



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

AREA 5

Ricerca clinica ed epidemiologica



Progetto FFC #14/2022

## Sfruttare l'effetto mucolitico di un enzima DNase perfezionato per il trattamento della malattia polmonare nella fibrosi cistica



**Chi ha condotto la ricerca:**

**Responsabile: Riccardo Percudani**  
(Dipartimento di Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità ambientale, Università di Parma)



**Partner:**

**Gianfranco Pasut** (Dipartimento di Scienze del farmaco, Università di Padova), **Rosaria Casciari** (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Centro Fibrosi Cistica, Genova)



**Ricercatori coinvolti: 9**



**Qual è la durata dello studio: 2 anni**

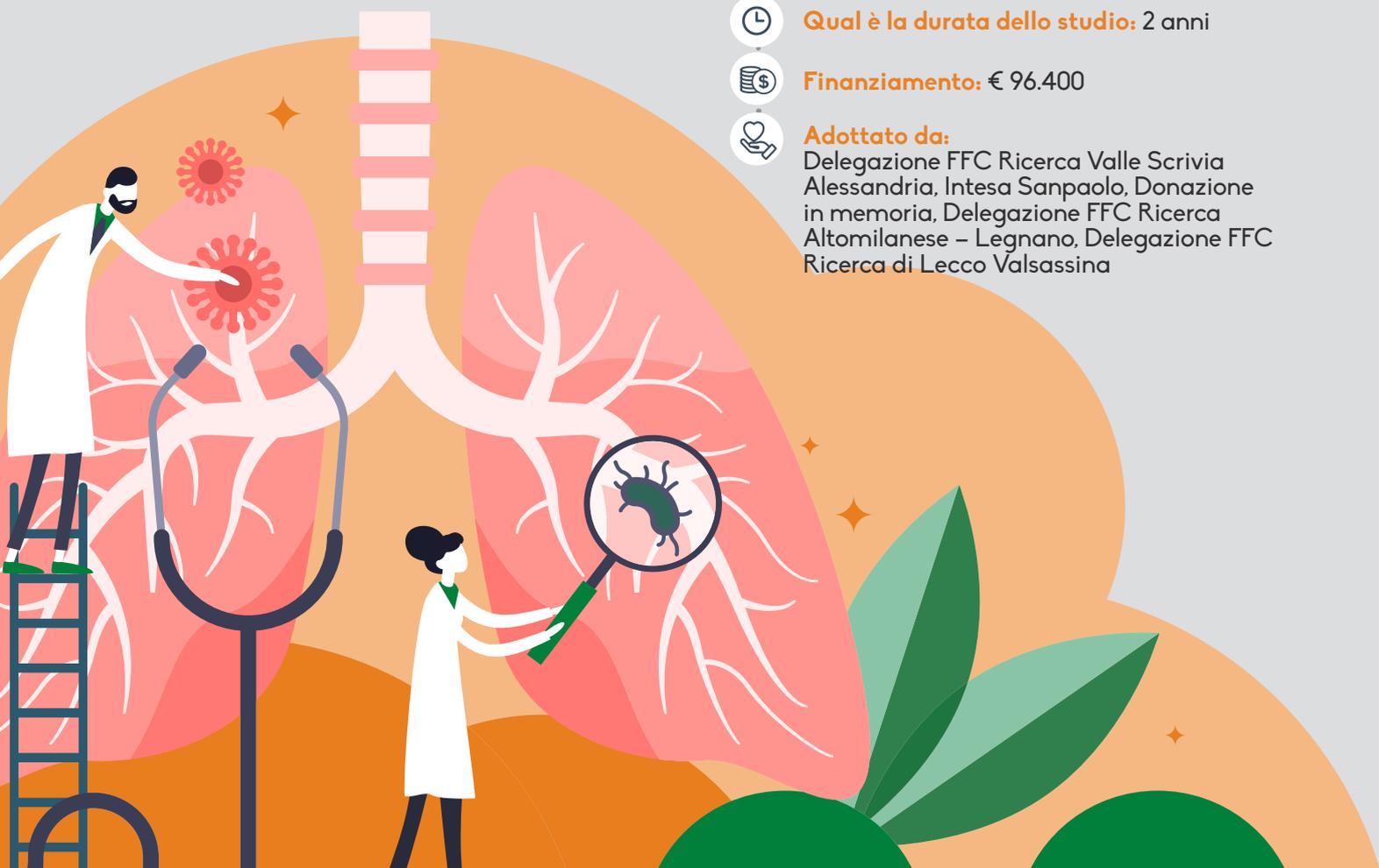


**Finanziamento: € 96.400**



**Adottato da:**

Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria, Intesa Sanpaolo, Donazione in memoria, Delegazione FFC Ricerca Altomilanese - Legnano, Delegazione FFC Ricerca di Lecco Valsassina





## Perché è importante

Migliorare le terapie per la fibrosi cistica (FC) per le persone che non rispondono alle terapie correttive esistenti è di fondamentale importanza.

Le DNasi sono enzimi che riducono la viscosità del muco bronchiale, ma sono poco resistenti all'interno dei bronchi poiché vengono degradate dall'azione di una particolare proteina, l'actina. Tuttavia si è visto che se le DNasi subiscono una modificazione chimica, detta PEGilazione, diventano resistenti all'actina e la loro efficacia terapeutica migliora, con conseguente riduzione della viscosità del muco e miglioramento della funzionalità polmonare.



## Che cosa hanno usato i ricercatori

I ricercatori hanno usato varianti della DNase1 modificate chimicamente tramite PEGilazione. Inoltre, hanno sfruttato due organismi modello, *Pichia pastoris* (lievito) ed *Escherichia coli* (batterio), per migliorare la produzione dell'enzima DNase1L2, appartenente alla stessa famiglia della DNase1 ma ad azione più prolungata, resistente all'inibizione da parte dell'actina e attiva a pH acido.



