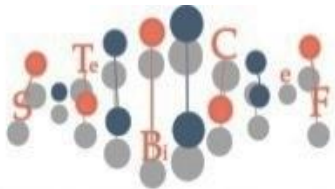


*XXVII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica*  
*XVII Congresso Nazionale della Società Italiana*  
*per lo studio della Fibrosi Cistica*  
**Napoli, Grand Hotel Continental, 20-23 ottobre 2021**



# **Correzione farmacologica delle mutazioni di stop**



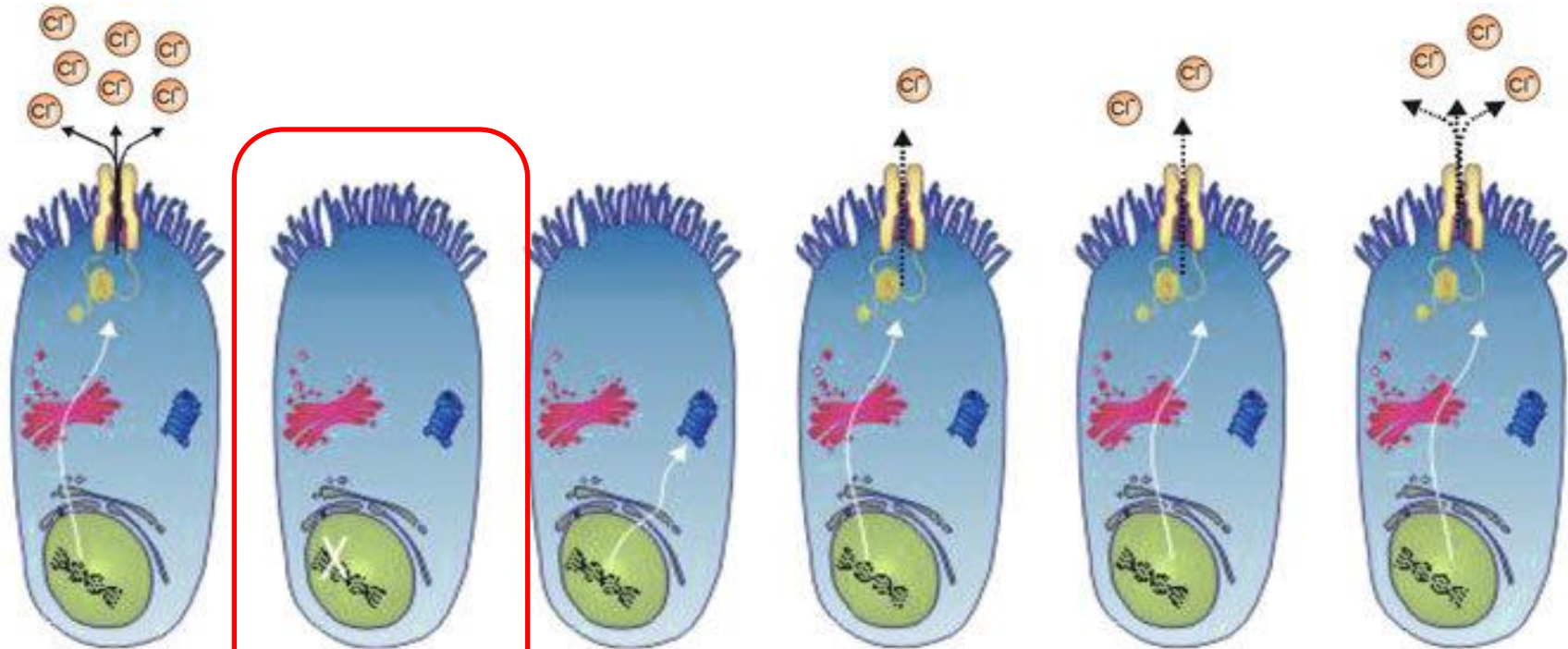
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE  
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)



*fondazione per la ricerca  
sulla fibrosi cistica - onlus*  
italian cystic fibrosis research foundation

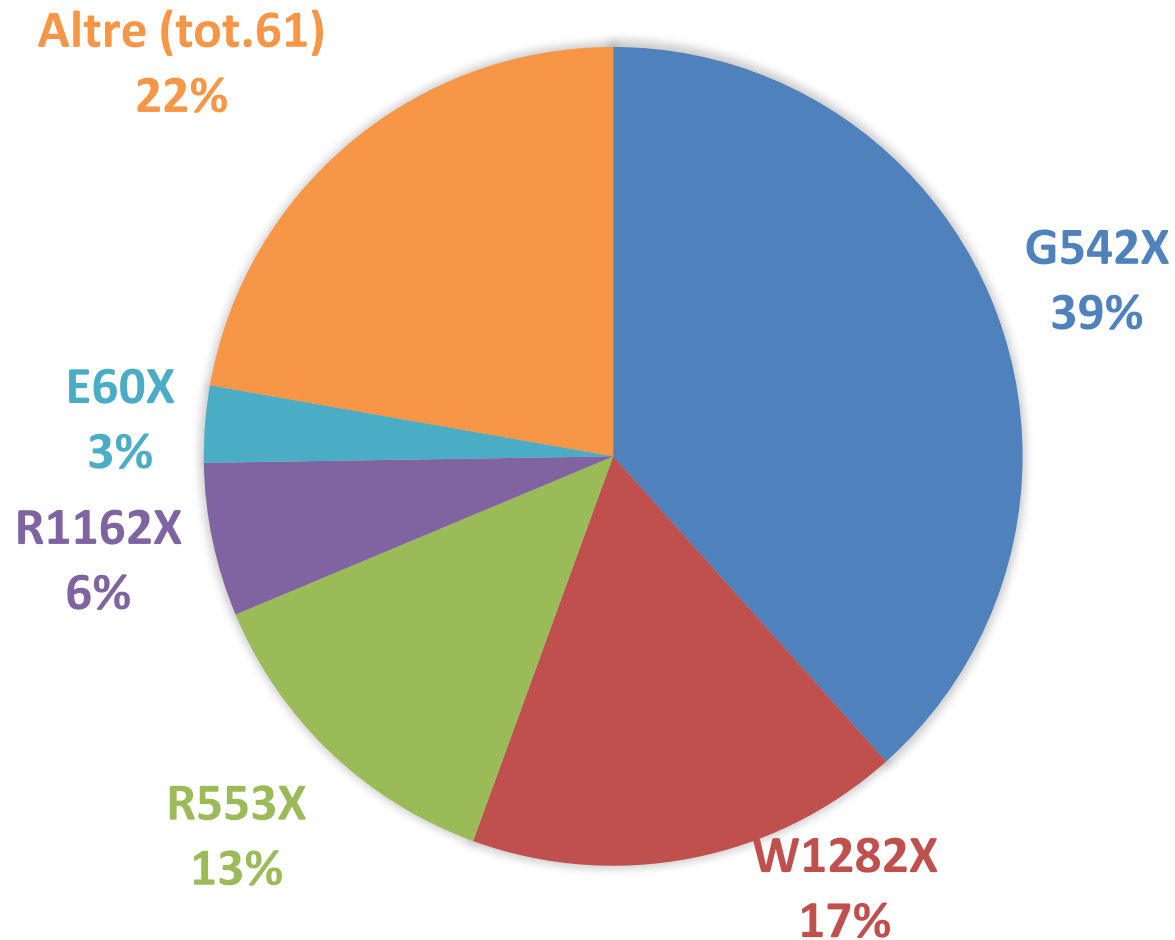
*Prof. Laura Lentini-Dip.STEBICEF*  
*Università degli Studi di Palermo*

