



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

AREA 1

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



Progetto FFC #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**



Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: Maria Luisa Mangoni
(Dipartimento di Scienze Biochimiche,
Università La Sapienza, Roma)



Partner: Arianna Venturini (TIGEM,
Pozzuoli), **Mattia Mori** (Dipartimento di
Biotecnologie Mediche, Università di Siena)



Ricercatori coinvolti: 13



Qual è la durata dello studio: 2 anni

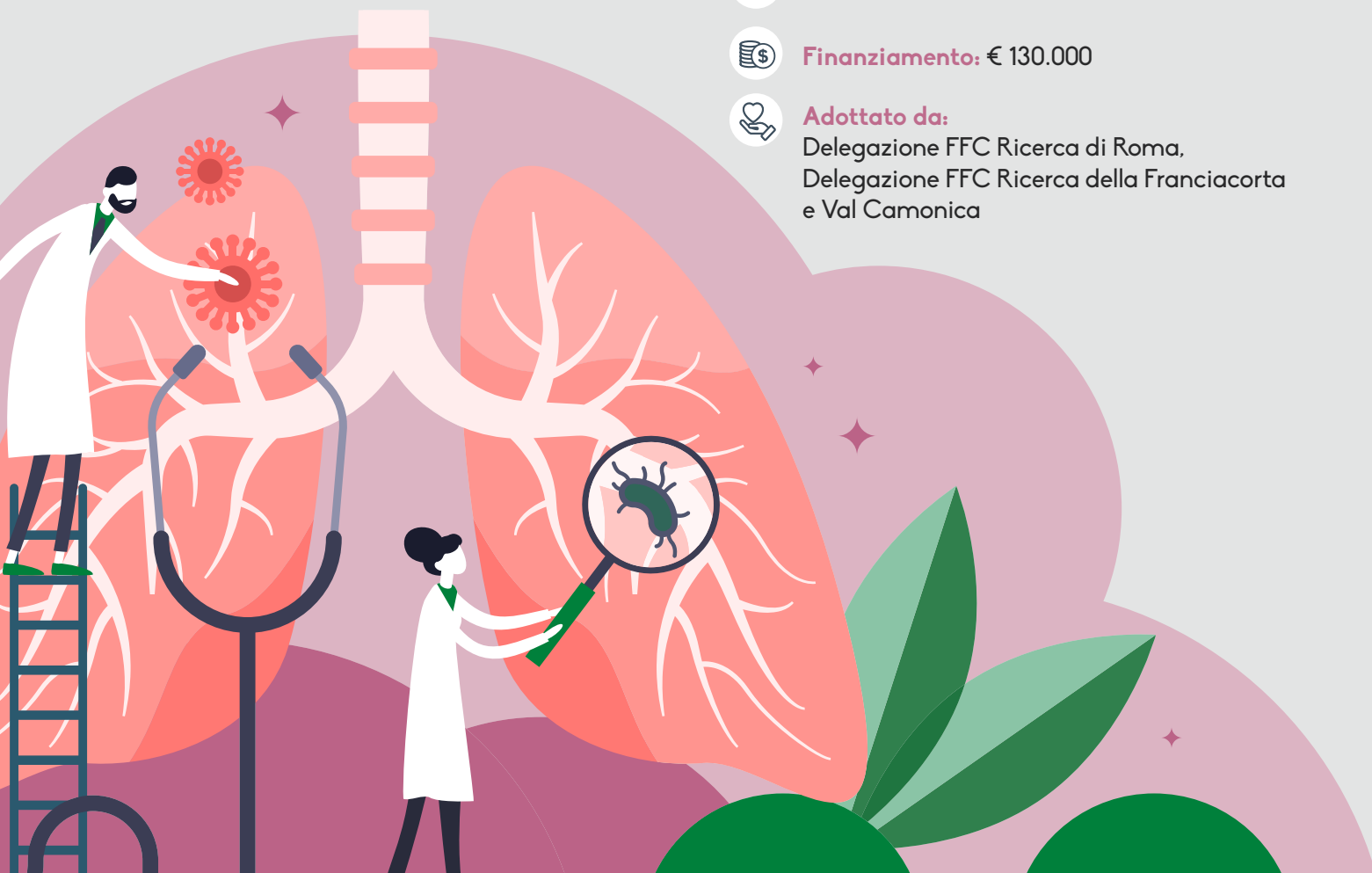


Finanziamento: € 130.000



Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca di Roma,
Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta
e Val Camonica





