



Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus  
*italian cystic fibrosis research foundation*

# **XVII SEMINARIO DI PRIMAVERA**

**Progressi recenti  
e sviluppi futuri  
della ricerca  
in fibrosi cistica**

- Riflessioni sulla ricerca FC
- L'era dei modulatori di CFTR
- Malattia che cambia: Ricerca FFC

Bussolengo (Verona), 25 Maggio 2019

In collaborazione con



Azienda Ospedaliera  
Universitaria Integrata  
Verona



*In copertina:*  
*Illustrazione di Saba Ferrari*  
*"La ricerca fiorisce",*  
*acquerello su cartoncino, 2019*

---

*Redazione: Gianni Mastella, Graziella Borgo, Tecla Zarantonello, Flavinia Malvezzi*  
*Grafica e impaginazione: Federica Negroni*  
*Stampa: maggio 2019, Tipolitografia Artigiana snc - San Giovanni Lupatoto(VR)*



**Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus**  
*italian cystic fibrosis research foundation*

# **XVII SEMINARIO DI PRIMAVERA**

## **Progressi recenti e sviluppi futuri della ricerca in fibrosi cistica**

**Riflessioni sulla ricerca FC**

•

**L'era dei modulatori di CFTR**

•

**Malattia che cambia: ricerca FFC**

Hotel Tower, via Mantegna 30/S, Bussolengo (Verona Nord)  
Verona, 25 maggio 2019



## Sommario

---

<b>Introduzione al Seminario: riflettere sulla ricerca in fibrosi cistica</b>	Pag. 3
<i>Gianni Mastella (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)</i>	
<b>La scoperta dei modulatori di CFTR</b>	Pag. 9
Il percorso di ricerca: dalle diverse mutazioni ai diversi difetti della proteina CFTR e ai diversi farmaci	
<i>Nicoletta Pedemonte (Laboratorio di Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova)</i>	
<b>2011-2019: i modulatori di CFTR negli studi clinici e nella vita reale</b>	Pag. 17
<i>Cesare Braggion (Direttore di "Orizzonti FC", già direttore del Centro Fibrosi Cistica di Firenze)</i>	
<b>La fibrosi cistica che cambia: il contributo della ricerca FFC</b>	Pag. 25
<i>Graziella Borgo (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)</i>	
<b>Appendice</b>	
<b>Dati essenziali attività di ricerca FFC 2002 - 2018</b>	Pag. 34



## Introduzione al Seminario

# Riflettere sulla ricerca in fibrosi cistica

**Gianni Mastella**

*Direttore Scientifico Fondazione Ricerca FC*

Questa Fondazione è nata 22 anni fa con lo scopo di mettere insieme le risorse e le competenze scientifiche italiane per contribuire attivamente a rispondere ai tanti quesiti aperti che la lotta alla fibrosi cistica tuttora presenta. Questo "Seminario di Primavera", il 17° dal 2003, vuole essere nuova occasione per riflettere sul significato della ricerca scientifica, sostenuta da una sempre più larga comunità di cittadini, che alla ricerca affida la speranza di un futuro di maggior salute per tante persone. Vedremo in sintesi quali passi la comunità scientifica internazionale ha fatto e sta facendo nella direzione più ambita, quella di colpire la malattia alla sua radice, il gene e la proteina difettosa che ne sono la causa. Ma vedremo anche gli sforzi di ricerca che tuttora si compiono per potenziare e ottimizzare le cure dei sintomi e delle complicanze che la malattia ancora comporta. E vedremo come e con quali risultati la Fondazione si è inserita in questa duplice competizione.

### Una premessa: il significato della ricerca FC

Ritengo che, al fine di nutrire nei confronti della ricerca realistiche aspettative, si debba considerare quali sono i punti che ne caratterizzano il percorso, ben presenti nelle strategie perseguite da un'organizzazione di ricerca, come la nostra, che ha come obiettivo finale quello di contribuire a migliorare le cure per le persone con FC.