# Mutazioni del gene *CFTR*

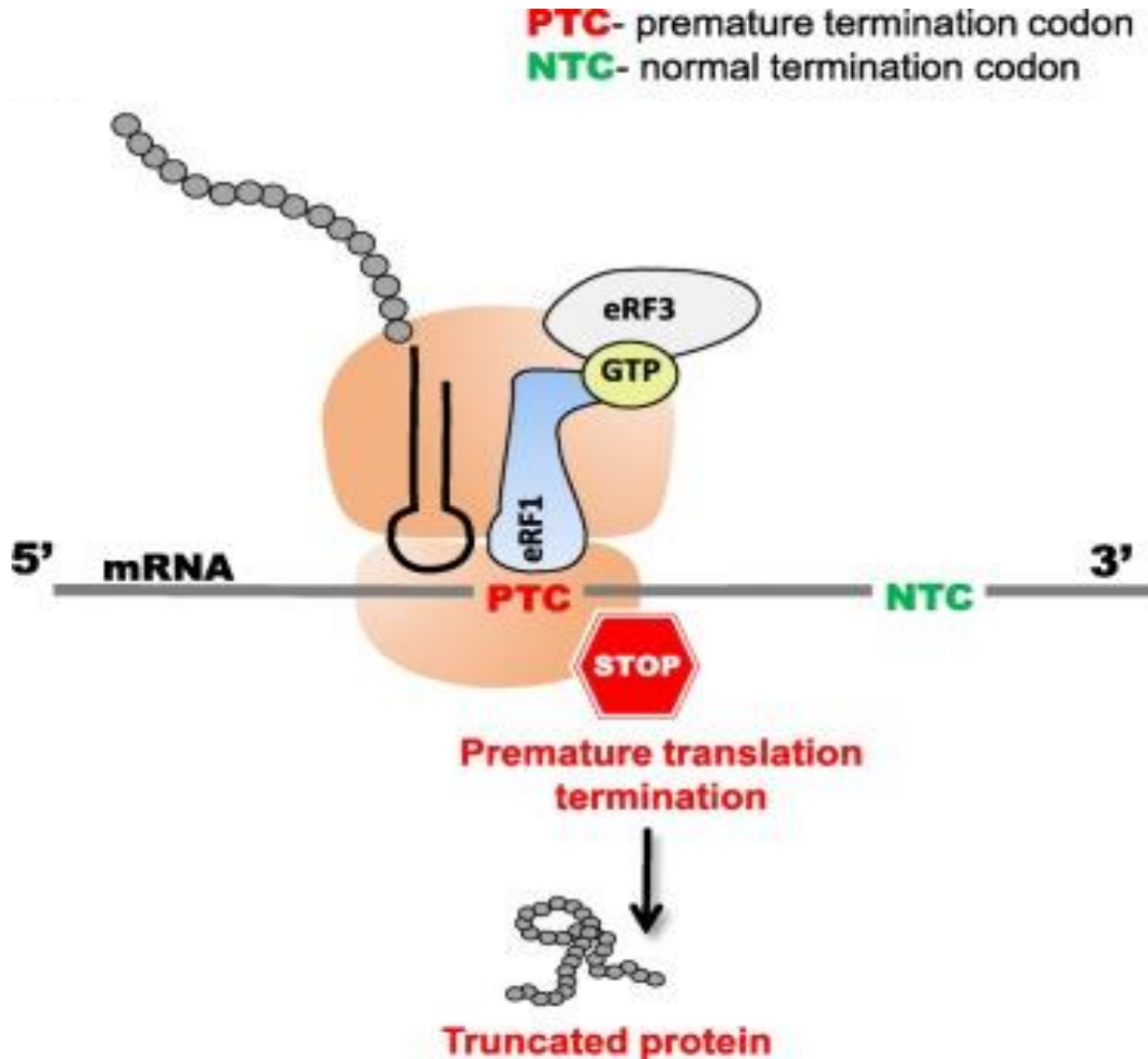


|                      | Class I  | Class II                                  | Class III                                | Class IV                          | Class IV                                    |
|----------------------|--|---|--|-----------------------------------|---|
| Defect               | Defective Synthesis                                    | Defective processing or maturation        | Defective regulation                     | Defective conductance             | Reduced synthesis and stability             |
| Therapy              | Readthrough  | Correctors (+ potentiators)               | Potentiators                             | Potentiators                      | Potentiators<br>Splicing modulators         |
| Mutations (examples) | <b>G542X</b><br>W1282X<br>R553X, E882X<br>621 + 1G → T | <b>ΔF508</b><br>N1303K<br>ΔI507<br>R1066C | <b>G551D</b><br>G551S<br>G178R<br>G1244E | R117H<br>R334W<br>R347P<br>R1070W | 3272 6A→G<br>A455E<br>D565G<br>3849+1kb C→T |

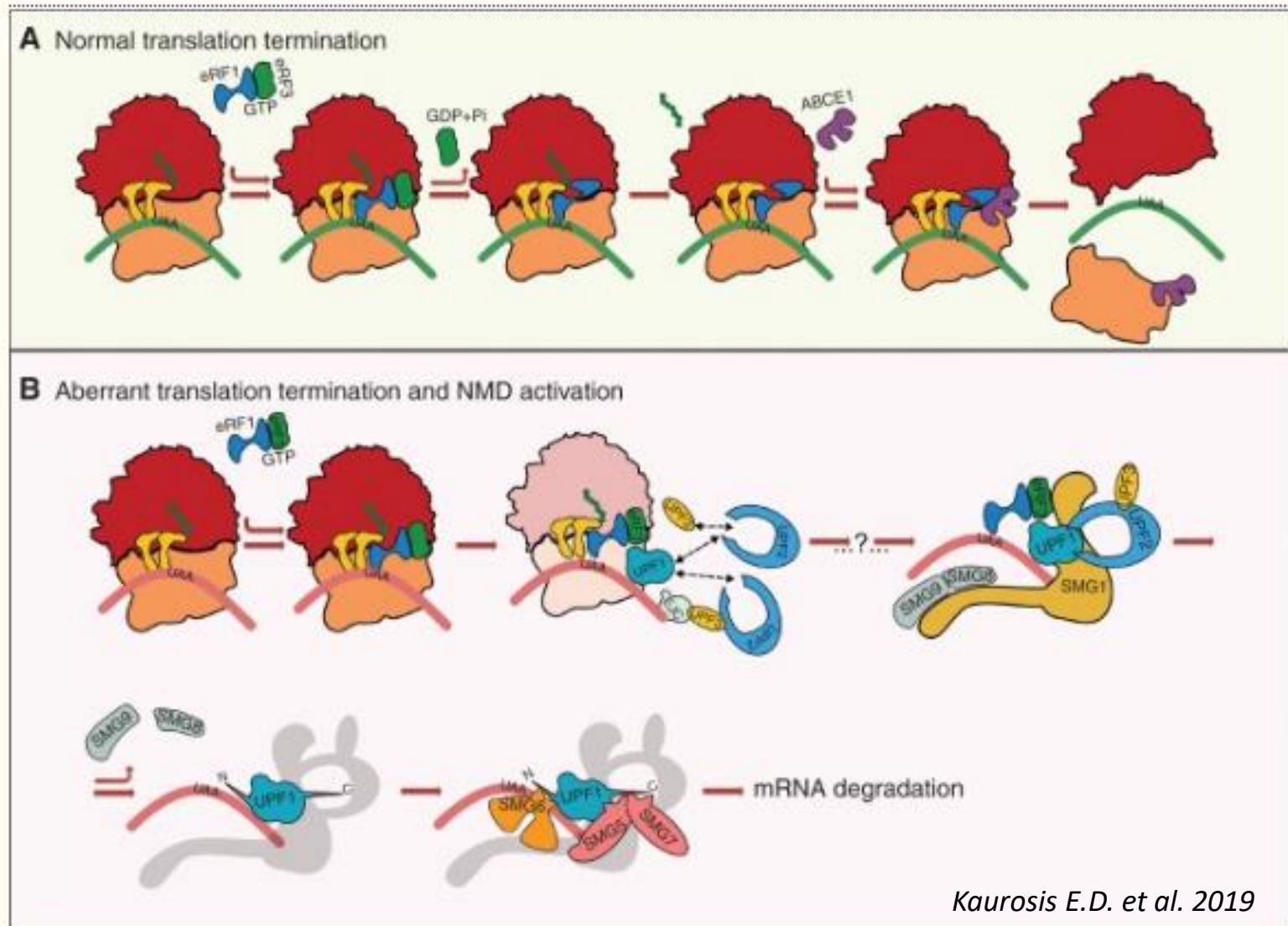
# Frequenza degli alleli *nonsense* nella popolazione globale FC



# Interruzione del processo di traduzione della proteina CFTR

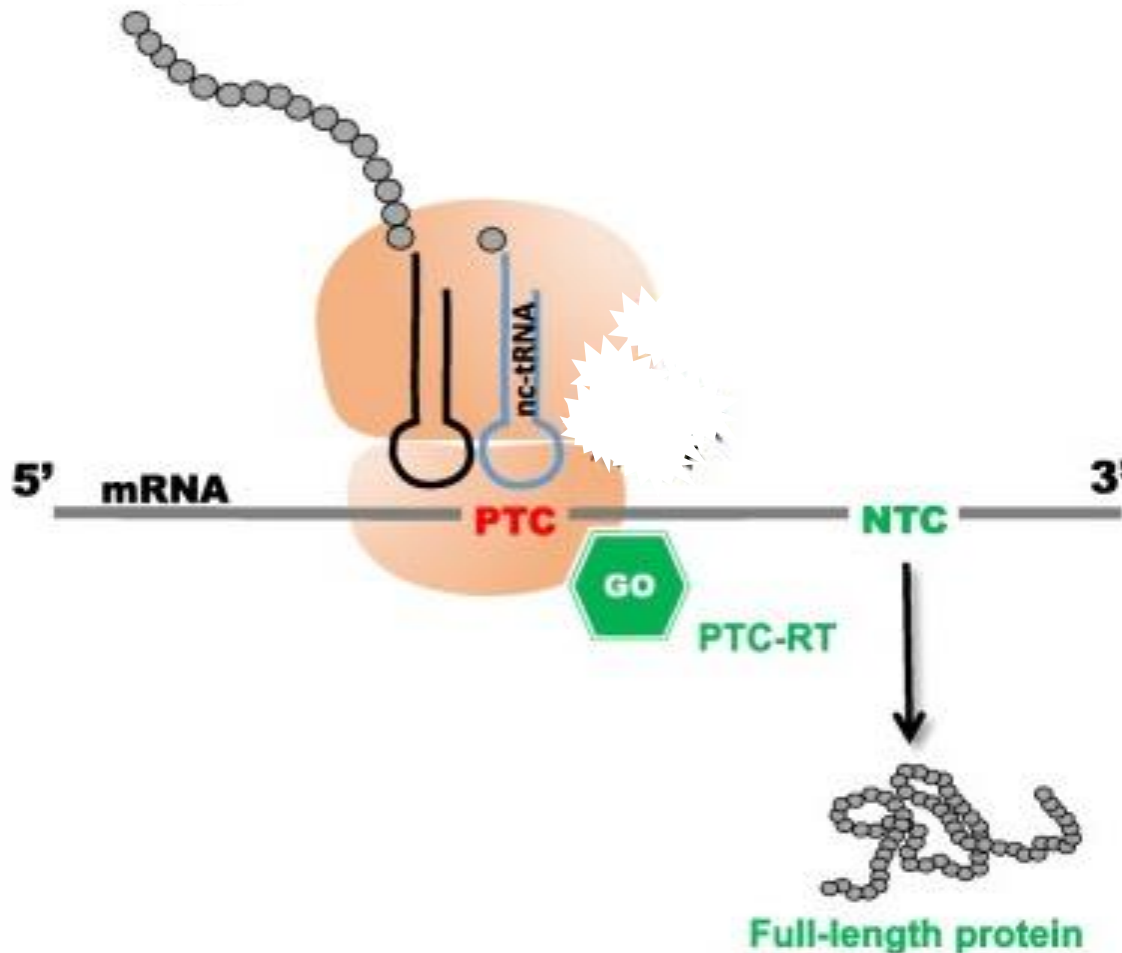


# Gli mRNA contenenti un PTC sono soggetti anche a degradazione prematura, dovuta all'azione del Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) pathway



# Suppression therapy/Readthrough

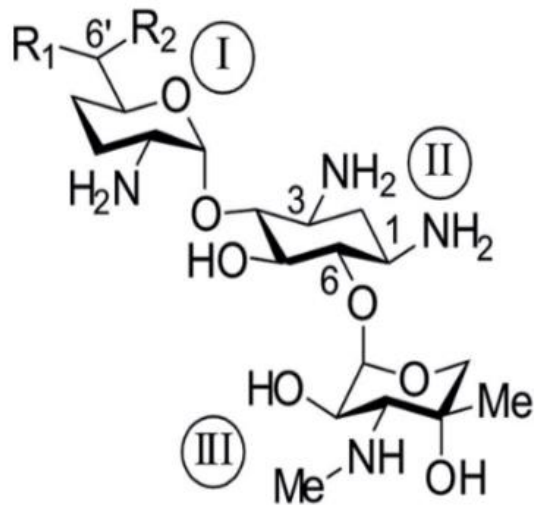
- ✓ Attuale strategia terapeutico/farmacologica per il recupero degli effetti delle mutazioni di stop.





