Xiaopeng Li
- Dwight C. Look
- Jonathan Paul M Mochel
- David Meyerholz
- Patrick Sinn
- Ziying Yan
- Joseph Zabner

KANSAS

- John Gatti

KENTUCKY

- Stefan Stamm
- Jay Zwischenberger
- Joseph Zwischenberger

LOUISIANA

- Jay K. Kolls
- Guoshun Wang

MAINE

- Robert Owens

MARYLAND

- Biswas Roopa
- Gary Cutting
- Robert K. Ernst
- William Guggino
- Andy Kilianski
- Samuel Lai
- Gary Mansfield
- Martin Mense
- Christian Merlo
- Peter Mogayzel
- Amanda Oglesby-Sherrouse
- Kenneth N. Olivier
- Jonathan Orens
- Chris Penland
- Harvey Pollard
- Keith J. Slifer
- Neeraj Vij
- Jerry Wright
- Pamela Zeitlin

MASSACHUSSETTS

- Martin Joyce-Brady
- Terence Flotte

- Steven Freedman
- Anna Georgopoulos
- Bryan Hurley
- Allan Jacobson
- Robert Kolter
- John Ladias
- Bruce Levy
- Stephen Lory
- Hongmei Mou
- Gerald Pier
- Stefan Ryter
- Gregory Sawicki
- Charles Serhan
- Susan Slaugenhaft

MICHIGAN

- Lindsay Caverly
- Daniel Klionsky
- John J. LiPuma
- Mary O'Riodan
- Kathleen Stringer
- Christopher Waters

MINNESOTA

- Robert C. Huebert
- Mark Kurth
- Antoinette Moran

MISSOURI

- Carolyn Cannon
- Thalachallour Mohanakumar
- Stuart Sweet

NEBRASKA

- Bradley Britigan
- Channabasavaiah Gurumurthy
- Thalachallour Mohanakumar
- Yaping Tu

NEW HAMPSHIRE

- Dean Madden

- George A. O'Toole
- Bruce A. Stanton

NEW YORK

- Isabel Aznarez
- Nazzareno Ballatori
- Jue Chen
- Ville Friman
- David Goldfarb
- Cole Haynes
- John Lueck
- Lin L. Mantell
- Meghan R Pinezich
- Alice Prince
- Lisa Saiman
- Patricia Sime
- Stefan Worgall
- Tilla S. Worgall

NORTH CAROLINA

- Adler Kenneth B.
- Robert Aris
- Michael Boyle
- Douglas Cyr
- Charles Esther
- Martina Gentzsch
- Andrew Ghio
- Anthony Hickey
- Mehmet Kesimer
- Michael Knowles
- Alessandra Livraghi-Butico
- Marianne Muhlebach
- Carla Ribeiro
- John Riordan
- Gabriel Sherif
- Robert Tarran
- Amal Amer
- Melvin Berger
- Tracey L. Bonfield

OHIO

- Robert A. Bonomo
- Maria Britto
- James Chmiel
- Estelle Cormet-Boyaka
- Mitchell Drumm
- Dana S. Hardin
- Ann Harris
- Daniel Hassett
- Scott Harness
- Craig Hodges
- Lloyd Horrocks
- Valerie Hudson
- Christopher Karp
- Thomas J. Kelley
- Michael Konstan
- Benjamin Kopp
- Sanjay Rajagopalan
- Adriano Tonelli
- Donald VanDevanter
- Haitao Wen
- Daniel Wozniak

OREGON

- David C. Dawson
- Bruce L. Geller
- Xuehong Liu

PENNSYLVANIA

- Jennifer Bomberger
- Robert Bucki
- Rebekah Marie Dedrick
- Raymond Frizzell
- David Orenstein
- Paul J. Planet
- Ibrahim Tarik Ozbolat
- Keven Mara Robinson
- Ronald Rubenstein
- Douglas Wilson

SOUTH CAROLINA

- Patrick Flume

TENNESSEE

- John Christman
- Michael Laposata
- Vasiliy V. Polosukhin

TEXAS

- Carolyn Cannon
- Brian R Davis
- Tawanda Gumbo
- Raksha Jain
- Sunhee Lee
- Sergey Shevkoplyas
- Philip Thomas

UTAH

- My N. Helms
- Valerie Hudson
- Guy Zimmerman

VERMONT

- Daniel J. Weiss

VIRGINIA

- Joanna Goldberg
- Dennis E. Ohman
- Bruce Rubin

WASHINGTON

- Moira Aitken
- Jane Burns
- Chris Goss
- E. Peter Greenberg
- Lucas Hoffmann
- Samuel I. Miller
- Matt Parsek
- Margaret Rosenfeld
- Sina Tavakoli

WISCONSIN

- Philip Farrel
- Krishanu Saha
- Don Sanders

Acknowledgment

The Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (FFC Ricerca) wishes to thank all the reviewers who have so far contributed to evaluate research proposals submitted annually to the Foundation. Their strong commitment to critical analysis and targeted suggestions have helped to optimally qualify the activities of the FFC Ricerca research network.