- Non c'è obiettivo di cura che non debba passare attraverso lo sviluppo rigoroso di conoscenze sui meccanismi che portano alla malattia e alle sue complicanze, la mantengono e la aggravano. Questa è la funzione della cosiddetta "ricerca di base", che rappresenta la massima parte degli investimenti nella scienza biomedica, indispensabili per approdare alle possibili applicazioni cliniche. In qualche sito web ho visto scritto, a commento di studi clinici con esiti incoraggianti, "Questa è la ricerca che ci piace". Inevitabile chiederci se questo sentimento abbia tenuto in debita considerazione il lungo lavoro di "base", tra successi e insuccessi, compiuto da molti ricercatori e molti studi, per giungere a quel risultato clinicamente utile.

- A quel risultato utile si arriva prima o poi, quando ci si arriva, con contributi fatti in genere di piccoli tasselli di nuove conoscenze (difficili da recepire con "piacere" nell'immediato), nessuno da solo risolutivo, ma tutti insieme, quelli positivi e quelli negativi o incerti, concorrenti al mosaico finale, che chiamiamo "scoperta", ma che è in realtà la confluenza organica di conoscenze che ne hanno tracciato il percorso. Pensiamo, ad esempio, ai primi farmaci modulatori della proteina CFTR, che un'azienda farmaceutica è riuscita recentemente a portare sul mercato: è stato il risultato di studi sviluppati per parecchi anni da molti uomini e donne di scienza, tra i primi alcuni ricercatori italiani: studi abilmente e genialmente utilizzati da una realtà industriale che poteva disporre di adeguate risorse.

- La ricerca è in genere molto costosa ed anche per questo richiede una oculata valutazione preliminare della validità dei progetti su cui investire risorse umane e tecniche. Questo dovrebbe valere per la ricerca sostenuta con risorse pubbliche, ma ancor più per quella sostenuta quasi solo con risorse private, come è il caso della ricerca per “malattie orfane”, tra cui la fibrosi cistica, cui lo Stato non riesce a fornire ragionevole supporto. Su questo, la nostra Fondazione è particolarmente impegnata, a garanzia della fiducia che ci accordano i donatori, legata alla qualità delle scelte di progetto. Questo significa attivare meccanismi complessi di analisi delle proposte di ricerca, mettendo insieme il lavoro del comitato scientifico della Fondazione con quello dei numerosi esperti scelti in giro per il mondo, sulla base di loro specifiche e validate competenze.
- La ricerca è prezioso patrimonio comune dell’umanità e il suo modo di svolgersi e i suoi risultati non dovrebbero essere considerati solo il possesso e il privilegio di élite. Gli uomini di scienza hanno pertanto il dovere di diffondere nella comunità la conoscenza dei percorsi e dei risultati della loro attività. Le organizzazioni di ricerca hanno l’imperativo di far conoscere ai più luci ed ombre del loro impegno. È questa una attenzione principale, la “divulgazione scientifica”, che la nostra Fondazione dedica nella sua attività, tanto più nei confronti di chi la sostiene e delle persone che con la malattia debbono fare ogni giorno i conti.

### **Ricerca per ottimizzare le cure di sintomi e complicanze**

Fin dagli inizi della lotta alla fibrosi cistica la ricerca, da un lato, ha cercato di capire e di colpire la causa della malattia, dall’altro, ha lavorato per mettere a punto sistemi di cura per contenerne i sintomi e rallentarne la progressione: un terreno questo su cui le persone malate dovranno ancora cimentarsi. Un terreno di ricerca, che ha occupato e ancora occupa la maggior parte degli studi e che ha puntato prevalentemente, da un lato, sul compenso dei disturbi digestivi e nutrizionali e, dall’altro, sulla cura dei disturbi respiratori, determinanti questi nell’evoluzione della malattia. Enzimi pancreatici sempre più raffinati e strategie nutrizionali, atte ad assicurare equilibri metabolici, regolarità di crescita e supporto ai sistemi di difesa contro l’infezione, hanno avuto un sostanziale successo.

L’ambito più complesso e cruciale ha riguardato però la malattia broncopolmonare. Qui la ricerca ha dovuto cimentarsi con alcuni problemi fondamentali: la disostruzione delle vie aeree da secrezioni ingombranti e facilitanti l’infezione; il trattamento dell’infezione polmonare e la conseguente infiammazione, con progressivo deterioramento polmonare fino all’insufficienza respiratoria; le cure dell’insufficienza respiratoria fino al trapianto polmonare. Su questo fronte i problemi aperti e non risolti sono ancora molti e la ricerca, inclusa quella sostenuta da FFC, è assai attiva.