# Translational readthrough-inducing drugs (TRIDs)

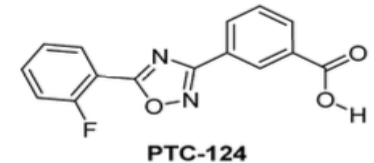
## Aminoglycosydes



|                            | $\overline{R_1}$  | $\overline{R_2}$    |
|----------------------------|-------------------|---------------------|
| Gentamicin C <sub>1</sub>  | $\overline{CH_3}$ | $\overline{NHCH_3}$ |
| Gentamicin C <sub>2</sub>  | $\overline{CH_3}$ | $\overline{NH_2}$   |
| Gentamicin C <sub>1A</sub> | $\overline{H}$    | $\overline{NH_2}$   |

Prokhorova et al., 2017

## Ataluren (PTC124;Translarna)

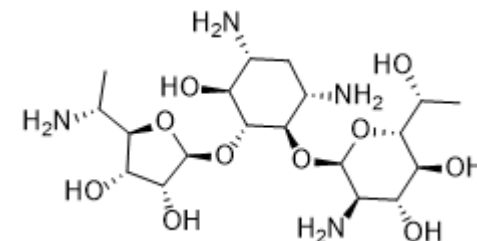


- ✓ **Phase 3 FC-Trial (no-Tobi®)**  
(ClinicalTrial.gov, NCT02456103) *in progress (suspended).*

Welch et al., 2007

- ✓ **FC-Trial Fase -2019** (ClinicalTrial.gov  
NCT02107859)  
*in progress (suspended).*

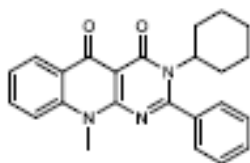
## ELX02



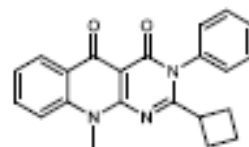
Kerem et al., 2020

# Translational readthrough -inducing drugs (TRIDs)

a. SRI-37240

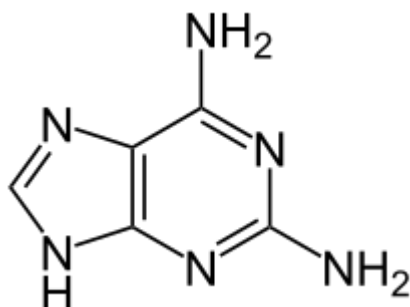


b. SRI-41315



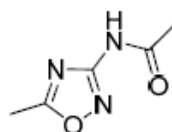
*Sharama J, Bedwell D.M., 2021*

## 2,6 Diaminopurine

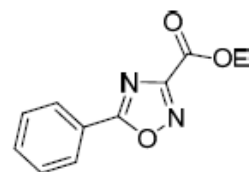


*Trzaska C., Lejeune F., 2020*

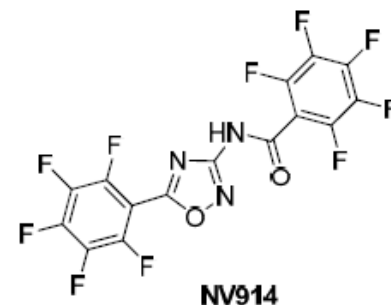
## 1,2,4 oxadiazoles



NV848



NV930



NV914

*Pibiri I., Lentini L., 2020*

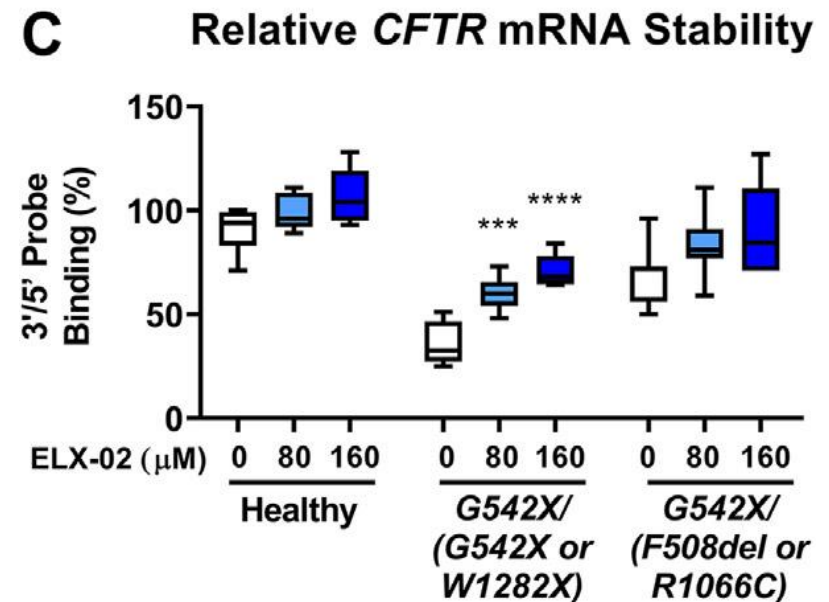
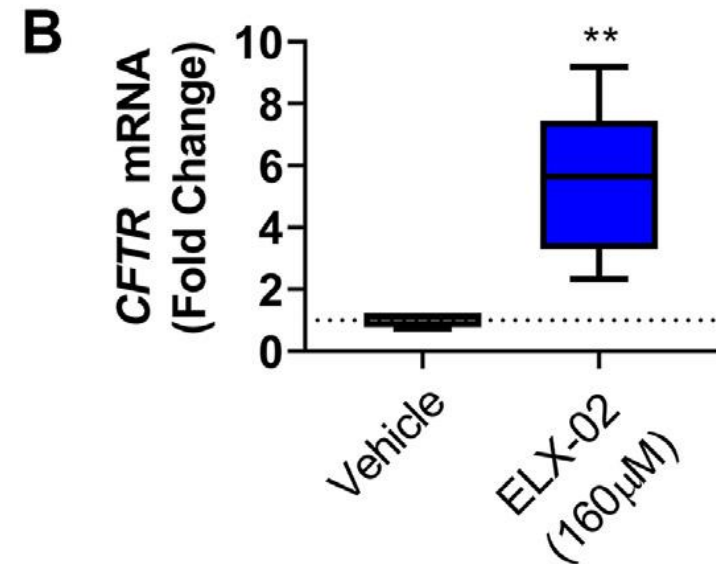
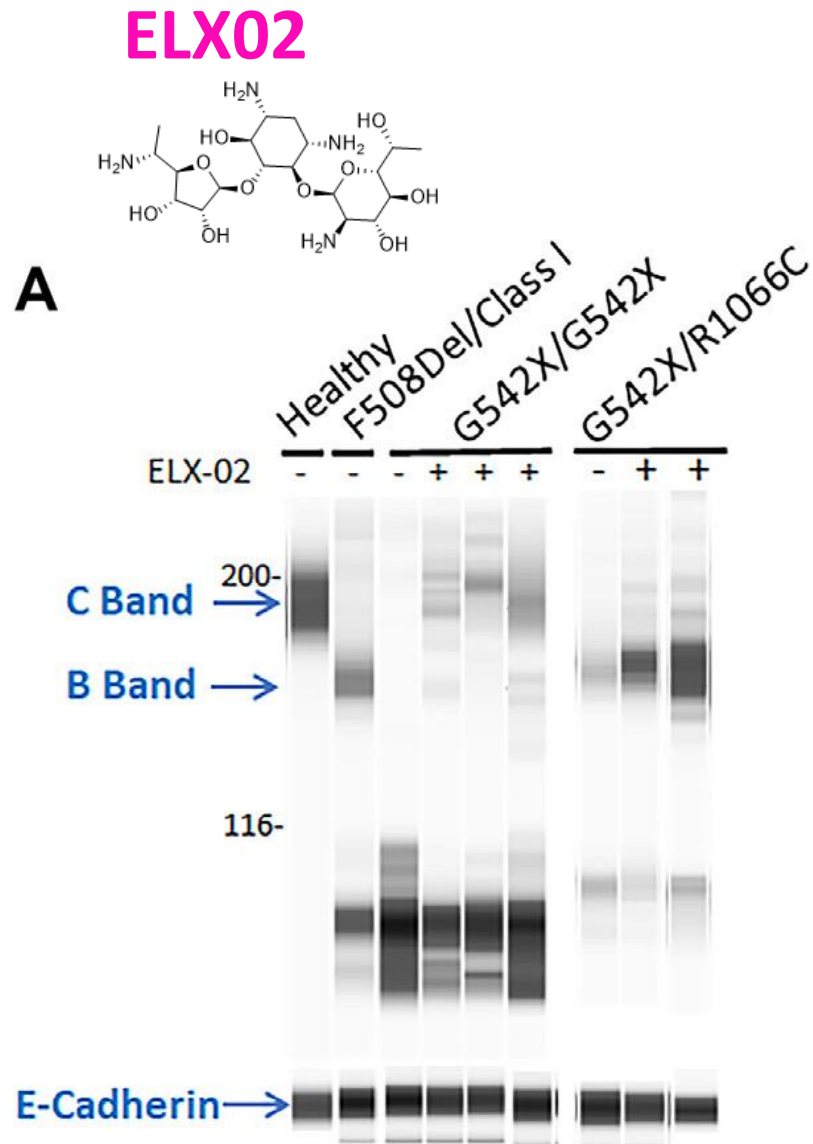


# ELX02 ripristina la funzione di CFTR<sup>G542X/G542X</sup> in organoidi derivati da pazienti (PDOs)

- ELX02 è un glicoside che mostra preferenzialmente un'interazione con il ribosoma eucariotico.
- Non ha dato evidenze di readthrough di NTCs (Native stop codons).
- Ridotto potenziale nefrotossico e ototossico.
- **Trials di fase di 2:**
  - -EL-012[NCT04135495]
  - -EL-004[NCT04126473]

Disegno dello studio molto simile: dosi crescenti per 14 giorni su 24 pazienti con almeno un allele G542X.