Perché è importante

L'attuale terapia a base di correttori e potenziatori di CFTR è efficace nel ripristinare l'attività della proteina, ma il trattamento delle infezioni polmonari resta una grande sfida.

Sono stati identificati da precedenti progetti (FFC#14/2011, FFC#11/2014, FFC#15/2017 e FFC#8/2019) peptidi antimicrobici, derivati dal composto naturale esculentina, molto efficaci contro il batterio *Pseudomonas aeruginosa*, principale patogeno polmonare in fibrosi cistica (FC). Tali peptidi, detti Esc, sono in grado di agire come potenziatori di CFTR con mutazione F508del. Lo scopo proposto è ottimizzare l'efficacia dei peptidi per la loro doppia funzione antimicrobica e potenziatrice di CFTR.



Che cosa hanno usato i ricercatori

I peptidi antimicrobici sono piccole proteine molto importanti per attivare un particolare tipo di risposta immunitaria che rappresenta la prima barriera contro gli agenti patogeni che entrano a contatto con l'organismo. È stato usato un approccio multidisciplinare con metodi elettrofisiologici, biochimici, di biologia cellulare e computazionali per studiare l'effetto dei peptidi Esc su CFTR. Sono stati usati sia epiteli di cellule bronchiali derivate da paziente che portano la mutazione F508del su una sola o su entrambe le copie del gene CFTR, sia epiteli ottenuti da linee cellulari che contengono CFTR con mutazione G551D o G1349D. Sono poi stati usati modelli animali per valutare l'attività antibatterica degli Esc.



Che cosa hanno fatto i ricercatori

È stato indagato l'effetto dei peptidi selezionati e/o loro derivati sul flusso di ioni mediati da CFTR; si è cercato di ottimizzare la loro efficacia per la doppia funzione (antimicrobica e potenziatrice di CFTR). Attraverso studi computazionali è stata studiata l'interazione dei peptidi con la proteina CFTR.

Infine, sono state valutate l'azione citotossica (cioè tossica sulle cellule) e l'efficacia antimicrobica dei peptidi più promettenti in condizioni che simulano il muco denso e disidratato presente nel polmone FC, sia *in vitro* che in modelli animali.



Che cosa hanno ottenuto

I peptidi Esc migliorano l'attività di CFTR con mutazioni che alterano il meccanismo di apertura del canale, probabilmente stabilizzando lo stato aperto. Inoltre, è stato identificato un analogo dei peptidi Esc attivo anche contro batteri Gram-positivi (come *Staphylococcus aureus*) rilevanti in FC, e in grado di potenziare la CFTR mutata senza danneggiare le cellule umane. Tali peptidi mantengono l'efficacia antibatterica anche nel polmone di modelli animali in cui è prodotto un muco appiccicoso.



Che cosa succederà ora

La ricerca verrà estesa a diverse mutazioni di CFTR. Lo scopo finale è aprire la strada allo sviluppo di una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia polmonare della FC, basata sull'uso di molecole dotate di funzione antibatterica e potenziatrice di CFTR in seguito a somministrazione nelle vie aeree.