Domina l’interesse sulla conoscenza dei meccanismi patogeni dei batteri e soprattutto di batteri emergenti e della loro crescente resistenza agli antibiotici. Vi è una significativa gara, purtroppo con ridotto investimento da parte dell’industria farmaceutica, in altre direzioni orientata, per individuare nuovi farmaci antibatterici, di cui si vanno comunque definendo meccanismi d’azione prima sconosciuti. Si studiano nuove modalità di somministrazione, anche per via inalatoria.

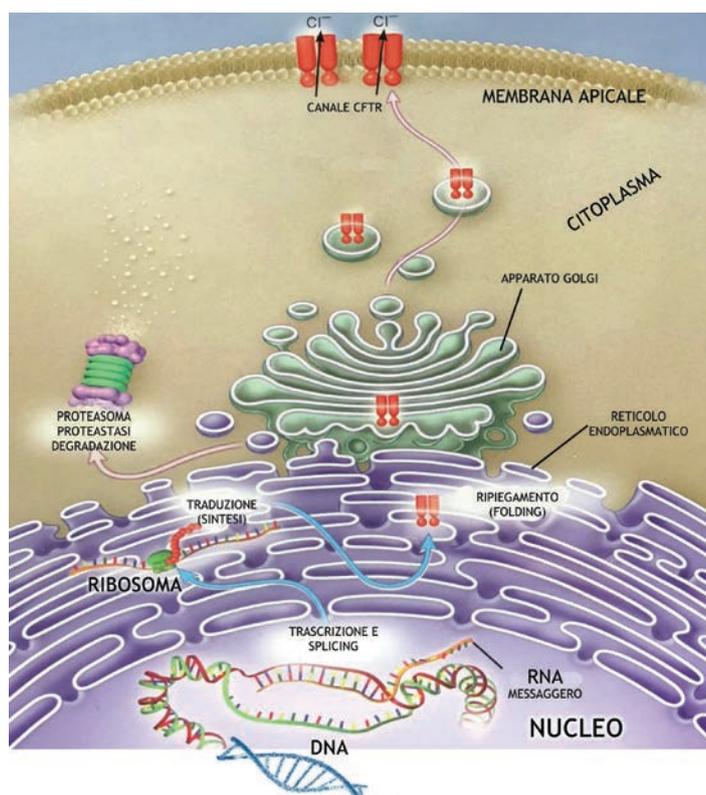
Ancora molto ricca e produttiva è la ricerca sui meccanismi dell’infiammazione polmonare e su farmaci e strategie per contrastarne l’evoluzione devastante, anche se finora le applicazioni clinicamente significative sono piuttosto carenti.

L’insufficienza respiratoria ha avuto una crescente attenzione negli ultimi anni, con la messa a punto di innovative strategie di ventilazione, che sono andate di pari passo con il perfezionamento degli interventi relativi al trapianto polmonare. Su questo, sta crescendo l’ottimizzazione nel reclutamento e trattamento degli organi da donatori e il perfezionamento di strategie per il loro mantenimento e funzionamento nei riceventi.

## Ricerca per terapie causali

### Le basi cellulari e molecolari del difetto di CFTR

Per descrivere sinteticamente il panorama su cui spazia la ricerca rivolta a colpire il difetto che sta alla base della malattia, bisogna rifarci schematicamente a ciò che avviene nella cellula, bersaglio di possibili trattamenti, di cui la **figura 1** riporta le infrastrutture fondamentali in cui si svolgono le funzioni di sintesi e maturazione della proteina CFTR, dal nucleo verso la membrana apicale della cellula, a partire dal DNA che la codifica e dal suo messaggero mRNA che ne recepisce il codice per la sintesi della proteina.



**Fig. 1. Rappresenta le infrastrutture cellulari che, dal nucleo (in basso) alla membrana apicale (in alto), sono sede dei processi che determinano la sintesi della proteina CFTR e la sua progressiva maturazione e viaggio verso la sua sede di azione**

(Tratto da: 2010 Vertex Pharmaceuticals Inc. - *The Basics of Cystic Fibrosis: Understanding Symptoms and Causes*. Modif.)