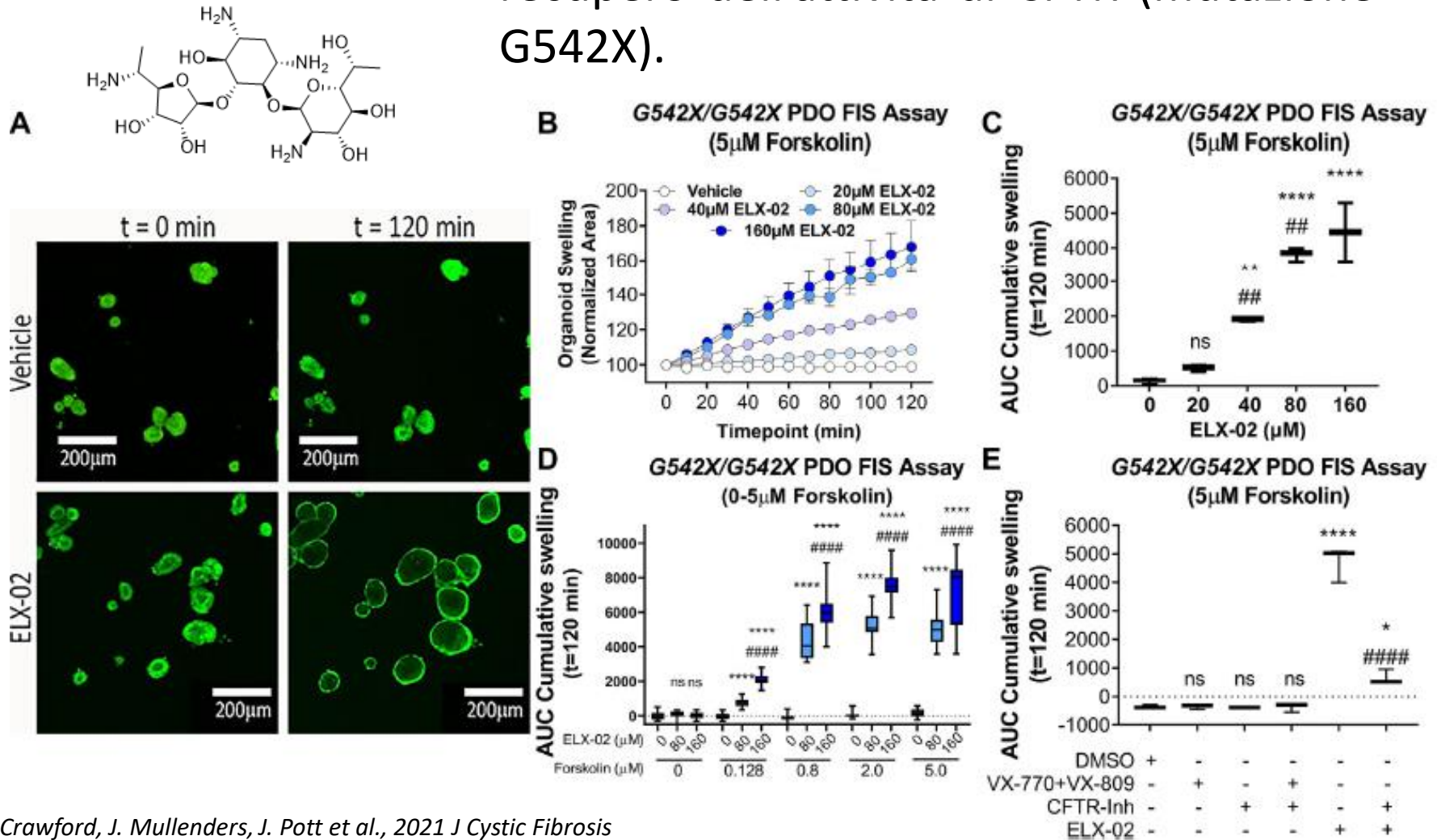
# Il trattamento di 48 ore con ELX02 determina aumento dell'espressione dell'mRNA e della proteina CFTR in PDOs



# ELX02 ripristina la funzione di CFTR<sup>G542X/G542X</sup> in organoidi derivati da pazienti (PDOs)

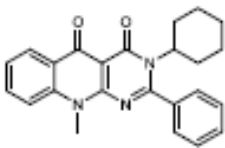
**ELX02**

➤ Studi su organoidi mostrano un buon recupero dell'attività di CFTR (mutazione G542X).

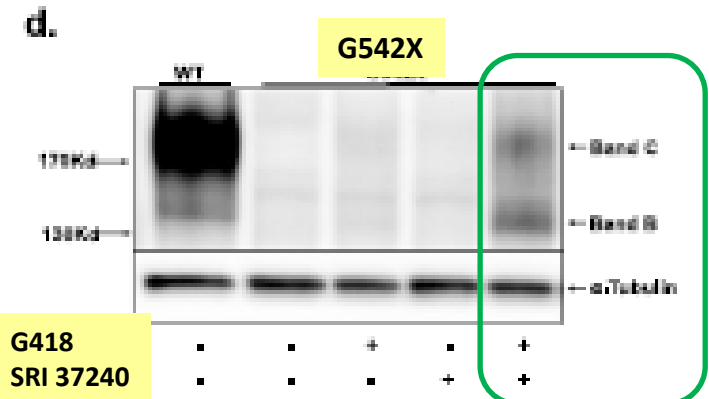
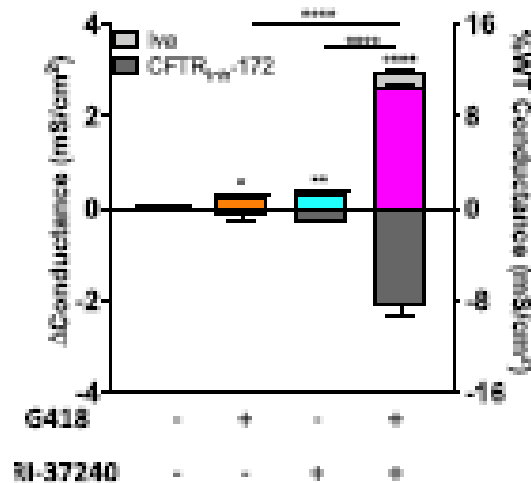
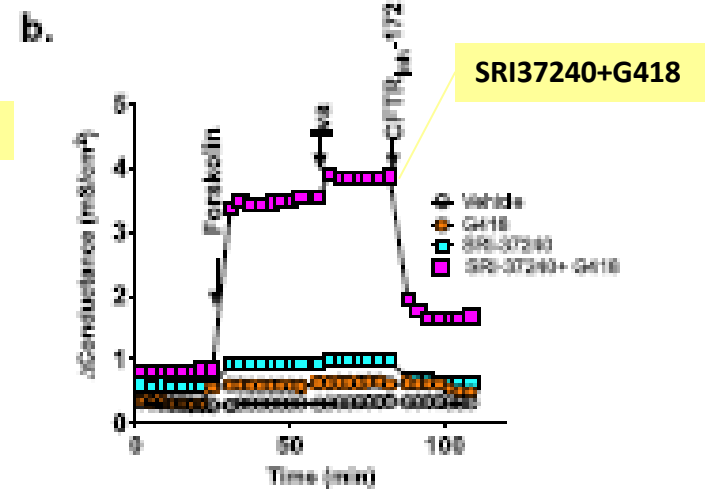
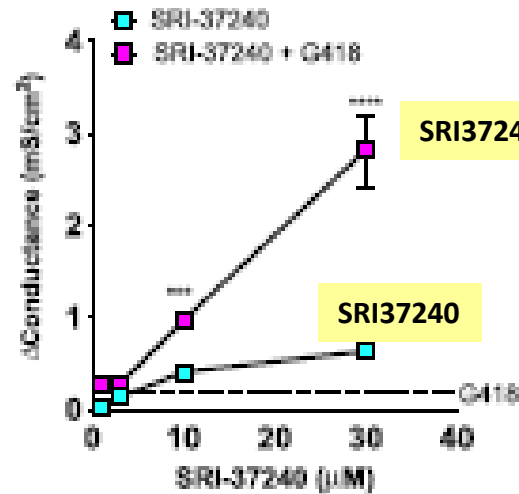
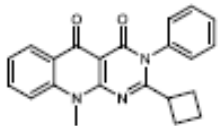


# Aumento dell'espressione e attività del canale CFTR in cellule FRT trattate con amminoglicosidi (G418) e la molecola SRI-37240

**SRI-37240**

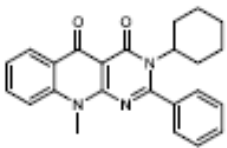


**SRI-41315**

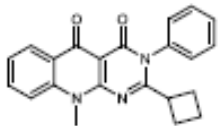


# Cellule 16HBE-CFTR<sup>G542X</sup> trattate con amminoglicosidi (G418) e la molecola SRI-41315 mostrano un aumento dell'espressione e dell'attività di CFTR