Per saperne di più



Obiettivi

Ottimizzare l'efficacia dei peptidi Esc nella loro doppia funzione antimicrobica e potenziatrice del canale CFTR mutato

I ricercatori hanno identificato attraverso precedenti progetti (FFC#14/2011, FFC#11/2014, FFC#15/2017 e FFC#8/2019) dei peptidi antimicrobici (AMP) derivati dal composto naturale esculentina molto efficaci contro il batterio *Pseudomonas aeruginosa*. Recentemente, il gruppo di ricerca ha anche scoperto che questi peptidi Esc sono in grado di agire come potenziatori del canale CFTR con la mutazione F508del. Il progetto ha l'obiettivo di studiare l'effetto dei peptidi Esc come potenziatori di modulatori di CFTR mutata, valutando i loro possibili effetti additivi/sinergici con i farmaci. Inoltre, il gruppo di ricerca punta a ottimizzare l'efficacia dei peptidi per la loro doppia funzione antimicrobica e potenziatrice. Ulteriore obiettivo del progetto è valutare la capacità dei peptidi selezionati di preservare l'attività antibatterica nel polmone attraverso un approccio multidisciplinare sia *in vitro* che *in vivo*.



Risultati

I peptidi Esc stabilizzano l'apertura del canale CFTR e hanno efficacia antibatterica contro *P. aeruginosa* e *S. aureus* sia in modelli *in vitro* che *in vivo*

L'attuale terapia a base di correttori e potenziatori di CFTR è efficace nel ripristinare l'attività della proteina, ma il trattamento delle infezioni polmonari resta una grande sfida.

Sono stati identificati da precedenti progetti (FFC#14/2011, FFC#11/2014, FFC#15/2017 e FFC#8/2019) peptidi antimicrobici, derivati dal composto naturale esculentina, molto efficaci contro il batterio *Pseudomonas aeruginosa*, principale patogeno polmonare in fibrosi cistica (FC). Tali peptidi, detti Esc, sono in grado di agire come potenziatori di CFTR con mutazione F508del. I peptidi antimicrobici sono piccole proteine molto importanti per attivare un particolare tipo di risposta immunitaria che rappresenta la prima barriera contro gli agenti patogeni che entrano a contatto con l'organismo.

In questo nuovo progetto i ricercatori hanno ottimizzato l'efficacia dei peptidi Esc per la loro doppia funzione antimicrobica e potenziatrice di CFTR usando un approccio multidisciplinare. Tramite studi di elettrofisiologia, i ricercatori hanno indagato l'effetto dei peptidi selezionati e/o loro derivati sia su epiteli di cellule bronchiali derivate da paziente che portano la mutazione F508del su una sola o su entrambe le copie del gene CFTR, sia su epiteli ottenuti da linee cellulari che contengono CFTR con mutazione G551D o G1349D. Attraverso studi computazionali hanno quindi studiato l'interazione dei peptidi con la proteina CFTR.

Sono state poi valutate l'azione citotossica (cioè tossica sulle cellule) e l'efficacia antimicrobica dei peptidi più promettenti in condizioni che simulano il muco denso e disidratato presente nel polmone FC, sia *in vitro* che in modelli animali.

I peptidi Esc migliorano l'attività di CFTR con mutazioni che alterano il meccanismo di apertura del canale, probabilmente stabilizzando lo stato aperto. Inoltre, è stata identificata una molecola analoga dei peptidi Esc attiva anche contro batteri Gram-positivi (come *Staphylococcus aureus*) rilevanti in FC, e in grado di potenziare la CFTR mutata senza danneggiare le cellule umane.

Tali peptidi mantengono l'efficacia antibatterica anche nel polmone di modelli animali in cui è prodotto un muco appiccicoso.

La ricerca verrà ora estesa a diverse mutazioni di CFTR, con lo scopo di aprire la strada allo sviluppo di una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia polmonare della FC, basata sull'uso di molecole dotate di funzione antibatterica e potenziatrice di CFTR in seguito a somministrazione nelle vie aeree.

Pubblicazioni



An Overview of Frog Skin-Derived Esc Peptides: Promising Multifunctional Weapons against *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Pulmonary and Ocular Surface Infections.