Appendix 4

FFC Ricerca Projects (2021 – 2023) adopted by Supporters

Progetti FFC Ricerca (2021–2023) adottati da Sostenitori FFC Ricerca

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2024-2026.

GENDEL-CF. STRATEGIE DI TRASFERIMENTO GENICO NEI POLMONI PER IL TRATTAMENTO DELLA FIBROSI CISTICA
Responsabile: **Anna Cereseto** (Dipartimento CIBIO dell'Università di Trento)

Finanziamento: 1.870.207 €

Adottato da: **Lascito Anna Cantelli** (€ 490.000); **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna** (€ 100.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca “Insieme per Giulia Sofia”** (€ 20.000)

Adottabile per 1.260.207 €

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023. 1 SU 30 E NON LO SAI. UNA CAMPAGNA DI INFORMAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE SUL TEST DEL PORTATORE SANO DI FIBROSI CISTICA. FASE 1.

Responsabile: **Carlo Castellani** (Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini)

Finanziamento: € 169.826. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 20.000); **Antonio Guadagnin & Figlio Srl** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 41.826)

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023. 1 SU 30 E NON LO SAI. UNA CAMPAGNA DI INFORMAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE SUL TEST DEL PORTATORE SANO DI FIBROSI CISTICA. FASE 2.

Responsabile: **Carlo Castellani** (Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini)

Finanziamento: € 60.000.

Adottato totalmente da: **Fondazione Corrado e Bruno Maria Zaini**

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023.

MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA FASE 1. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo); **Luis J. V. Galietta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: € 190.000. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Rotary Club Verona Distretto 2060** (€ 28.000); **Delegazione FFC Ricerca del Lago di Garda** (€ 62.000)

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023.

MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA. FASE 2. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo); **Luis J. V. Galietta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: 270.000 €. Adottato totalmente da: **Rotary Club di Verona e Provincia** (€ 28.000); **Delegazione FFC Ricerca del Lago di Garda** (€ 100.000); **Associazione - La camminata del respiro “E ora di vivere”** (€ 130.000); **Latteria Montello** (€ 12.000)

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023.

MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA. FASE 3. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo); **Luis J. V. Galietta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: 187.200 €

Adottato da: **Rotary Club di Verona e Provincia** (€ 28.000).

Adottabile per 154.700 €

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2023-2024.

ESPERTI INSIEME. MIGLIORARE L'INTEGRAZIONE E LA CONDIVISIONE DEGLI OBIETTIVI FRA LA COMUNITÀ FC E IL MONDO DELLA SCIENZA E DELLA RICERCA

Responsabile: **Michele Gangemi** (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

Finanziamento: 45.000 €.

Adottato da: **UniCredit** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 10.000)

Adottabile per 15.000 €

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023.

EFFETTO-KAFTRIO NELLA MALATTIA AVANZATA. STUDIO DI EFFICACIA E SICUREZZA DI KAFTRIO NELLA VITA REALE DI PERSONE CON FC IN STADIO AVANZATO

Responsabile: **Cesare Braggion** (Direzione Scientifica, Area Ricerca Clinica FFC Ricerca)

Ricercatore principale: **Sonia Volpi** (Centro Regionale Veneto Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)

Finanziamento: € 98.136. Adottato totalmente da: **Fondazione UniCredit** (€ 25.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 73.136)

PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2023-2025.

KAFTRIO NELLA VITA REALE. EFFICACIA E SICUREZZA DI KAFTRIO NELLA VITA REALE: STUDIO ITALIANO OSSERVATORIALE E MULTICENTRICO

Responsabile: **Cesare Braggion** (Direzione Scientifica, Area Ricerca Clinica FFC Ricerca)

Ricercatore principale: **Maria Cristina Lucanto** (Centro Regionale di Riferimento per la Fibrosi Cistica di Messina)

Finanziamento: € 328.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo – Ospedaletti** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Genova** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Brindisi Torre** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 52.000); **Delegazione FFC Ricerca Cosenza Sud** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia** (€ 8.000)

► **FFC#1/2021 - Esplorazione multiomica del lipidoma dell'epitelio bronchiale primario della FC e del suo ruolo nel recupero di CFTR**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Istituto Italiano di Tecnologia IIT)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 12.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Genova “Mamme per la ricerca”** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Prato** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Reggello Firenze** (€ 15.000); **Associazione Correre a perdifiato** (€ 9.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bergamo Villa d'Alme** (€ 29.000).