Tutto parte dal DNA del gene CFTR (situato nel nucleo della cellula, nel cromosoma n. 7), fatto di "esoni" (parti codificanti per la proteina CFTR) e "introni". Questo DNA, per mandare il messaggio per la sintesi della proteina si serve di una copia di sé stesso che è l'RNA messaggero (mRNA), nel quale devono rimanere solo gli esoni ed essere eliminati gli introni: il processo è detto di "trascrizione" e *splicing*. A livello di "ribosoma" (nel citoplasma) mRNA guida il reclutamento di aminoacidi per la sintesi della proteina CFTR (si parla di "traduzione", che è la sintesi della proteina, secondo il codice DNA > mRNA), destinata a maturare e a migrare ben conformata sulla membrana apicale della cellula (soprattutto quella epiteliale), dove assume la funzione di "canale" o "cancello". Questo canale assicura il corretto trasporto di cloruro e bicarbonato dal suo interno all'esterno, dove questi elettroliti (anioni, cioè con carica elettrica negativa) contribuiscono a rendere efficienti le secrezioni degli organi interessati, cioè giustamente idratate e sufficientemente scorrevoli. Il gene CFTR mutato, come nella FC, crea, a seconda del tipo di mutazione interessata, un più o meno grave scompiglio nel destino della proteina.

### Nascita e viaggio di maturazione della proteina CFTR

Di seguito, una sintesi dei concetti essenziali che saranno sviluppati nei report del seminario.

Nella prima fase, la proteina sintetizzata è informe e deve seguire un lungo viaggio (*trafficking*), prima di arrivare sulla membrana apicale, nel quale la catena di aminoacidi si ripiega e prende forma adeguata (*folding*), per diventare il canale di flusso degli "anioni", con tutti i pezzi (chiamati "domini") per la regolazione della sua funzione e per i rapporti

di collaborazione con altre proteine della cellula. In questa fase si possono avere le prime aberrazioni determinate da alcuni tipi di mutazioni:

- Può non funzionare correttamente il meccanismo di "giuntura" (*splicing*), nel RNA messaggero, delle parti codificanti del gene, a causa di mutazioni (dette appunto di *splicing*): se lo *splicing* è alterato, tutte o in parte (con variabilità a seconda della mutazione in causa) le unità di proteina possono mancare di pezzi essenziali. Quando l'anomalia di *splicing* risparmia una discreta quota di proteina CFTR (sono in causa mutazioni con *funzione CFTR residua*), si può produrre una certa quantità di CFTR normale, che consente di mitigare in parte gli effetti della malattia indotta da quella mutazione.
- Particolari mutazioni (rare mutazioni *frameshift* oppure altre, dette di "*riarrangiamento*") possono determinare un sovvertimento più o meno importante nella struttura complessiva della proteina.
- Vi sono poi mutazioni che determinano l'interruzione della sintesi della proteina (mutazioni *stop* o *nonsense*) in quanto mRNA riceve dal DNA genico un piccolo frammento, detto codone di stop, inserito abnormemente, che ha la funzione di interrompere la sintesi proteica: la sintesi si ferma in un punto preciso della catena di aminoacidi, portando ad una proteina monca.
- Queste anomalie vengono di regola riconosciute precocemente dal sistema di controllo della cellula ("*proteasoma*", situato nel citoplasma) con demolizione delle molecole proteiche anomale.

La seconda fase del processo riguarda quanto avviene nel percorso di viaggio e maturazione della proteina non precocemente demolita. Qui, anche una piccolissima anomalia, come la mancanza di un solo aminoacido su 1480 (tipico il caso della proteina F508del-CFTR, la più diffusa), mette in moto il riconoscimento dell'anomalia e la sua quasi completa demolizione da parte del sistema di controllo cellulare (la funzione molecolare chiamata "*proteostasi*", legata al "*proteasoma*"), impedendo così la maturazione e l'arrivo della molecola anomala sulla membrana.

Nella terza fase, abbiamo a che fare con molecole CFTR codificate da mutazioni (dette di *gating*, con riferimento alla funzione di "*gate/cancello*" che regola apertura/chiusura del canale CFTR), che hanno consentito la maturazione e la migrazione di CFTR alla membrana apicale ma che ne hanno determinato lo scambio o la sostituzione di un solo aminoacido, un'anomalia che impedisce al motore regolatore della proteina di tenere abbastanza a lungo aperta la sua struttura/funzione di canale. Analoghe mutazioni rendono il canale poco permeabile al passaggio di cloro e bicarbonato (canale troppo stretto). In quest'ultimo caso l'effetto sulla malattia è mitigato (sono tra le mutazioni con *funzione CFTR residua*).