International Journal of Molecular Sciences, 2024



International Journal of
Molecular Sciences



Review

An Overview of Frog Skin-Derived Esc Peptides: Promising Multifunctional Weapons against *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Pulmonary and Ocular Surface Infections

Maria Luisa Mangoni ^{1,*}, Maria Rosa Loffredo ^{1,†}, Bruno Casciaro ¹, Loretta Ferrera ²
and Floriana Cappiello ¹

¹ Laboratory Affiliated to Pasteur Italia-Fondazione Cenci Bolognietti, Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy; mariarosa.loffredo@uniroma1.it (M.R.L.); bruno.casciaro@uniroma1.it (B.C.); floriana.cappiello@uniroma1.it (F.C.)

² UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genoa, Italy; lorettaferrera@gaslini.org

* Correspondence: marialuisa.mangoni@uniroma1.it; Tel.: +39-0649910838

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Mangoni, M.L.; Loffredo, M.R.; Casciaro, B.; Ferrera, L.; Cappiello, F. An Overview of Frog Skin-Derived Esc Peptides: Promising Multifunctional Weapons against *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Pulmonary and Ocular Surface Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4400. <https://doi.org/10.3390/ijms25084400>

Abstract: Antimicrobial resistance is a silent pandemic harming human health, and *Pseudomonas aeruginosa* is the most common bacterium responsible for chronic pulmonary and eye infections. Antimicrobial peptides (AMPs) represent promising alternatives to conventional antibiotics. In this review, the in vitro/in vivo activities of the frog skin-derived AMP Esc(1-21) are shown. Esc(1-21) rapidly kills both the planktonic and sessile forms of *P. aeruginosa* and stimulates migration of epithelial cells, likely favoring repair of damaged tissue. However, to undertake preclinical studies, some drawbacks of AMPs (cytotoxicity, poor biostability, and limited delivery to the target site) must be overcome. For this purpose, the stereochemistry of two amino acids of Esc(1-21) was changed to obtain the diastereomer Esc(1-21)-1c, which is more stable, less cytotoxic, and more efficient in treating *P. aeruginosa*-induced lung and cornea infections in mouse models. Incorporation of these peptides (Esc peptides) into nanoparticles or immobilization to a medical device (contact lens) was revealed to be an effective strategy to ameliorate and/or to prolong the peptides' antimicrobial efficacy. Overall, these data make Esc peptides encouraging candidates for novel multifunctional drugs to treat lung pathology especially in patients with cystic fibrosis and eye dysfunctions, characterized by both tissue injury and bacterial infection.

Keywords: antimicrobial peptides; frog skin; D-amino acids; *Pseudomonas aeruginosa* infections; cystic fibrosis; wound healing; delivery systems

Publicazioni



Strategic Single-Residue Substitution in the Antimicrobial Peptide Esc(1-21) Confers Activity against *Staphylococcus aureus*, Including Drug-Resistant and Biofilm Phenotype.

ACS Infectious Diseases Journal, 2024

ACS Infectious Diseases

This article is licensed under CC-BY 4.0

Article

pubs.acs.org/journal/aidcb

Strategic Single-Residue Substitution in the Antimicrobial Peptide Esc(1-21) Confers Activity against *Staphylococcus aureus*, Including Drug-Resistant and Biofilm Phenotype

Maria Rosa Loffredo,¹ Bruno Casciaro,¹ Rosa Bellavita,¹ Cassandra Troiano, Diego Brancaccio, Floriana Cappiello, Francesco Merlino, Stefania Galdiero, Giancarlo Fabrizi, Paolo Grieco, Lorenzo Stella, Alfonso Carotenuto,* and Maria Luisa Mangoni*