► **FFC#2/2021 - Utilizzo di tecnologie CRISPR-Cas per revertire gli effetti delle mutazioni F508del e 2789+5G>A del gene CFTR**

Responsabile: **Anna Cereseto** (Università di Trento)

Finanziamento: 103.450 €.

Adottato totalmente da: **Evento “Together for Life” 2021**

► **FFC#3/2021 - Verso lo sviluppo di terapie personalizzate per i pazienti FC con mutazioni di gating resistenti**

Responsabile: **Adriana Chilin** (Dip. di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova)

Finanziamento: 70.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna**

► **FFC#4/2021 - Stress ossidativo e autofagia in fibrosi cistica: nuovi approcci biochimici e di individuazione di farmaci**

Responsabile: **Giorgio Cozza** (Dip. di Medicina Molecolare, Università di Padova)

Finanziamento: 104.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta**

ta e Val Camonica

► **FFC#5/2021 - Valutazione *in vitro* di nuovi strumenti per la modifica (*editing*) sito-specifica di RNA messaggeri per proteina CFTR con mutazioni stop**

Responsabile: **Aldo Di Leonardo** (Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche STEBICEF, Università degli Studi di Palermo)

Finanziamento: 99.500 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani**

► **FFC#6/2021 - Ottimizzazione della previsione delle risposte cliniche ai modulatori della CFTR utilizzando le cellule primarie nasali in condizioni che rispecchiano lo stato infiammatorio del paziente FC**

Responsabile: **Onofrio Laselva** (Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Novara** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Verona** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 20.000); **Loifur** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bologna** (€ 21.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 8.000); **Amici della Ritty** (€ 33.000).

► **FFC#7/2021 - Attivazione integrinica monocitaria come test di valutazione farmacologica in fibrosi cistica ulteriore analisi**

Responsabile: **Carlo Laudanna** (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)

Finanziamento: 69.850 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Nichelino** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 39.850)

► **FFC#8/2021 - Therotyping della fibrosi cistica**

Responsabile: **Marco Lucarelli** (Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma)

Finanziamento: 129.800 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Bolzano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Crotone "Vita in te ci credo"** (€ 19.800); **Metropole** (€ 10.000).

► **FFC#9/2021 - Ottimizzazione di analoghi del MKT-077 come inhibitori allosterici della HSP70 combinati con correttori CFTR F508del: un approccio multi-farmaco per contrastare la fibrosi cistica**

Responsabile: **Enrico Millo** (Dip. di Medicina Sperimentale DIMES, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 102.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 102.000)

► **FFC#10/2021 - Mutazioni orfane presenti nei pazienti italiani: caratterizzazione della risposta ai modulatori di CFTR**

Responsabile: **Nicoletta Pedemonte** (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova)

Finanziamento: 130.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Genova** (€ 57.000); **Gruppo FC Altomilanesi** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 30.000)

► **FFC#11/2021 - Studio dei bersagli alternativi per compensare la mancata funzione della proteina-canale CFTR**

Responsabile: **Paolo Scudieri** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Sondrio Tresivio Ponte "In ricordo di Teresa"** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Magenta** (€ 10.000); **Charity Dinner "Respiri"** (€ 40.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo – Ospedaletti** (€ 11.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lucca** (€ 15.000).

► **FFC#12/2021 - Inibizione farmacologica della resistenza alla colistina nei patogeni Gram-negativi della fibrosi cistica**

Responsabile: **Fiorentina Ascenzioni** (Dip. Biologia e Biotecnologie

C. Darwin, Università La Sapienza, Roma) Finanziamento: 84.040 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 84.040).

► **FFC#13/2021 - Probiotici: una strategia emergente contro le infezioni polmonari in FC**

Responsabile: **Giovanna Batoni** (Dip. di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)

Finanziamento: 35.000 €. Adottato totalmente da: **Un respiro in più Onlus e La mano tesa Onlus**

► **FFC#14/2021 - La regolazione della virulenza e dell'antibiotico resistenza mediata da piccoli RNA come bersaglio per lo sviluppo di terapie non tradizionali contro *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Giovanni Bertoni** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 70.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Brindisi Torre** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Prato** (€ 30.000); **Emanuela Cricri e amici della ricerca** (€ 20.000).