## Che cosa hanno fatto i ricercatori

I ricercatori hanno creato tre varianti PEGilate di DNase1 e ne hanno valutato l'attività *in vitro* su muco artificiale e campioni provenienti da persone con FC, con e senza actina. È stata testata la produzione e attività della DNase1L2 proveniente da *P. pastoris* ed *E. coli*.

Sono state esaminate le proprietà aerodinamiche di DNase1 PEGilata e grazie a tecniche computazionali è stato possibile ricostruire ed esprimere varianti migliorate di DNase1 e DNase1L2. Infine, è stata analizzata l'efficacia delle varianti su campioni di muco.



## Che cosa hanno ottenuto

Una delle varianti PEGilate di DNase1, chiamata PEG24mer, ha mostrato una migliore resistenza all'actina e una migliore riduzione della viscosità del muco. È stata anche ottenuta una DNase1L2 attiva, seppur con bassa resa, e altre varianti di DNase con eccellenti proprietà, mostrando il potenziale terapeutico delle nuove versioni di DNase.



## Che cosa succederà ora

Il prossimo passo sarà migliorare l'espressione di DNase1L2 e ottimizzare le varianti PEGilate per aumentarne l'efficacia. Saranno necessari ulteriori studi preclinici per valutare il potenziale terapeutico di queste varianti nelle terapie per la fibrosi cistica.

I ricercatori stanno valutando di proteggere la proprietà intellettuale ottenuta con questo progetto attraverso un brevetto.

## Per saperne di più



### Obiettivi

#### Studiare con esperimenti *in vitro* ed *ex vivo* una nuova DNasi mucolitica geneticamente modificata da usare per il trattamento della malattia polmonare in fibrosi cistica

Nel precedente progetto FFC#9/2018, il gruppo di ricerca ha studiato diversi enzimi DNasi per individuare valide alternative agli agenti mucolitici usati correntemente nel trattamento dei sintomi polmonari in persone con fibrosi cistica (FC).