Il panorama di ricerca verso terapie del difetto di base si può suddividere in tre direzioni:

1. Terapie rivolte direttamente o indirettamente alla proteina CFTR mutata nelle sue varie fasi di "biogenesi": recupero/correzione, potenziamento.
2. Terapie che agiscono con funzioni di compenso su canali diversi da CFTR
3. Terapie che agiscono direttamente su gene CFTR o suo derivato mRNA

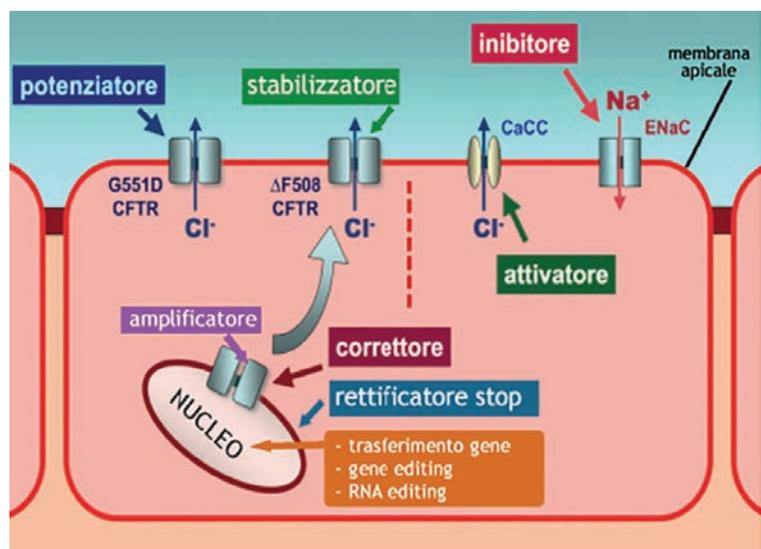
## 1. Terapie rivolte a proteina CFTR mutata: modulatori di CFTR.

Fig. 2. Schema semplificato di cellula epiteliale.

Sulla sinistra sono indicati i possibili modulatori di CFTR, dal nucleo alla membrana apicale. In ordine: sulle anomalie di sintesi (rettificatori di stop e amplificatori di sintesi), su maturazione e nubilizzazione della proteina (correttori), sull'apertura di canale (potenziatori) e sua stabilizzazione (stabilizzatori). Questi ultimi sulla membrana apicale (con esempi di mutazione gating G551D e mutazione F508del).

Sulla destra, in membrana apicale, sono indicati due diversi canali, su cui si ritiene possibile una terapia di compensazione: canale alternativo per il cloro (CaCC), con l'azione di attivatori; canale per il sodio (ENaC) con l'azione di inibitori dell'assorbimento di sodio.

In basso, sul nucleo della cellula, sono indicate le possibili terapie che agiscono come trasferimento genico completo, come gene editing o RNA editing (vedere più sotto testo, paragrafo 3 pag. 7). (Tratto da Galletta L, IX Seminario Primavera FFC, 2011, modif.)



È il fronte di ricerca su terapie causali complessivamente più avanzato e in parte entrato nell'applicazione clinica. È quello su cui verte buona parte del Seminario. Qui basta accennare alle funzioni dei diversi modulatori finora oggetto di ricerca (**fig. 2**), più diffusamente illustrati nelle pagine che seguono

- **Potenziatori**: sono farmaci che prolungano l'apertura del canale CFTR quando questo è difettoso o aumentano la permeabilità del canale quando questo è poco permeabile a cloruro e bicarbonato. Sono impiegabili anche quando sono in causa alcune mutazioni di *splicing* che consentono la sintesi di una quota normale di CFTR, che è pure sensibile ad un rinforzo dei tempi di apertura.