► **FFC#15/2021 - Affrontare la fago-resistenza per aumentare la solidità della terapia fagica nella cura delle infezioni batteriche in pazienti con fibrosi cistica (PhaCfy)**

Responsabile: **Federica Briani** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 21.000 €. Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV "In ricordo di Pio Nicolini"**

► **FFC#16/2021 - Valutazione delle proprietà antibatteriche del Kaftrio**

Responsabile: **Cristina Cigana** (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano)

Finanziamento: 104.000 €. Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma Vaticano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa Siracusa** (€ 19.500); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 19.500).

► **FFC#17/2021 - Nuove combinazioni di farmaci contro le infezioni da micobatteri non tubercolari nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Lanfranco Fattorini** (Dip. di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma)

Finanziamento: 70.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 55.000).

► **FFC#18/2021 - Nuove armi contro *Mycobacterium abscessus* e altri micobatteri non tubercolari**

Responsabile: **Maria Rosalia Pasca** (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia Lazzaro Spallanzani)

Finanziamento: 70.000 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Rovigo** (€ 8.000); **Latteria Montello** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Belluno** (€ 36.000).

► **FFC#19/2021 - Targeting combinato della sfigosina-1-fosfato-lisasi dell'ospite e del patogeno come strategia antimicrobica nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Barbara Cellini** (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Medicina Sperimentale) Finanziamento: 69.750 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Bologna**

► **FFC#20/2021 - Terapie prorisolutive per la fibrosi cistica mediante resolvina D1 e nanotecnologie: studi preclinici per la consegna alla clinica di formulazioni innovative**

Responsabile: **Antonio Recchietti** (Università G. d'Annunzio Chieti-Pescara, Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche)

Finanziamento: 68.100 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 30.100).

► **FFC#21/2021 - La salute psichica nei pazienti affetti da fibrosi cistica: il ruolo prognostico del temperamento, della personalità e degli stili di attaccamento**

Responsabile: **Gianluca Serafini** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Uni-

versità degli Studi di Genova)

Finanziamento: 65.950 €. Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Firenze** (€ 45.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 12.950)

► **GMSG#1/2022 - Sviluppo di sistemi di trasporto per la tecnologia CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica**

Responsabile: **Giulia Maule** (Dip. di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata CIBIO, Università di Trento)

Finanziamento: 149.00 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Val d'Alpone** (€ 80.000); **Together for Life** (€ 69.000)

► **FFC#1/2022 - Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con mutazioni orfane di terapia e per contrastare le infezioni batteriche in fibrosi cistica**

Responsabile: **Massimo Aureli** (Università di Milano, Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Crevalcore** (€ 60.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 70.000)

► **FFC#2/2022 - Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione**

Responsabile: **Fabio Bertozi** (Istituto Italiano di Tecnologia IIT Genova) Finanziamento: 63.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Bolzano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 23.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Insieme per Giulia Sofia"** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 10.000).

► **FFC#3/2022 - Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3Kγ**

Responsabile: **Emilio Hirsch** (Dip. di Biotecnologia Molecolare e Scienze della Salute, Università di Torino)

Finanziamento: 128.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Messina** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cerea "Il sorriso di Jenny"** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Chivasso** (€ 15.000); **"Un fiore per Valezia" Assemimi Cagliari** (€ 12.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Seregno** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Olbia** (€ 21.000); **Delegazione FFC ricerca di Manciano Grosseto e famiglia Catalano** (€ 12.000).

► **FFC#4/2022 - Derivati del peptide esculentina come agenti terapeutici con attività antimicrobica e potenziatrice di CFTR per il trattamento della patologia polmonare della fibrosi cistica**

Responsabile: **Maria Luisa Mangoni** (Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 65.000)

► **FFC#5/2022 - Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica**

Responsabile: **Laurent Robert Chiarelli** (Laboratorio di Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo – Ospedaletti** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Grado – Gorizia** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Benevento** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Monterotondo Roma** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Trieste** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sassari Castelsardo** (€ 58.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vigevano** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecce** (€ 8.000).

► **FFC#6/2022 - Ricerca di combinazioni di farmaci capaci di eliminare *Mycobacterium abscessus* nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Federico Giannoni** (ISS, Dip. Malattie Infettive)

Finanziamento: 70.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli**

► **FFC#7/2022 - Identificazione dei tipi di *Mycobacterium abscessus* presenti in Italia e dei biomarcatori dell'ospite per caratterizzare l'infezione da micobatteri in fibrosi cistica**

Responsabile: **Nicola Ivan Lorè** (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Finanziamento: 128.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 25.000); **Kymos Srl SB** (€ 9.000); **Antonio Guadagnin & Figlio Srl** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Martinsicuro Teramo** (€ 22.000); **LIFC Toscana Onlus** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cecina e Rosignano** (€ 54.000)

► **FFC#8/2022 - Usare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mauro Piacentini** (Dip. Biologia, Università Roma Tor Vergata)

Finanziamento: 68.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna**

► **FFC#9/2022 - L'effetto degli stimoli infiammatori sul trasporto degli ioni nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica**

Responsabile: **Luis J. V. Galietta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria, Ragusa e Siracusa** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 65.000).