Cite This: ACS Infect. Dis. 2024, 10, 2403–2418

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: *Staphylococcus aureus*, a bacterium resistant to multiple drugs, is a significant cause of illness and death worldwide. Antimicrobial peptides (AMPs) provide an excellent potential strategy to cope with this threat. Recently, we characterized a derivative of the frog-skin AMP esculentin-1a, Esc(1–21) (1) that is endowed with potent activity against Gram-negative bacteria but poor efficacy against Gram-positive strains. In this study, three analogues of peptide 1 were designed by replacing Gly⁸ with α -aminoisobutyric acid (Aib), Pro, and nPro (2–4, respectively). The single substitution Gly⁸ $\rightarrow$ Aib⁸ in peptide 2 makes it active against the planktonic form of Gram-positive bacterial strains, especially *Staphylococcus aureus*, including multidrug-resistant clinical isolates, with an improved biostability without resulting in cytotoxicity to mammalian cells. Moreover, peptide 2 showed a higher antibiofilm activity than peptide 1 against both reference and clinical isolates of *S. aureus*. Peptide 2 was also able to induce rapid bacterial killing, suggesting a membrane-perturbing mechanism of action. Structural analysis of the most active peptide 2 evidenced that the improved biological activity of peptide 2 is the consequence of a combination of higher biostability, higher α helical content, and ability to reduce membrane fluidity and to adopt a distorted helix, bent in correspondence of Aib⁸. Overall, this study has shown how a strategic single amino acid substitution is sufficient to enlarge the spectrum of activity of the original peptide 1, and improve its biological properties for therapeutic purposes, thus paving the way to optimize AMPs for the development of new broad-spectrum anti-infective agents.

KEYWORDS: antimicrobial peptides, *Staphylococcus aureus*, bent helical structure, α -aminoisobutyric acid, biofilm, multidrug-resistant strains

Publicazioni



Lung antimicrobial proteins and peptides: from host defense to therapeutic strategies.

Physiological Reviews, 2024

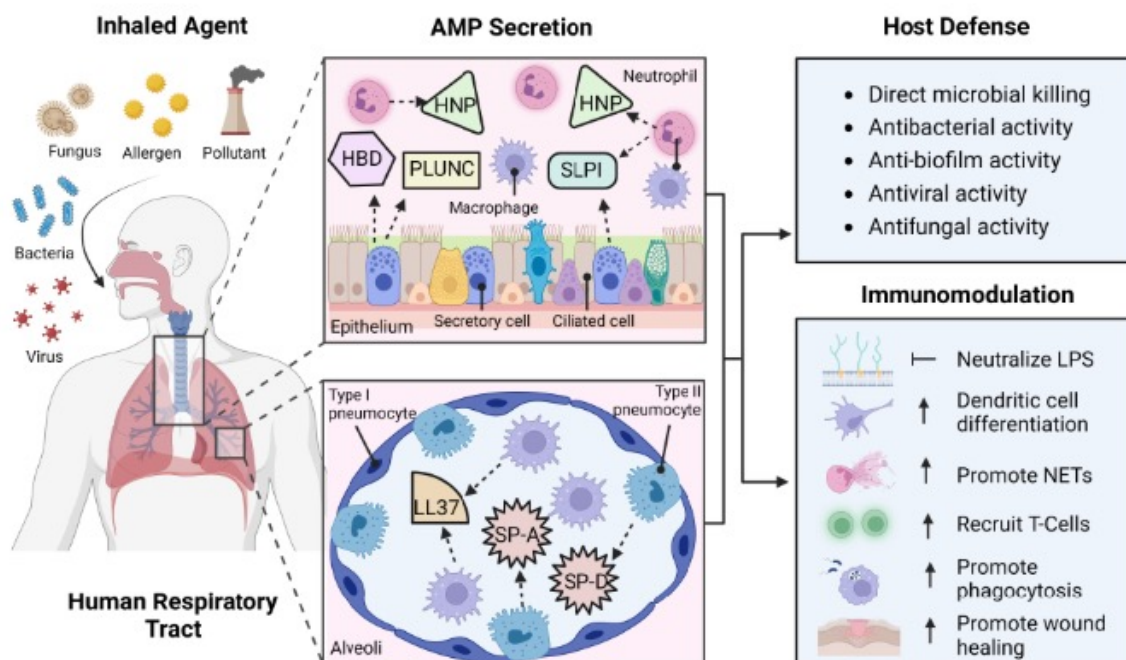
Lung antimicrobial proteins and peptides: from host defense to therapeutic strategies