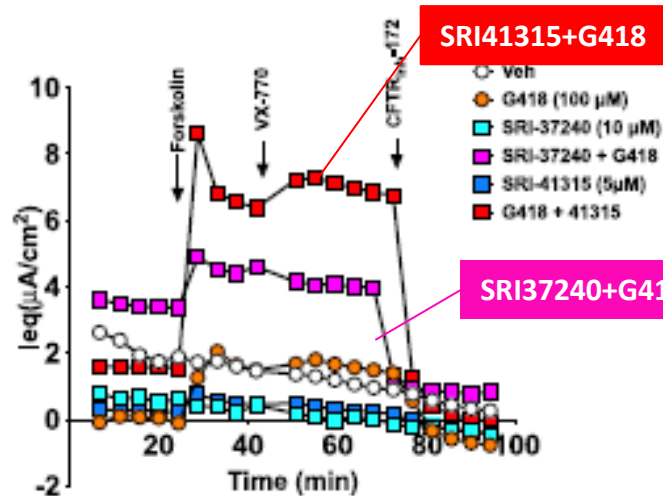
**SRI-37240**



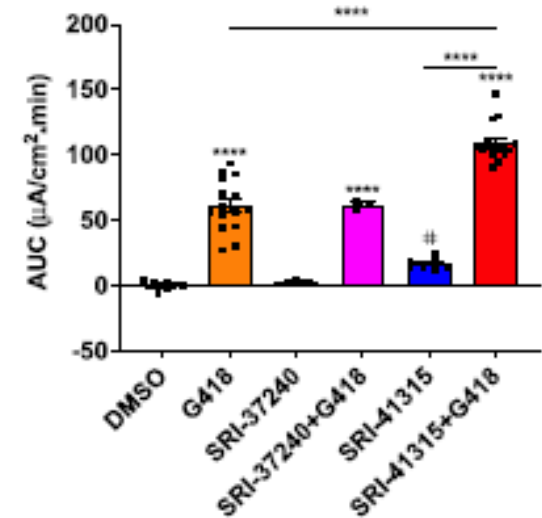
**SRI-41315**



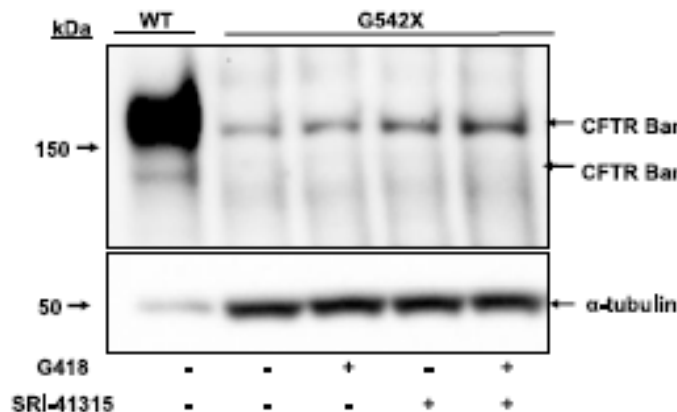
**a.**



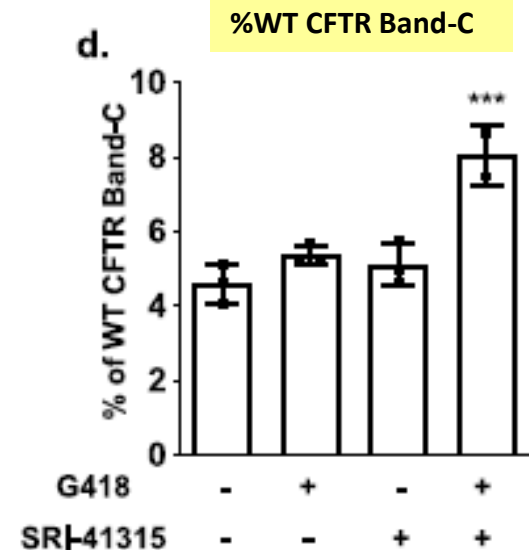
**b.**



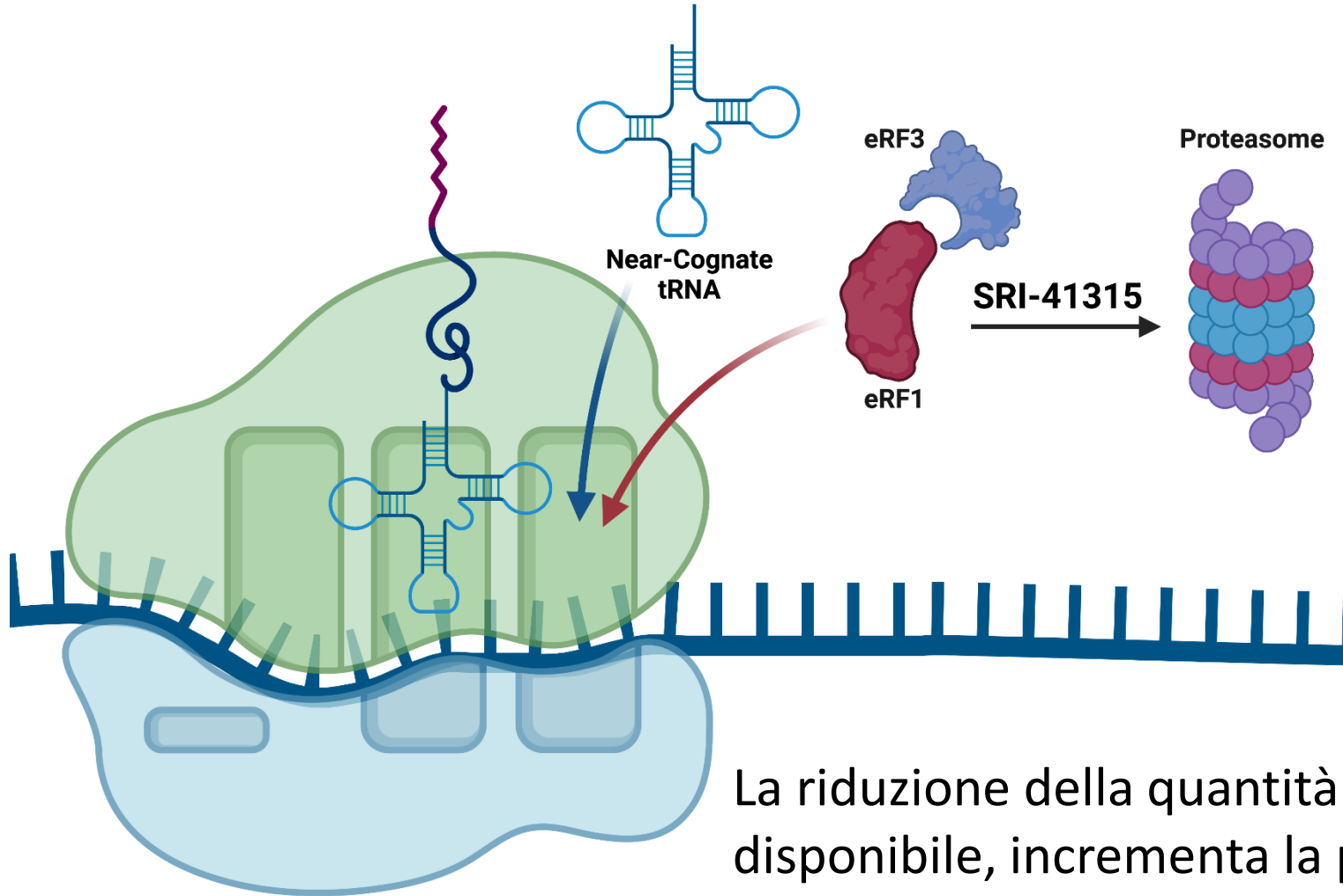
**c.**



**d.**



# SRI-41315 promuove il *readthrough* attraverso la riduzione del fattore eRF1



La riduzione della quantità di eRF1 disponibile, incrementa la possibilità da parte dei *near-cognate* tRNA di riconoscere il PTC.



# 2,6 Diaminopurina (DAP) come potente correttore di mutazioni di stop UGA

a



*Lepista inversa*

Hydroalcoholic extract H7  
87-1

Liquid/liquid partition

Cyclohexane  
87-2

Methylene chloride  
87-3

Ethyl acetate  
87-4

Butanol  
87-5

Water  
87-6

HPLC fractionation

C18 - Water/Acetonitrile (95/05 to 05/95)

F7

F8

F9

F10

F11

F12

F13

F14

F15

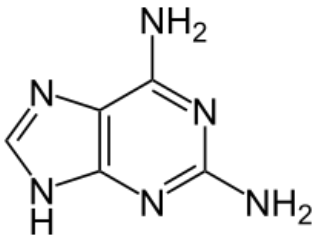
2,6 DAP

Clitocine

Clitocine

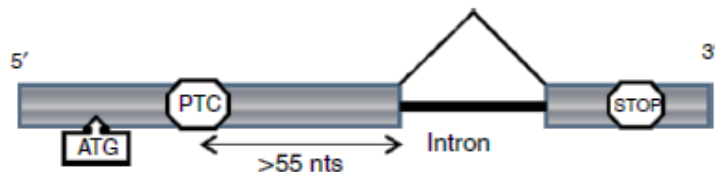
Una molecola estratta dal fungo *Lepista inversa* mostra elevata efficienza di *readthrough* sui codoni UGA prematuri.

2,6 Diaminopurine

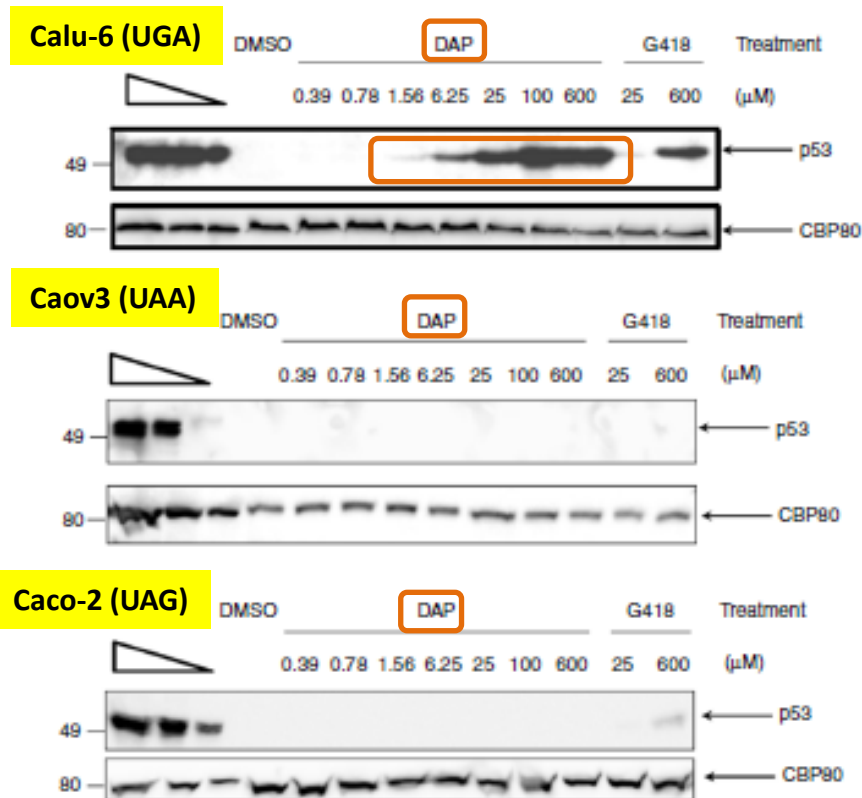


b

Fluc-int-PTC



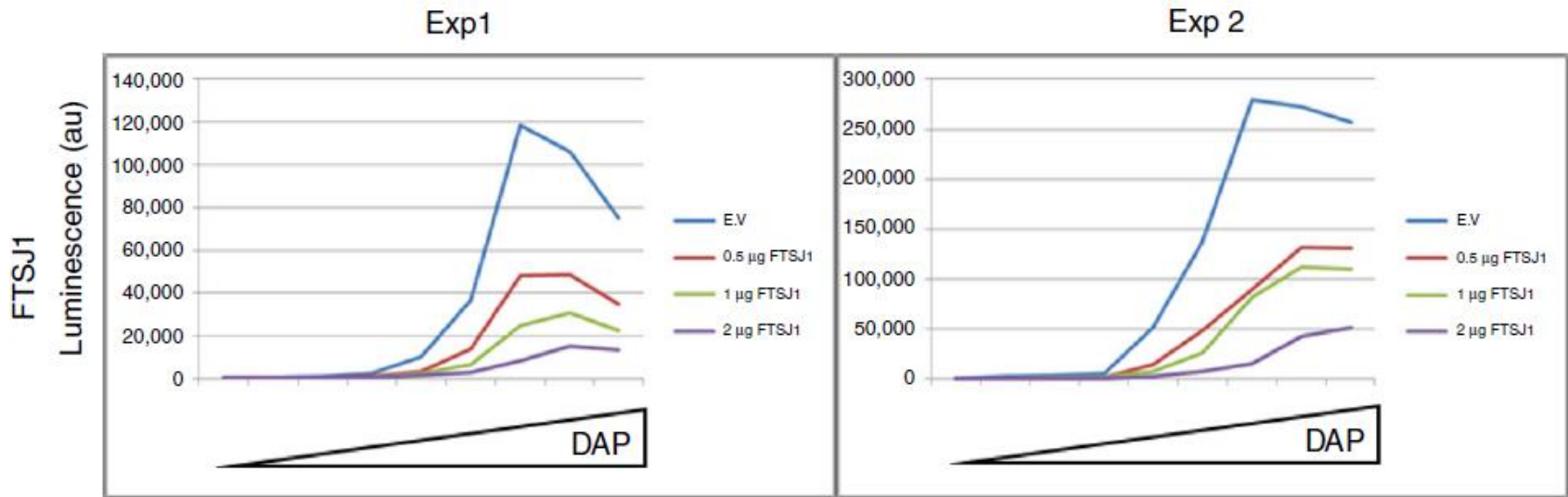
# Il trattamento con 2,6 Diaminopurina (DAP) recupera l'espressione della proteina p53 mutata in cellule Calu-6<sup>UGA</sup> *in vitro* e *in vivo*



- Non inibisce il *pathway* NMD.
- Nessuna citossicità e genotossicità osservata.
- Limitati cambiamenti di espressione nel profilo trascrittomico (3,8%).
- Nessuna evidente produzione di proteine aberranti.