► **FFC#10/2022 - Verso lo sviluppo del composto GY971a come farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica**

Responsabile: **Ilaria Lampronti** (Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)

Finanziamento: 117.750 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pesaro con Delegazione FFC Ricerca di Rivarolo Canavese e Delegazione FFC Ricerca di Parma Fidenza** (€ 87.750)

► **FFC#11/2022 - Inibire il meccanismo di attivazione piastrinica come strategia per spegnere l'infiammazione polmonare in fibrosi cistica**

Responsabile: **Domenico Mattoscio** (Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Univ. Chieti-Pescara)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Cuneo Alba**

► **FFC#12/2022 - Valutazione delle interazioni tra i batteriofagi e il sistema immunitario dell'ospite in modelli di fibrosi cistica: un passo verso l'applicazione della terapia fagica**

Responsabile: **Anna Silvia Pistocchi** (Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale Biometra, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 59.400 €

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV "In ricordo del Professor Gianni Mastella"**

► **FFC#13/2022 - Una strategia terapeutica combinata di liposomi/Kaftrio/antibiotico per il trattamento di infezioni da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maurizio Fraziano** (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Saviano** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Padova** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Latina** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 22.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 22.000).

► **FFC#14/2022 - Sfruttare l'effetto mucolitico di un enzima DNase perfezionato per il trattamento della malattia polmonare nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Riccardo Percudani** (Università di Parma, Dip. Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità ambientale)

Finanziamento: 96.400 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 14.000); **Intesa Sanpaolo** (€ 17.500); **Donazione in memoria** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca Altomilanese – Legnano**

(€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecco Valsassina** (€ 26.900).

► **FFC#15/2022 - Usare gli anticorpi come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la terapia dell'aspergillosi broncopolmonare allergica nei bambini con fibrosi cistica**

Responsabile: **Teresa Zelante** (Dip. di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fermo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fabriano Ancona** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 36.000); **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 60.000).

► **GMSG#1/2023 - Messa a punto di un modello 3D di tessuto respiratorio per studiare l'inflammazione in fibrosi cistica**

Responsabile: **Roberto Plebani** (Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università G. d'Annunzio di Chieti-Pescara)

Finanziamento: 159.162 €

Adottato totalmente da: **Together for life**

► **GMRF#1/2023 - Espianti di polmone di maiale come nuovo modello per testare la terapia fagica contro infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica**

Responsabile: **Marco Cafora** (Dip. Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 105.000 €

Adottato da: **Donatori regolari FFC Ricerca** (€ 70.000).

Adottabile per 35.000 €

► **FFC#1/2023 - Studio degli effetti secondari del Kaftrio sui grassi che compongono le cellule**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Istituto Italiano di Tecnologia - IIT Genova)

Finanziamento: 73.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 53.500); **Gruppo di Sostegno FFC Ricerca Palo del Colle** (€ 20.000)

► **FFC#2/2023 - Esplorare i percorsi cellulari della proteina CFTR mutata per potenziarne il recupero**

Responsabile: **Carlos M. Farinha** (BioISI - Biosystems and Integrative Sciences Institute, University of Lisboa, Portugal)

Finanziamento: 136.465 €

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Vimercate - in ricordo di Gloria** (€ 94.000); **Armito Teatro - Delegazione FFC Ricerca di Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Nichelino e Moncalieri** (€ 30.465)

► **FFC#3/2023 - Studio dei meccanismi alla base della variabilità di risposta ai modulatori di CFTR della mutazione N1303K su cellule nasali primarie**

Responsabile: **Renata Bocciardi** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili - DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 135.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 60.000); **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 76.500)

► **FFC#4/2023 - Strategia del cavallo di Troia per migliorare il trattamento delle infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Andrea Battistoni** (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 73.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"** (€ 35.000); **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Luciano Rossi** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 18.500)

► **FFC#5/2023 - Oltre il polmone: studiare il ruolo dell'intestino nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Alessandra Bragonzi** (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani - #8maggioèpersempre2023 in memoria di Costanza** (8.000€)

► **FFC#6/2023 - Individuare nuovi farmaci contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* mediante l'approccio di screening virtuale**

Responsabile: **Silvia Buroni** (Dip. Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia)

Finanziamento: 210.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 16.000)

Adottabile per 154.000 €

► **FFC#7/2023 - Valutazione del potenziale dell'antibiotico cefiderocol su *Pseudomonas aeruginosa* per il trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica**

Responsabile: **Barbara Citterio** (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università di Urbino)

Finanziamento: 126.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 10.000).