Infatti, tra le componenti del muco che ostruisce le vie aeree delle persone con FC ci sono le cosiddette trappole extracellulari dei neutrofili (*neutrophil extracellular traps* o NET), cioè strutture prodotte dai neutrofili del sistema immunitario in risposta a infezioni virali, batteriche e fungine. I componenti principali delle NET, assieme a proteine e altre strutture, sono filamenti di DNA espulsi dai neutrofili.

Le DNasi vengono usate come agenti mucolitici perché tagliano selettivamente il DNA: la degradazione del DNA riduce la viscosità del muco bronchiale, favorendo la *clearance* (pulizia) delle vie aeree. In precedenza il gruppo di ricerca ha prodotto attraverso tecniche di ingegneria genetica una DNasi particolarmente efficace nel ridurre *in vitro* la viscosità di un muco artificiale FC.

Il nuovo progetto di ricerca si propone di caratterizzare questa nuova DNasi per gli studi pre-clinici, con analisi *in vitro* ed *ex vivo* su colture cellulari ed espettorato proveniente da persone con FC. Il progetto vuole così fornire nuove informazioni sulla gestione dell'infiammazione in FC tramite la distruzione dei filamenti di DNA per poi sviluppare trattamenti innovativi per la riduzione della patologia infiammatoria nelle persone con FC.



### Risultati

#### Gli enzimi DNase1 e DNase1L2, modificati tramite PEGilazione, riducono più efficacemente la viscosità del muco rispetto all'enzima non modificato

Migliorare le terapie per la fibrosi cistica (FC) per le persone che non rispondono alle terapie correttive esistenti è di fondamentale importanza.

Le DNasi sono enzimi che riducono la viscosità del muco bronchiale, ma sono poco resistenti all'interno dei bronchi poiché vengono degradati dall'azione di una particolare proteina, l'actina. Tuttavia si è visto che se le DNasi subiscono una modificazione chimica, detta PEGilazione, la loro efficacia terapeutica migliora e si ha una riduzione della viscosità del muco con miglioramento della funzionalità polmonare.

I ricercatori hanno usato varianti di DNase1 modificate chimicamente tramite PEGilazione e ne hanno valutato l'attività *in vitro* su muco artificiale e campioni provenienti da persone con FC, con e senza actina. Sono state esaminate le proprietà aerodinamiche di DNase1 PEGilata e grazie a tecniche computazionali è stato possibile ricostruire ed esprimere varianti migliorate. Inoltre, sono stati usati due organismi modello, *Pichia pastoris* (lievito) ed *Escherichia coli* (batterio), per migliorare la produzione dell'enzima DNase1L2, appartenente alla stessa famiglia della DNase1 ma ad azione più prolungata, resistente all'inibizione da parte dell'actina e attiva a pH acido. Infine, è stata analizzata l'efficacia delle varianti su campioni di muco.

Nel complesso, i ricercatori hanno ottenuto una variante PEGilata di DNase1 (detta PEG24mer)



con migliore resistenza all'actina e migliore riduzione della viscosità del muco. Hanno anche ottenuto DNase1L2 attiva, seppur con bassa resa, e altre varianti di DNase con eccellenti proprietà, mostrando il potenziale terapeutico delle nuove versioni di DNase. Il prossimo passo sarà migliorare l'espressione di DNase1L2 e ottimizzare le varianti PEGilate per aumentarne l'efficacia. Saranno necessari ulteriori studi preclinici per valutare il potenziale terapeutico di queste varianti nelle terapie per la fibrosi cistica.

## Rendiconto economico



### AREA 5

### Ricerca clinica ed epidemiologica

#### Progetto 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, Dipartimento di Chimica, Scienze delle Vita e della Sostenibilità ambientale)



**Periodo:**

01/09/22 - 31/08/24



**Grant assegnato:**

€ 96.400,0



**Usato per:**

- Materiale di consumo € 51.908,7
- Spese viaggio/convegni € 2.500,4
- Borse di studio € 25.350,0
- Spedizioni € 49,8
- Assicurazioni € 500,0

€ 80.308,9



**Saldo (usato per altri progetti):**

€ 16.091,1