# Meccanismo d'azione DAP coinvolge la metiltrasferasi FTSJ

- La **DAP** interferisce con la funzione dell'enzima FTSJ.
- **FTSJ**: metiltrasferasi per il C34 tRNA<sup>trp</sup> (UGG codon).
- Riduzione di metilazione in C34 riduce la specificità per il codone UGG.

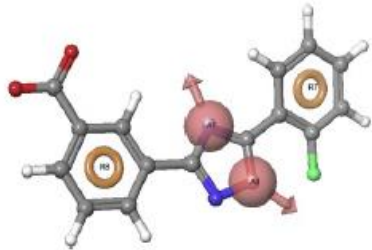


- Azione su componenti cellulari alternativa al ribosoma rende interessante questa nuova strategia.

# Ottimizzazione di 1,2,4 ossadiazoli per il recupero dell'espressione e della funzione della proteina CFTR

Sviluppo di un modello e analisi quantitativa struttura/attività (3D-QSAR)

*Piano sperimentale*

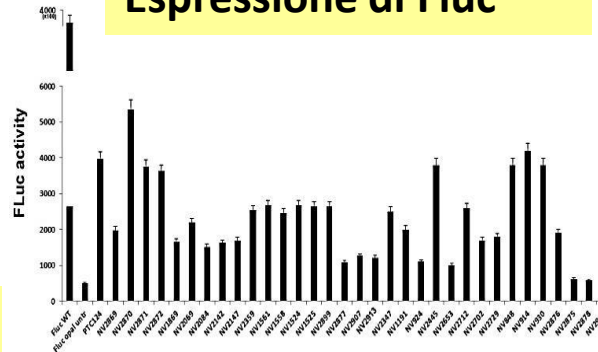


Validated Hypo.7

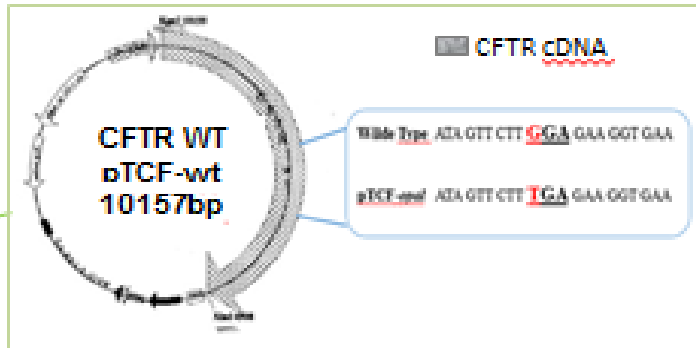
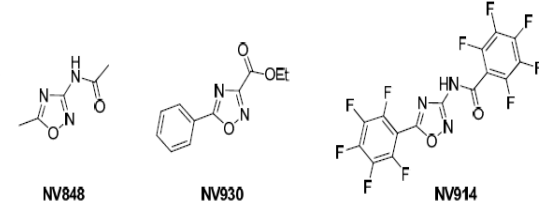


High-throughput virtual screening su librerie di molecole (pubbliche e «in house»)

Espressione di Fluc<sup>UGA</sup>

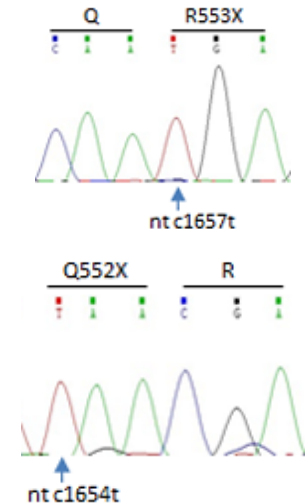


1,2,4 oxadiazoles



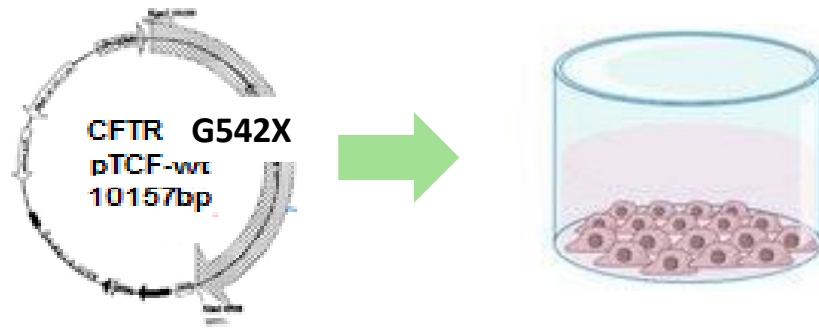
Mutagenesi sito-diretta CFTR cDNA

| CFTR mutation | PTC |
|---------------|-----|
| G542X         | UGA |
| Q552X         | UAA |
| R553X         | UGA |
| W1282X        | UGA |