Adottabile per 116.000 €

► **FFC#8/2023 - Nanoparticelle inalabili per la somministrazione di combinazioni di molecole antimicrobiche nel trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica**

Responsabile: **Eugenio Notomista** (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 32.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Vitulazio** (€ 8.000); **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Maria Gardumi e Alba Leveghi** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa e Siracusa** (€ 76.500)

► **FFC#9/2023 - Valutazione dell'efficacia del nuovo antibiotico "VOMG" contro *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maria Rosalia Pasca** (Dip. di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Università degli Studi di Pavia)

Finanziamento: 136.500 €

Adottabile

► **FFC#10/2023 - Riposizionamento di farmaci per inibire l'adattamento di *Pseudomonas aeruginosa* all'ambiente polmonare nelle persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Giordano Rampioni** (Dip. di Scienze, Università Roma Tre, Roma)

Finanziamento: 66.150 €

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Otello Pegoretti** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 36.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 10.150)

► **FFC#11/2023 - Risoluzione delle infezioni da *Mycobacterium abscessus* con una terapia ispirata ai fagi**

Responsabile: **Loris Rizzello** (Istituto Nazionale Genetica Molecolare - INGM, Milano)

Finanziamento: 73.500 €

Adottato da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Silvio Pellegrini** (€ 20.000)

Adottabile per 53.500 €

► **FFC#12/2023 - Rieducare il sistema immunitario dell'ospite a neutralizzare l'infezione da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Edoardo Scarpa** (Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Firenze** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 30.000)

Adottabile per 91.500 €

► **FFC#13/2023 - Costruire strutture derivate da *Pseudomonas aeruginosa* per stimolare il sistema immunitario dell'ospite contro il batterio**

Responsabile: **Marco Sette** (Dip. di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 210.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca del Lago di Garda**

► **FFC#14/2023 - Identificazione dei meccanismi molecolari che portano all'attivazione delle cellule immunitarie Th1/17 patogeniche in fibrosi cistica**

Responsabile: **Moira Paroni** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 210.000 €

Adottato da: Delegazione **FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 10.000); Delegazione **FFC Ricerca di Vercelli** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 50.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Ghedi** (€ 40.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Il Sogno di Aiden"** (€ 40.000)

Adottabile per 40.000 €

► **FFC#15/2023 - Melanocortine per controllare l'infiammazione nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mario Romano** (Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università G. d'Annunzio di Chieti-Pescara)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000)

Adottabile per 106.500 €

► **FFC#16/2023 - Affrontare la resistenza alla terapia fagica di batteri *Pseudomonas aeruginosa* isolati da persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Federica Briani** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 113.085 €

Adottato da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Saviano** (€ 30.000)

Adottabile per 83.085 €



Presidenza
Matteo Marzotto
Segreteria di presidenza: Gabriella Cadoni
Tel. 045 8123597 - presidenza@fibrosicisticaricerca.it

Consiglio di Amministrazione
Presidente: Matteo Marzotto
Presidente emerito: Vittoriano Faganelli
Vicepresidenti: Paolo Faganelli, Michele Romano
Consiglieri: Riccardo Boatto, Raffaele Boscaini, Callisto Marco Bravi, Sandro Caffi, Francesco Cobello, Giuseppe Lauria Pinter, Patrizia Volpato

Scientific Advisory Board
Michele Gangemi, Giuseppe Magazzù

Direzione scientifica
Direttore: Carlo Castellani
Vicedirettore: Nicoletta Pedemonte
Segreteria scientifica: Federica Lavarini
Tel. 045 8127037 - federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

Gestione e promozione attività di ricerca clinica
Cesare Braggion
cesarebraggion.133@gmail.com

Gestione bandi e progetti di ricerca
Ermanno Rizzi
Tel. 344 0221751 - ermanno.rizzi@fibrosicisticaricerca.it

Comunicazione scientifica
Responsabile: Luisa Alessio
luisa.alessio@fibrosicisticaricerca.it

Comitato scientifico
Presidente: Paolo Bernardi
Consultenti: Cesare Braggion, Paola Bruni, Roberto Buzzetti, Giulio Cabrini, Emilio Clementi, Antonella Mencacci, Oscar Moran, Gian Maria Rossolini