Yuanpu Peter Di , Jenna Marie Kuhn , and ... See all authors 

4 SEP 2024 // <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2023>

 TOOLS  SHARE

Abstract



Publicazioni



The pH-Insensitive Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Frog Skin Derived Peptide Esc(1-21): Promising Features for Novel Anti-Infective Drugs.
Antibiotics, 2024



antibiotics



Article

The pH-Insensitive Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Frog Skin Derived Peptide Esc(1-21): Promising Features for Novel Anti-Infective Drugs

Maria Rosa Loffredo ¹, Floriana Cappiello ¹, Giacomo Cappella ¹, Elisabetta Capuozzo ¹, Luisa Torrini ²,
Fabiana Diaco ², Yuanpu Peter Di ³, Maria Luisa Mangoni ^{1,*} and Bruno Casciaro ^{1,†}

- ¹ Laboratory Affiliated to Istituto Pasteur Italia-Fondazione Cenci Bolognietti, Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy; mariarosa.loffredo@uniroma1.it (M.R.L.); floriana.cappiello@uniroma1.it (F.C.); giacomo.cappella@uniroma1.it (G.C.); elisabetta.capuozzo@uniroma1.it (E.C.); bruno.casciaro@uniroma1.it (B.C.)
² Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy; luisa.torrini@uniroma1.it (L.T.); fabiana.diaco@uniroma1.it (F.D.)
³ Department of Environmental and Occupational Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA; peterdi@pitt.edu
* Correspondence: marialuisa.mangoni@uniroma1.it
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The number of antibiotic-resistant microbial infections is dramatically increasing, while the discovery of new antibiotics is significantly declining. Furthermore, the activity of antibiotics is negatively influenced by the ability of bacteria to form sessile communities, called biofilms, and by the microenvironment of the infection, characterized by an acidic pH, especially in the lungs of patients suffering from cystic fibrosis (CF). Antimicrobial peptides represent interesting alternatives to conventional antibiotics, and with expanding properties. Here, we explored the effects of an acidic pH on the antimicrobial and antibiofilm activities of the AMP Esc(1-21) and we found that it slightly lost activity (from 2- to 4-fold) against the planktonic form of a panel of Gram-negative bacteria, with respect to a ≥ 32 -fold of traditional antibiotics. Furthermore, it retained its activity against the sessile form of these bacteria grown in media with a neutral pH, and showed similar or higher effectiveness against the biofilm form of bacteria grown in acidic media, simulating a CF-like acidic microenvironment, compared to physiological conditions.

Keywords: antimicrobial peptides; antibiotics; cystic fibrosis; acidic pH; biofilm; Gram-negative bacteria; infections



Citation: Loffredo, M.R.; Cappiello, F.; Cappella, G.; Capuozzo, E.; Torrini, L.; Diaco, F.; Di, Y.P.; Mangoni, M.L.; Casciaro, B. The pH-Insensitive Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Frog Skin Derived Peptide Esc(1-21): Promising Features for Novel Anti-Infective Drugs. *Antibiotics* **2024**, *13*, 701. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080701>

Pubblicazioni



Esc peptides and derivatives potentiate the activity of CFTR with gating defects and display antipseudomonal activity in cystic fibrosis-like lung disease Cellular and Molecular Life Sciences, 2025

Cellular and Molecular Life Sciences (2025) 82:121
<https://doi.org/10.1007/s00018-025-05633-9>

Cellular and Molecular Life Sciences

ORIGINAL ARTICLE



Esc peptides and derivatives potentiate the activity of CFTR with gating defects and display antipseudomonal activity in cystic fibrosis-like lung disease