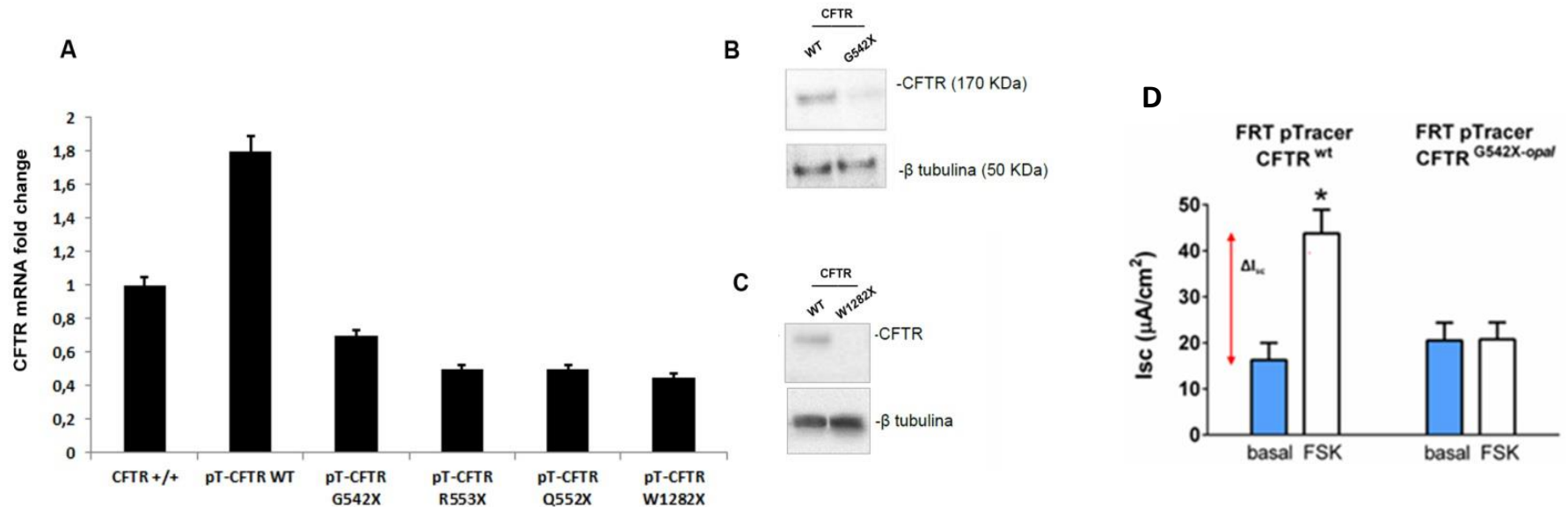


Sequenziamento

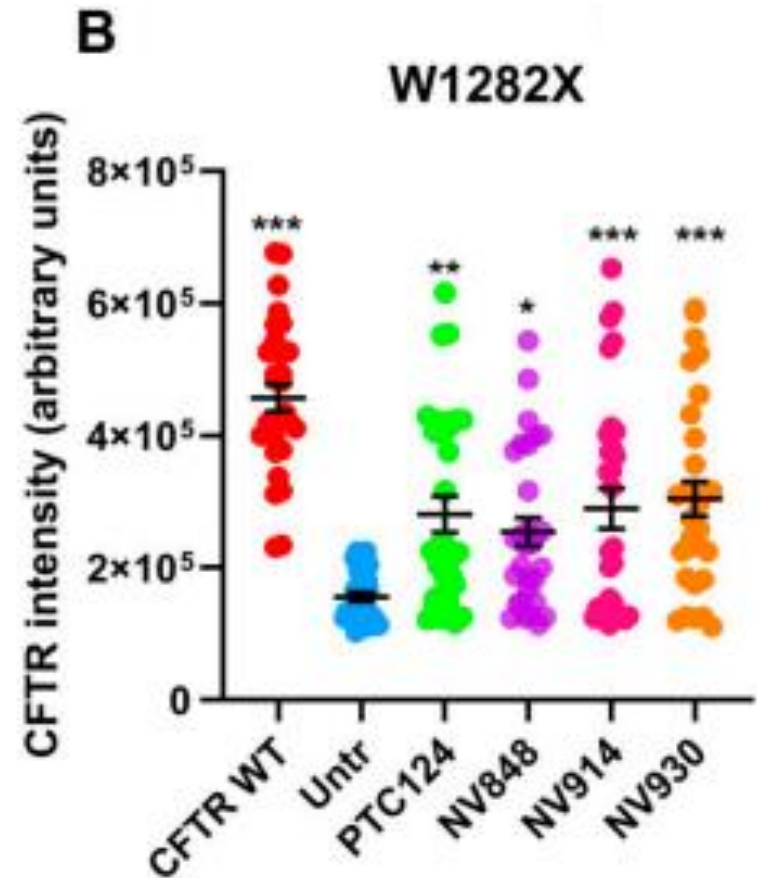
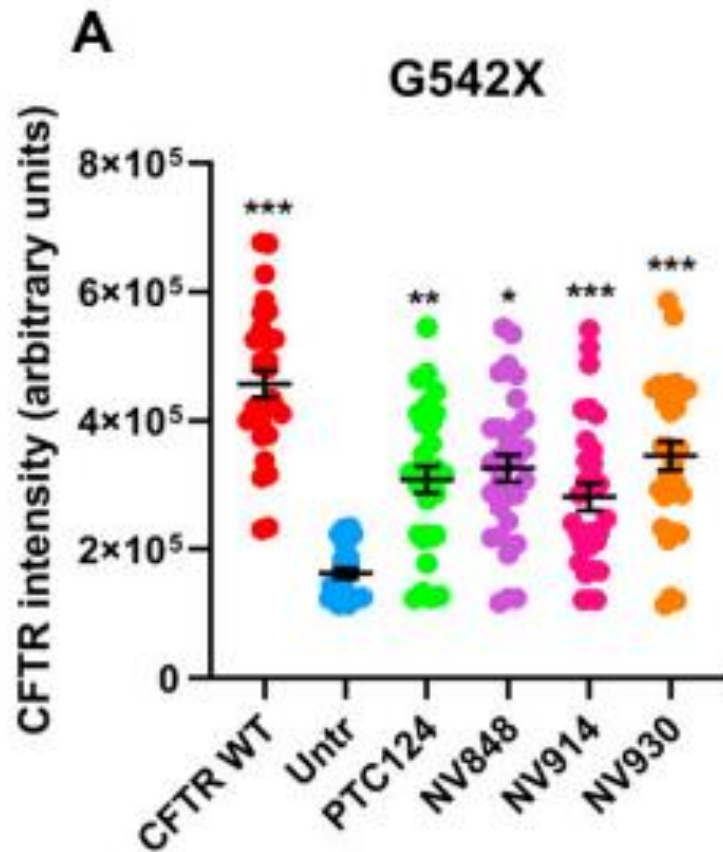
## Trasfezioni per produzione di cellule FRT stabili CFTR<sup>UGA</sup>



## Controllo dell'espressione dell'mRNA e della proteina di CFTR<sup>(WT/UGA/UAA)</sup> e relativa attività del canale in camera di Ussing

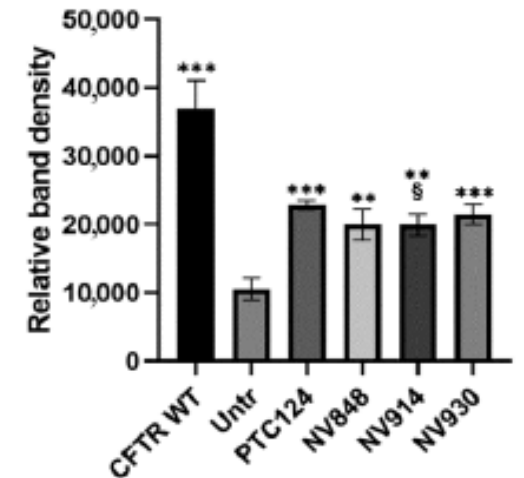
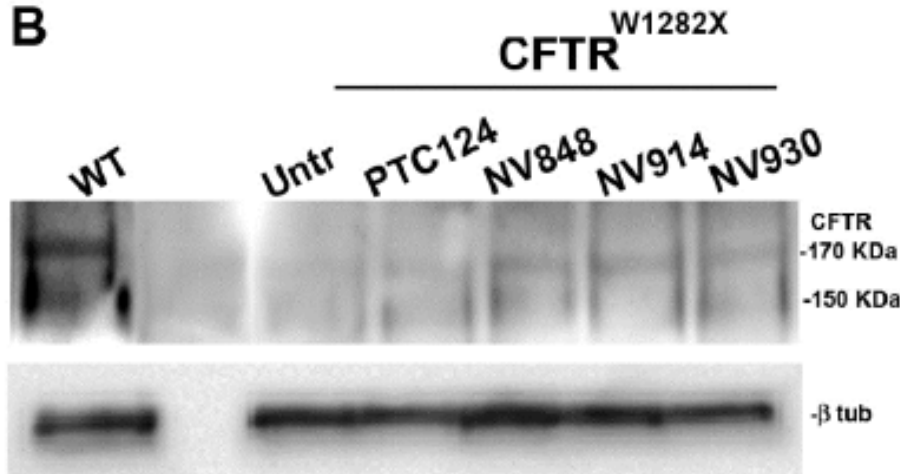
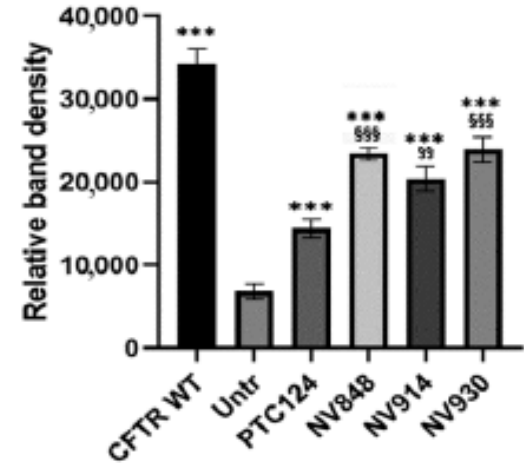
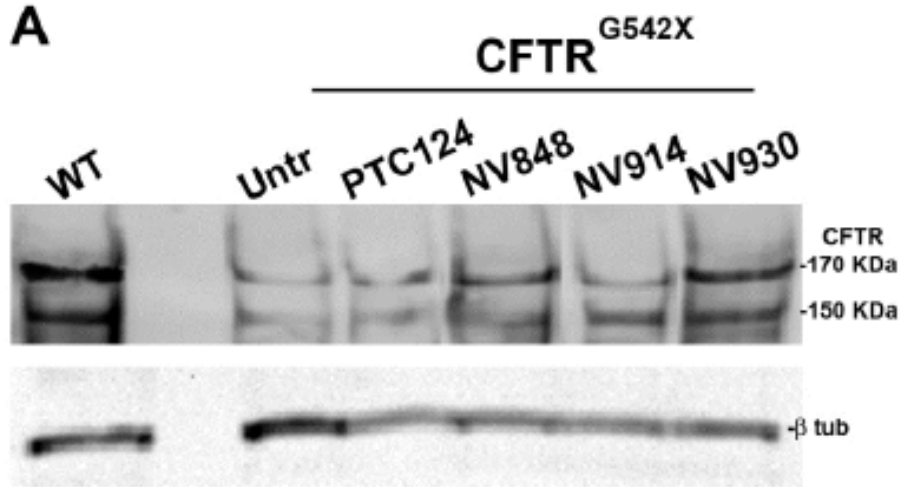


# *Trattamento con molecole NV848, NV914, NV930 e valutazione dell'espressione della proteina CFTR a 24h*

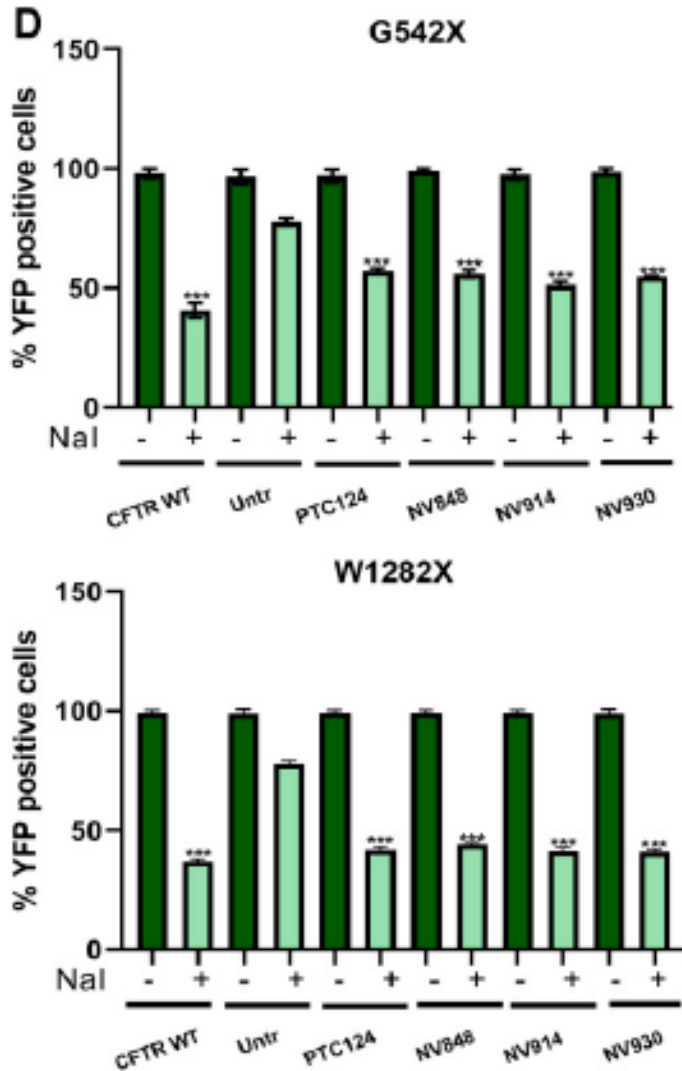




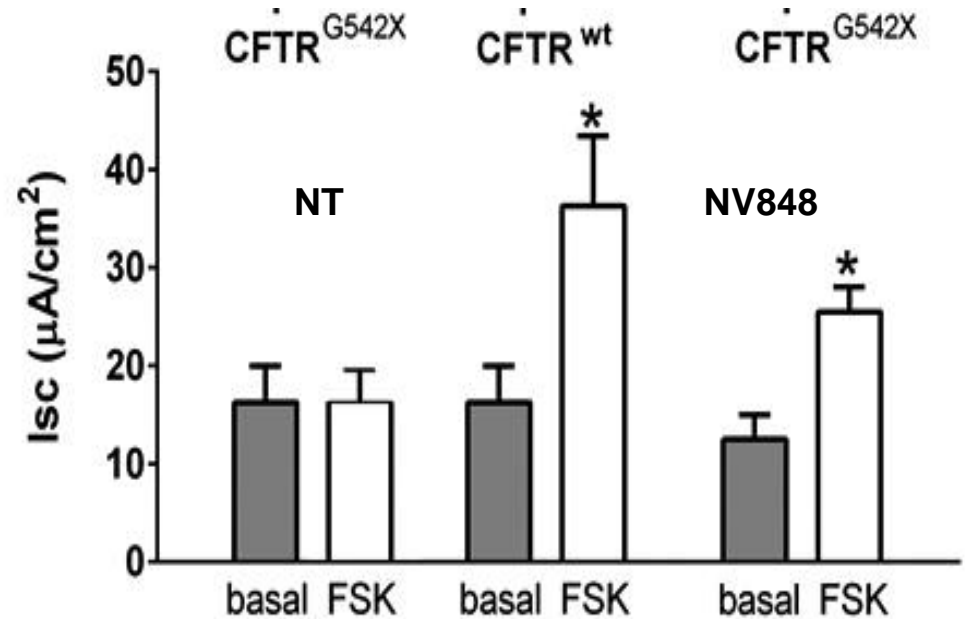
***Il trattamento a 24 e 72h con molecole NV848, NV914, NV930 e recupera l'espressione della proteina CFTR***