Direzione di gestione
Giuseppe Zanferrari
Tel. 045 8123597 - 333 3665597
giuseppe.zanferrari@fibrosicisticaricerca.it

Amministrazione
Responsabile: Gabriella Cadoni
M. Bergamaschi, F. Morbioli, S. Sorio
Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025 - 3599
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it
michela.bergamaschi@fibrosicisticaricerca.it
francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it
silvia.sorio@fibrosicisticaricerca.it

Comunicazione
Responsabile: Valeria Merighi
I.Boarato, J. Bombana, S. Prando, G. Vrenna
Tel. 045 8123567 - 7026
valeria.merighi@fibrosicisticaricerca.it
isabella.boarato@fibrosicisticaricerca.it
jara.bombana@fibrosicisticaricerca.it
silvia.prando@fibrosicisticaricerca.it
giulia.vrenna@fibrosicisticaricerca.it

Progetti editoriali: Marina Zanolli
marina.zanolli@fibrosicisticaricerca.it

Ufficio stampa
Patrizia Adami - Tel. 348 3820355
Carlotta Bergamini - Tel. 333 3300469
press@fibrosicisticaricerca.it

Raccolta fondi e rapporti con il territorio
Responsabile: Fabio Cabianna
L. Andreoli, A. Boni, G. Buemi, D. Cavazza, L. Fratta
Tel. 3457423436, 045 8123605 - 7032 - 7033 - 7029 - 3604
fabio.cabianna@fibrosicisticaricerca.it
laura.andreoli@fibrosicisticaricerca.it
anastasia.boni@fibrosicisticaricerca.it
giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it
davide.cavazza@fibrosicisticaricerca.it
laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it

Corporate relations
Giulia Bovi
Tel. 045 8127028
giulia.bovi@fibrosicisticaricerca.it

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica ETS
c/o Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata
Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona
Tel. 045 8123438 - fondazione.ricercafc@aovr.veneto