Loretta Ferrera¹ · Floriana Capiello² · Arianna Venturini³ · Hexin Lu⁴ · Bruno Casciaro² · Giacomo Cappella² · Giulio Bontempi⁵ · Alessandra Corrente² · Raffaele Strippoli⁶ · Federico Zara^{1,7} · Y. Peter Di⁴ · Luis J. V. Galletta^{3,8} · Mattia Mori⁹ · Maria Luisa Mangoni²

Received: 8 November 2024 / Revised: 25 January 2025 / Accepted: 19 February 2025
© The Author(s) 2025

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a rare disease caused by mutations in the gene encoding the CF transmembrane conductance regulator (CFTR), a chloride channel with an important role in the airways. Despite the clinical efficacy of present modulators in restoring the activity of defective CFTR, there are patients who show persistent pulmonary infections, mainly due to *Pseudomonas aeruginosa*. Recently, we reported an unprecedented property of antimicrobial peptides i.e. Esc peptides, which consists in their ability to act as potentiators of CFTR carrying the most common mutation (the loss of phenylalanine 508) affecting protein folding, trafficking and gating. In this work, by electrophysiology experiments and computational studies, the capability of these peptides and de-novo designed analogs was demonstrated to recover the function of other mutated forms of CFTR which severely affect the channel gating (G551D and G1349D). This is presumably due to direct interaction of the peptides with the nucleotide binding domains (NBDs) of CFTR, followed by a novel local phenomenon consisting in distancing residues located at the cytosolic side of the NBDs interface, thus stabilizing the open conformation of the pore at its cytosolic end. The most promising peptides for the dual antimicrobial and CFTR potentiator activities were also shown to display antipseudomonal activity in conditions mimicking the CF pulmonary ion transport and mucus obstruction, with a higher efficacy than the clinically used colistin. These studies should assist in development of novel drugs for lung pathology in CF, with dual CFTR potentiator and large spectrum antibiotic activities.

Keywords Antimicrobial peptides · CFTR potentiators · Cystic fibrosis · Antibiotic resistance · Lung infection



Brevetti



- **Brevetto n. 102019000018938. Esculentin and its derivatives for use for treatment of cystic fibrosis**” ownership: Sapienza University; Italian Cystic Fibrosis Foundation and G. Gaslini Hospital. Fasi nazionali della domanda internazionale n. PCT/EP2020/078394

Abstract presentati a congressi scientifici



- **How a single nonconventional amino acid can modify the effectiveness of amphibian antimicrobial peptides**
48 FEBS Meeting (Federation of European Biochemical Societies), Turin, Italy, 29 giugno-3 luglio 2024
- **In vitro effect of the acidic pH on the susceptibility of the antimicrobial peptide Esc(1-21) against respiratory pathogens in cystic fibrosis lung environment**
37th European Peptide Symposium-14th International Peptide Symposium, Florence, Italy, 25-29 August 2024
- **How a single non-conventional amino acid can modify the effectiveness of amphibian antimicrobial peptides**
37th European Peptide Symposium-14th International Peptide Symposium, Florence, Italy, 25-29 August 2024
- **Esc peptides for novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections: Beyond antimicrobial activity**
37th European Peptide Symposium-14th International Peptide Symposium, Florence, Italy, 25-29 August 2024
- **Strategic amino acid substitutions in the primary structure of the antimicrobial peptide Esc(1-21) to modulate its biological properties**
AMYC-BIOMED 2024, Rome, Italy, 23-25 September 2024

Rendiconto economico



AREA 1

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

Progetto 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

(Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma)



Periodo:

01/09/22 - 31/08/24



Grant assegnato:

€ 130.000,0



Usato per:

- Materiale di consumo	€ 87.991,5
- Spese viaggio/convegni	€ 2.095,2
- Borse di studio	€ 31.600,0
- Servizi scientifici	€ 980,0
- Spedizioni	€ 454,4
- Utilizzo Facilities FFC Ricerca	€ 950,0

€ 124.071,0



Saldo (usato per altri progetti):

€ 5.929,0