---

*Medicare la proteina CFTR mutata*

---

- **Correttori**: farmaci che aiutano la proteina CFTR mutata, bloccata nel suo viaggio di maturazione e destinata alla rimozione, a ripiegarsi (*folded*) correttamente e a raggiungere la membrana apicale della cellula, ove un potenziatore ne rinvigorisce la funzione. Alcuni agiscono legandosi direttamente alla proteina, altri agiscono sulla "proteostasi" cellulare influenzando il sistema di controllo e demolizione di CFTR. La combinazione di correttori con azione diversa, associati a un potenziatore, è la più promettente strategia recentemente messa a punto ed ancora in via di sviluppo.

- **Amplificatori**: composti non ancora approdati alla clinica e concepiti per amplificare la produzione di proteina CFTR, in modo da offrire a correttori e potenziatori maggiore quantità di substrato da recuperare/attivare. Potenzialmente candidati a terapie di combinazione con correttori e potenziatori.

- **Stabilizzatori**: composti, ancora in fase iniziale di studio, che concorrono ad allungare la vita (abituale limitata) alla proteina CFTR sulla membrana cellulare, potenziali compagni di altri modulatori.

- **Composti che impediscono la prematura interruzione di sintesi CFTR**. Potremmo chiamarli "rettificatori di stop". Sono in corso nuove vie di ricerca dopo il fallimento di primi tentativi. Consentono di bypassare il segnale di stop prematuro (*stop codon readthrough*) per ottenere la sintesi completa di CFTR.

## 2. Terapie che agiscono con funzioni di compenso su canali diversi da CFTR

Da alcuni anni l'interesse di alcuni ricercatori si sta orientando su interventi che riguardano proteine-canale, pur situate sulla membrana apicale delle cellule, diverse da CFTR (figura 2).

Una linea riguarda canali del cloro non CFTR-dipendenti: uno in particolare, denominato TMEM16A, è stato identificato con progetti FFC. Attualmente, si sta cercando di individuare molecole in grado di potenziarne l'azione (**attivatori**), con l'idea di compensare la funzione, deficitaria in FC, del più potente canale CFTR.

---

*Compensare con altri canali il difetto del canale CFTR*

---

L'altro canale preso di mira è il canale del sodio (canale ENaC). Questo canale ha normalmente la funzione di assorbire lo ione sodio (Na<sup>+</sup>), trasferendolo dall'esterno all'interno della cellula. Tale assorbimento è molto esaltato in FC, per equilibrare la povertà di cloruro (Cl<sup>-</sup>) alla superficie esterna della cellula, dovuta al difetto di CFTR. Alcune linee di ricerca, ancora non conclusive, tendono a mettere a punto "**inibitori**" di ENaC per mantenere il sodio più concentrato fuori della cellula e quindi più attrattivo di acqua, con effetto fluidificante sulle secrezioni.

## 3. Terapie che agiscono direttamente su gene CFTR o suo derivato mRNA

La terapia di trasferimento genico (*gene therapy*).

Questa sollevò grandi speranze quasi 30 anni fa, dopo la scoperta del gene CFTR. Consiste nel trasferire dentro la cellula (nel suo nucleo), trasportato da adeguati vettori (particolari virus o particelle lipidiche-liposomi), l'in-

---

*Terapia genica. Modificare il gene (DNA) o il suo messaggero (mRNA)*

---

tero gene CFTR normale. La cosa riesce molto bene quando si lavora *in vitro*, più problematica quando il bersaglio è l'organismo vivente. Gli ostacoli a questo obiettivo sono stati più pesanti dei pochi modesti successi finora ottenuti. La linea di ricerca non è abbandonata ma è al momento poco coltivata.

#### Modificare il gene o l'mRNA

Nel frattempo, negli ultimi anni, si è aperta una via di terapia genica molto innovativa, quella di modificare nel suo sito il gene, intervenendo sul punto difettoso, il cosiddetto *gene editing*. Esso si basa sulla tecnica chiamata CRISPR/Cas9, e su alcune sue varianti, che mira a rimuovere il segmento di DNA mutato e a rimpiazzarlo con il corrispondente segmento normale. Questa strada è appena iniziata nel campo FC e non sappiamo quali sviluppi potrà avere, anche perché ci sarà sempre la grande difficoltà, incontrata con la terapia genica classica, di come applicare la tecnica, non a livello di singola cellula, ma nell'organismo vivente e senza turbare l'equilibrio complessivo del patrimonio genetico. I primi tentativi in vivo sull'uomo sono comunque appena iniziati su patologie genetiche del sangue. Analoghi intenti stanno prendendo piede anche con interventi di modifica sul derivato genico, il RNA messaggero (*RNA editing*)