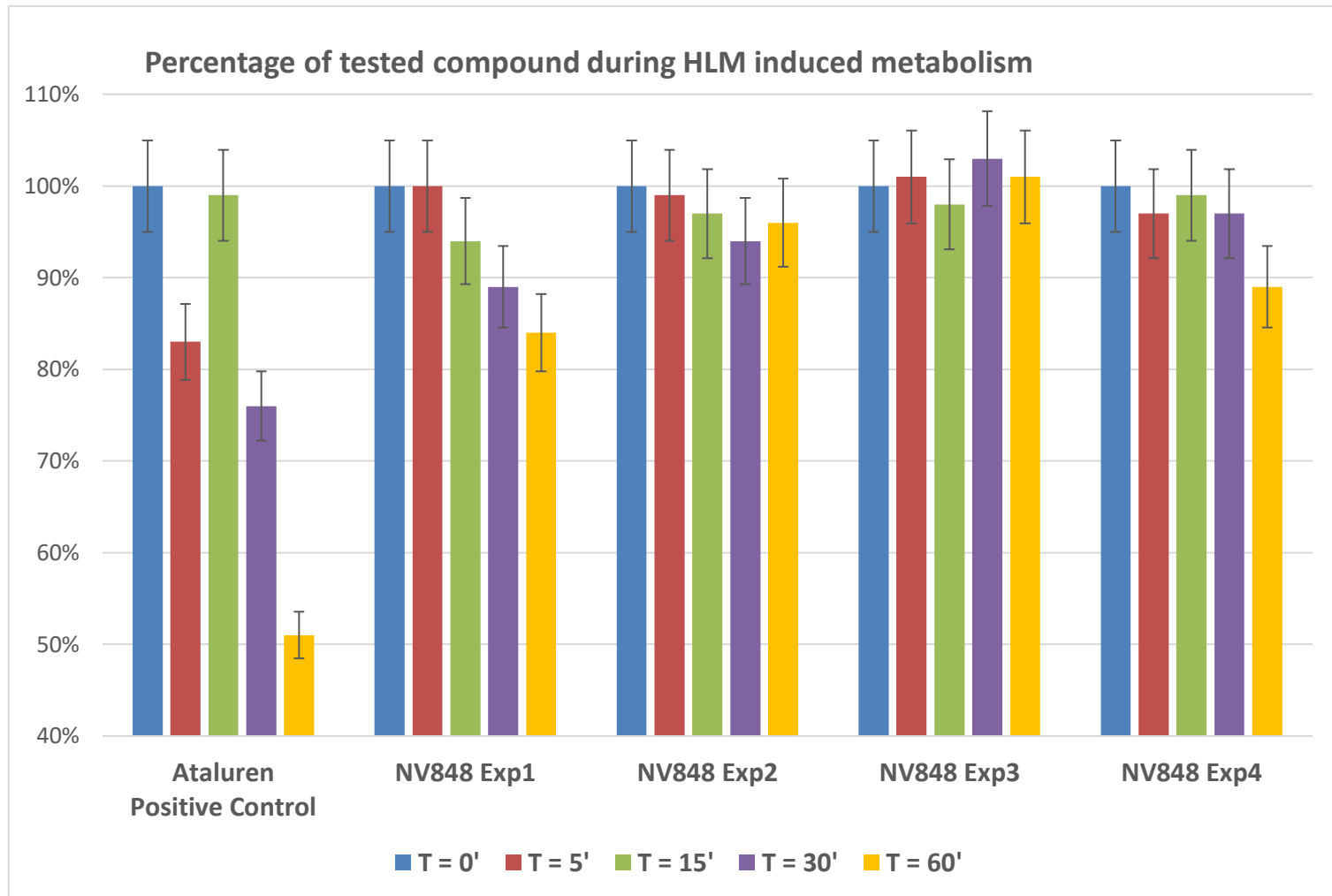
# *Il trattamento a 24 e 72h con molecole NV848, NV914, NV930 e recupera l'attività della proteina CFTR*



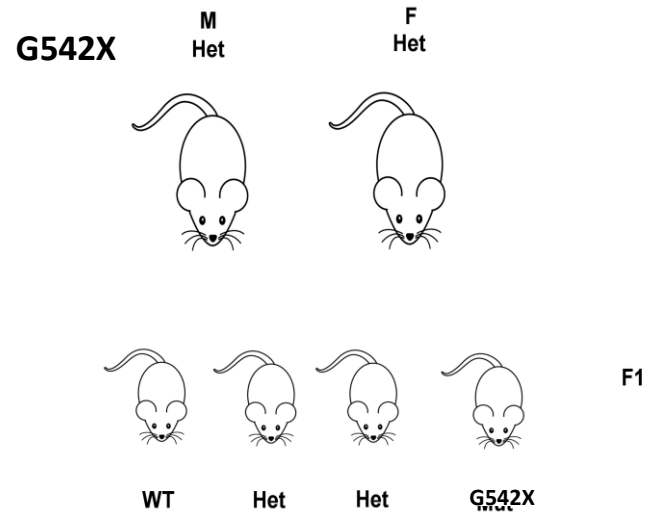
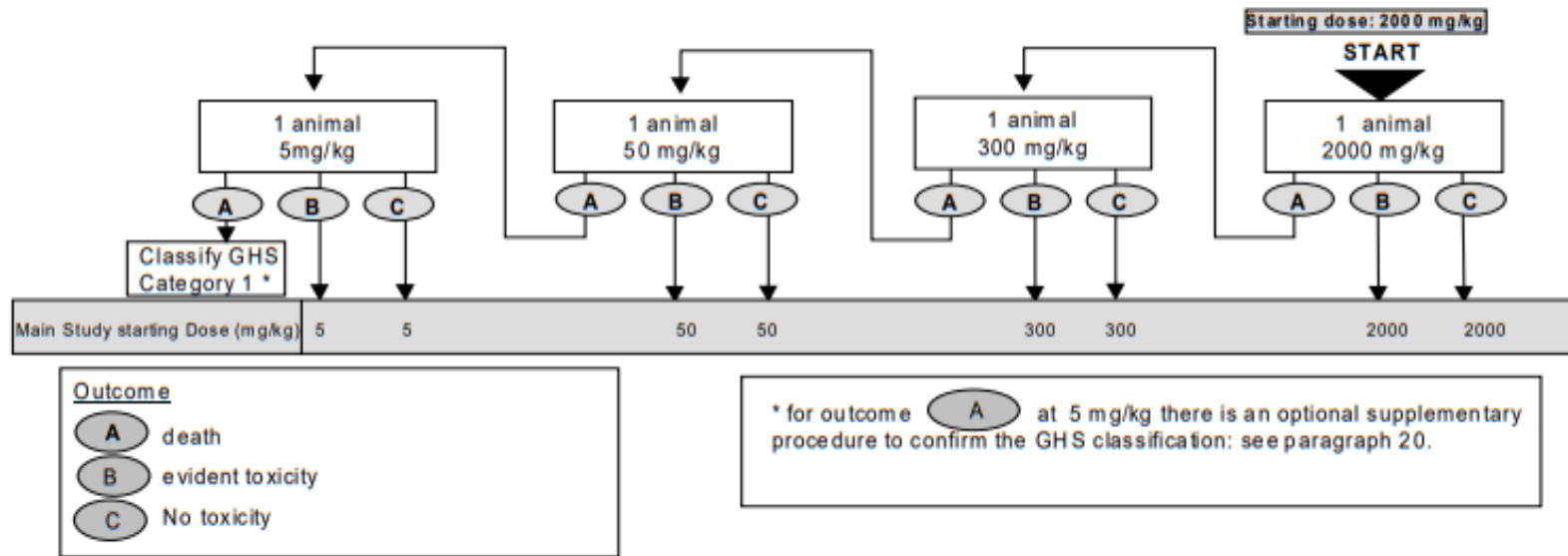
G542X FRT cells



# La molecola NV848 mostra una buona stabilità metabolica in un sistema modello di microsomi epatici umani *in vitro*



# Valutazione tossicità acuta in modello murino e biodistribuzione



## Valutazione sul modello murino G542X

# Conclusioni

- ✓ Le mutazioni di stop e di classe I rappresentano oggi la seconda importante sfida sul fronte delle mutazioni del gene CFTR in ordine di frequenza.
- ✓ Gli approcci attuali, relativi alla ricerca e sviluppo di farmaci con attività *readthrough*, sembrano essere promettenti anche se in diverse fasi del percorso di sviluppo.
- ✓ L'interesse a tale sviluppo è molto alto, le mutazioni stop infatti non interessano esclusivamente il gene CFTR.
- ✓ La possibilità che altri bersagli oltre al ribosoma possano essere utilizzati per migliorare la *performance* di *readthrough* dei PTCs apre nuovi interessanti scenari alla ricerca.





*When you arise in the morning, think what precious privilege it is to be alive: to breathe, to think, to feel joy and to love.  
(Marcus Aurelius)*

*Grazie*

**ATeN Center**  
ADVANCED TECHNOLOGIES NETWORK CENTER



## Unita' PI

Prof. Laura Lentini  
Prof. Aldo Di Leonardo  
Prof. Maria Grazia Zizzo  
Dott. Raffaella Melfi  
Dott. Federica Corrao  
Dott. Riccardo Perriera

## Unità Partner

Prof. Ivana Pibiri  
Prof. Andrea Pace  
Prof. Marco Tutone  
Dott. Ignazio Fiduccia



*fondazione per la ricerca  
sulla fibrosi cistica - onlus*  
italian cystic fibrosis research foundation

**FFC#1/2014**  
**FFC#3/2017**  
**FFC#6/2020**