DELEGAZIONI FFC RICERCA

ABRUZZO	
Pescara	3470502460
BASILICATA	
Montescaglioso (MT)	3343477508
CALABRIA	
Cosenza Nord	3490519433
Cosenza Sud	3479041138
Crotone "Vita in te ci credo"	3286146195
Reggio Calabria	3425618929
San Costantino Calabro (VV)	3887767773
Soverato (CZ)	3475283975
CAMPANIA	
Avellino	3493940749
Napoli e Pompei	081679151
Napoli	3387032132
EMILIA ROMAGNA	
Bologna	3481565099
Crevalcore (BO)	3806570161
Ferrara	3474468030
Imola e Romagna (BO)	3479616369
Parma Fidenza	3346994359
Parma	0521386303
FRIULI VENEZIA GIULIA	
Trieste	3497246586
LAZIO	
Latina	3288042186
Roma	3318655610
Roma Monterotondo	3496500536
Roma Pomezia	3491538838
Roma Vaticano	3282442701
Viterbo	3392107950
LIGURIA	
Genova	3481634818
Genova "Mamme per la ricerca"	3394195260
LOMBARDIA	
Altomilanesi Legnano (MI)	3468515264
Bergamo - Villa D'Almè	3358369504
Como Dongo (CO)	3343081368
Codogno (LO) e Piacenza	3481113384
Franciacorta e Val Camonica (BS)	3406589530
Lecco Valsassina	3389993582
Lodi	3470969534
Milano	335456809
Monza Brianza "Fibrosirun"	3338669217
Morbegno (SO)	3496852688
Pavia	3383950152
Tradate Gallarate (VA)	3472441141
Trescore Balneario (BG)	3384276716
Valchiavenna (SO)	3337063142
Vigevano (PV)	3392001843
Vimercate (MB)	3396533050
MARCHE	
Ascoli Piceno	3204792114
Fabriano (AN)	3478638704
Fermo	3394758897
Pesaro	3470191092
PIEMONTE	
Acqui Terme (AL)	3661952515
Biella	3319028525
Cuneo Alba	3336301943
Moncalvo (AT)	3395819218
Nichelino e Moncalieri (TO)	3332923955
Novara	3317287449
Torino	3288352087
Torino - Campiglione Fenile	3496250546
Torino - Rivarolo Canavese	3479672344
V.C.O Verbania (VB)	3382328074
ABRUZZO	
Valle Scrivia (AL)	3473095778
Vercelli	3351264091
PUGLIA	
Alberobello (BA)	3292113764
Altamura (BA)	3347295932
Brindisi Torre	3272056244
Foggia	3204848190
Lecce	3883498587
Taranto "A Carmen La Gioia"	3208715264
SARDEGNA	
Castelsardo (SS)	3388437919
Olbia	3346655844
Oristano Riola Sardo	3425133252
Siniscola (NU)	3207953209
Villasimius (CA)	3487162291
SICILIA	
Catania Mascalucia	3331909983
Catania Paternò	3487237760
Messina	3497109375
Palermo e Trapani	3384124077
Vittoria Ragusa (RG) e Siracusa	3386325645
TOSCANA	
Cecina e Rosignano (LI)	3406113886
Firenze	3336485308
Lucca	3403436289
Manciano (GR)	3338221877
Prato	3289076797
Reggello (FI)	3287043136
Siena	3485435913
TRENTINO ALTO ADIGE	
Bolzano	3279151521
UMBRIA	
Perugia	3711464395
Umbertide Città di Castello (PG)	3209273469
VENETO	
Belluno	3735042705
Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole" (VR)	3287140333
Bovolone (VR)	3483395278
Cerea "Il sorriso di Jenny" (VR)	3394312185
Lago di Garda (VR)	3487632784
Monselice (PD)	3356035611
Padova	3339304431
Rovigo	3491252300
Treviso Montebelluna	3358413296
Treviso Trevignano	3406749202
Val d'Alpone (VR)	3289688473
Valdadige (VR)	3406750646
Valpolicella (VR)	3393316451
Verona	3478480516
Vicenza	3338877053
MOLISE	
Campobasso	3468744118
PIEMONTE	
Casale Monferrato (AL)	3926657566
Chivasso (TO)	0119172055
Cuneo "Insieme per Giulia Sofia"	3334478856
Ivrea (TO)	3357716637
PUGLIA	
Bari Bitritto	3401618950
Bari Santeramo in Colle	3293090603
Barletta (BT)	0883519569
Brindisi Latiano	3476350915
Grottaglie (TA)	3382493210
Manfredonia (FG)	3475012570
Palo del Colle (BA)	3275527386
San Giovanni Rotondo (FG)	3408789661
Taranto Massafra	3292025039
SARDEGNA	
Alghero (SS)	3478650806
Isili (CA)	3888925391
Medio Campidano	3497829841
SICILIA	
Agrigento	3290165039
Capo D'Orlando (ME)	3319564678
Melilli (SR)	3332005089
Taormina	3474222790
Tremestieri (ME)	3427197671
TOSCANA	
Arezzo	3807784658
Montecatini Terme (PT)	3277054157
TRENTINO ALTO ADIGE	
Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica ODV (TN)	3405228888
Bolzano Val Badia	3336911430
VENETO	
Adria (RO)	3772077527
Mirano (VE)	3401668645

GRUPPI DI SOSTEGNO FFC RICERCA

ABRUZZO	
Martinsicuro (TE)	3889400461
VALLE PELIGNA E DELLA MARSICA	
(AQ)	3319351590
CALABRIA	
Cassano allo Ionio "In cammino con Francesco" (CS)	3463553586
Crotone 3407784226	
CAMERIA	
Golfo di Policastro (SA)	3288660690

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

fondazioneffcricerca

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

fibrosicisticaricerca.it

Insieme per l'obiettivo più alto, vincere la fibrosi cistica



Emma, ragazza con la fibrosi cistica e Giannmarco Tambari, campione olimpico di salto in alto



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



SOSTIENI LA RICERCA DI
UNA CURA PER TUTTI, A NATALE
SCEGLI I DONI SOLIDALI FFC RICERCA
[su fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)

Per donare

- Online sul sito: fibrosicisticaricerca.it
- Bonifico a Unicredit Banca (senza commissione presso questi sportelli):
IT 47 A 02008 11718 000102065518
- SWIFT-BIC code (per pagamenti dall'estero): **UNCRTM1N58**
- Bonifico a Banco BPM:
IT 92 H 05034 11708 000000048829
- Conto corrente postale: **n. 18841379**
- **5x1000 alla FFC Ricerca.** Nella sezione Ricerca scientifica della dichiarazione dei redditi scrivi: **93100600233**
- Lasciti: lasciti.fibrosicisticaricerca.it



DONARE CON FIDUCIA

FFC Ricerca aderisce all'Istituto Italiano della Donazione che ne attesta l'uso trasparente ed efficace dei fondi raccolti, a tutela dei diritti del donatore.

In Italia, le donazioni a favore delle Ets permettono di usufruire di agevolazioni fiscali.
Per approfondire: fibrosicisticaricerca.it/benefici-fiscali-per-le-donazioni