### **Conclusioni**

Il panorama di ricerca aperto sul futuro della fibrosi cistica è oggi molto ricco e carico di passi assai convincenti. Perciò vi sono ragioni di ottimismo impensabili ancora pochi anni fa (invitiamo a rivedere il percorso di ricerca illustrato dai Seminari di Primavera FFC negli ultimi 18 anni). Oggi si prospetta la possibilità per molte persone malate di accedere a terapie di ristoro della funzione CFTR in età molto precoce, già dalla diagnosi per screening neonatale, quando non ci sono ancora segni, sintomi e danni irreversibili dovuti alla malattia. D'altro canto è realistico dire che le questioni aperte sono ancora molte e per questo sentiamo il bisogno di mantenere viva la ricerca ed anzi intensificarla: la strada è ben avviata ma non conclusa.



## La scoperta dei modulatori di CFTR

Il percorso di ricerca: dalle diverse mutazioni ai diversi difetti della proteina CFTR e ai diversi farmaci

**Nicoletta Pedemonte**

Laboratorio di Genetica Molecolare,  
Ist. G. Gaslini, Genova

La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni che determinano la perdita di funzione della proteina CFTR, con attività di canale anionico per il cloruro e il bicarbonato (cioè una proteina che permette il passaggio di questi anioni da un lato all'altro delle membrane cellulari). Negli ultimi anni la ricerca di nuovi approcci terapeutici per la FC si è orientata verso l'identificazione di composti chimici in grado di recuperare la funzione della CFTR mutata, conosciuti con il nome di modulatori di CFTR. I modulatori di CFTR rappresentano un gruppo eterogeneo di composti, che agiscono in modi diversi, a seconda del difetto che devono correggere. In molti casi, le mutazioni causano l'assenza o la sostituzione di uno solo dei 1480 aminoacidi (i mattoncini di cui è costituita ogni proteina) che compongono CFTR, determinando la perdita di funzione della proteina attraverso meccanismi diversi. In molti casi, inoltre, le mutazioni causano più di un difetto, quindi agendo con più meccanismi. In questi casi, le mutazioni dovranno essere trattate per mezzo di associazioni di vari tipi di modulatori di CFTR, che esercitano ciascuno un'azione diversa sulla proteina difettosa. Sulla base del "difetto principale", le mutazioni possono essere raggruppate in "classi", ognuna delle quali avrà un possibile trattamento farmacologico (vedere fig. 1, relazione Braggion, pag.18).

---

*I modulatori recuperano la funzione della proteina CFTR, agendo sul difetto indotto da specifiche mutazioni CFTR*

---

Le mutazioni possono causare, ad esempio, la produzione di una proteina "difettosa" che, invece di proseguire la sua maturazione e arrivare alla membrana cellulare, la sua sede di azione, viene degradata subito dopo la sintesi: è questo il caso della delezione (ossia la perdita) dell'aminoacido chiamato fenilalanina in posizione 508 (F508del), la mutazione più frequente nei pazienti FC, e di altre mutazioni di classe 2, che presentano un difetto di maturazione/"folding" o "trafficking" (cioè di viaggio/movimentazione, riferito al fatto che la proteina non "traffica" - ossia non arriva - alla membrana). I composti chimici che correggono (almeno parzialmente) il difetto di maturazione, determinando il "recupero" o "salvataggio" della proteina mutata sono definiti "correttori".

---

*Mutazioni di classe II: blocco di maturazione (l'esempio di F508del)*

---

Nel caso delle mutazioni di classe 3, invece, le mutazioni possono determinare la sintesi di una proteina che matura normalmente, arriva sulla membrana cellulare, ma presenta un difetto nell'apertura e chiusura del canale, che permane in uno stato chiuso o aperto per tempi insufficienti (non permettendo quindi il passaggio degli ioni; difetto di "gating", dall'inglese *gate* = cancello). Un esempio di mutazione di "gating" è la G551D; anche il mutante F508del-CFTR presenta un difetto di "gating", oltre al difetto di maturazione. I composti chimici che agiscono

---

*Mutazioni di classe III (difetto di gating) e di classe IV (ridotta conduttanza)*

---

migliorando il "gating" del canale sono chiamati "potenziatori". I potenziatori riescono a "potenziare" (cioè a mantenere il canale aperto per tempi più lunghi) l'attività della proteina CFTR che è arrivata comunque in membrana e che ha mantenuto l'attitudine a funzionare, seppure in misura del tutto inadeguata. I potenziatori riescono ad attivare anche la proteina CFTR da mutazione di classe 4, cioè una mutazione che altera (rende più "stretto") il canale da cui passano gli anioni (ridotta "conduttanza"): essi compensano la ristrettezza del canale aumentando i tempi di apertura. Le mutazioni di classe 4 sono considerate mutazioni con "funzione residua", nel senso che la proteina da esse codificata mantiene una seppur ridotta funzionalità.

### **Mutazioni di classe V: quota ridotta di CFTR**

Infine, i potenziatori attivano anche la proteina CFTR "normale" (detta anche "selvaggia"), cioè quella che è presente nelle cellule in assenza di mutazioni FC. Questo dato è di interesse per i pazienti che hanno mutazioni appartenenti alla classe 5: i potenziatori infatti sono in grado di attivare quella (piccola) frazione di proteina "normale" che è in genere espressa in presenza di alcune mutazioni cosiddette "di *splicing*" (dall'inglese *to splice* = congiungere). Queste mutazioni, infatti, causano un difetto nella produzione della molecola di RNA messaggero (mRNA) di CFTR. L'mRNA è "copiato" dal gene e funziona a sua volta da stampo per la sintesi della proteina CFTR. Le mutazioni di classe 5, come quelle di classe 4, sono considerate "a funzione residua" perché, nonostante la presenza della mutazione nel gene, non tutte le molecole di mRNA prodotte sono difettose; si ha in genere la produzione di una piccola quota di mRNA "normale" che a sua volta permetterà la sintesi di una quota di proteina CFTR "normale", la cui attività può essere massimizzata grazie ai potenziatori.

### **Mutazioni di classe I: sintesi interrotta o assente (l'esempio delle mutazioni stop)**

La classe 1, infine, raggruppa mutazioni (ad esempio, R553X, G542X, W1282X) che modificano le istruzioni scritte nell'mRNA con l'inserimento di un aminoacido (cioè di un mattoncino della proteina CFTR) trasformandole in istruzioni per interrompere la lettura completa dell'mRNA e quindi la sintesi intera della proteina CFTR. In questo caso, i composti necessari per correggere il difetto devono agire permettendo la continuazione della lettura ("*readthrough*", dall'inglese "leggere attraverso") mediante l'inserimento di un aminoacido qualsiasi al posto dell'istruzione "sbagliata". Si parla quindi di composti "*readthrough*" ("continuatori di sintesi" o "rettificatori di stop"). È inoltre possibile ipotizzare che, in futuro, il recupero dell'attività delle mutazioni di classe 1 potrebbe essere ulteriormente aumentata associando ai "continuatori di sintesi" un potenziatore, che agisse sulla quota di proteina sintetizzata in maniera completa e arrivata quindi in membrana. Sono comprese nella classe 1 anche altre mutazioni più rare che alterano profondamente la struttura della proteina.

Oltre ai potenziatori, anche i correttori potrebbero avere un'utilità per più mutazioni, non solo di classe 2: infatti, promuovendo la maturazione della proteina CFTR, permetterebbero di avere più proteina "matura" a disposizione del potenziatore. Considerando inoltre che molti correttori riescono ad aumentare anche la maturazione della proteina CFTR che non presenta difetto di maturazione (e addirittura la proteina CFTR "normale"), i correttori potrebbero essere usati in teoria su tutte le classi di mutazioni. In maniera simile, anche alcuni composti che agiscono aumentando la sintesi della proteina CFTR (usando come stampo l'mRNA) permetterebbero di aumentare la quantità di proteina CFTR a disposizione per correttori e/o potenziatori. Tali composti sono stati chiamati "amplificatori" e sono ancora nelle fasi iniziali di studio.

### **I difetti sulla proteina CFTR causati dalla mutazione F508del**

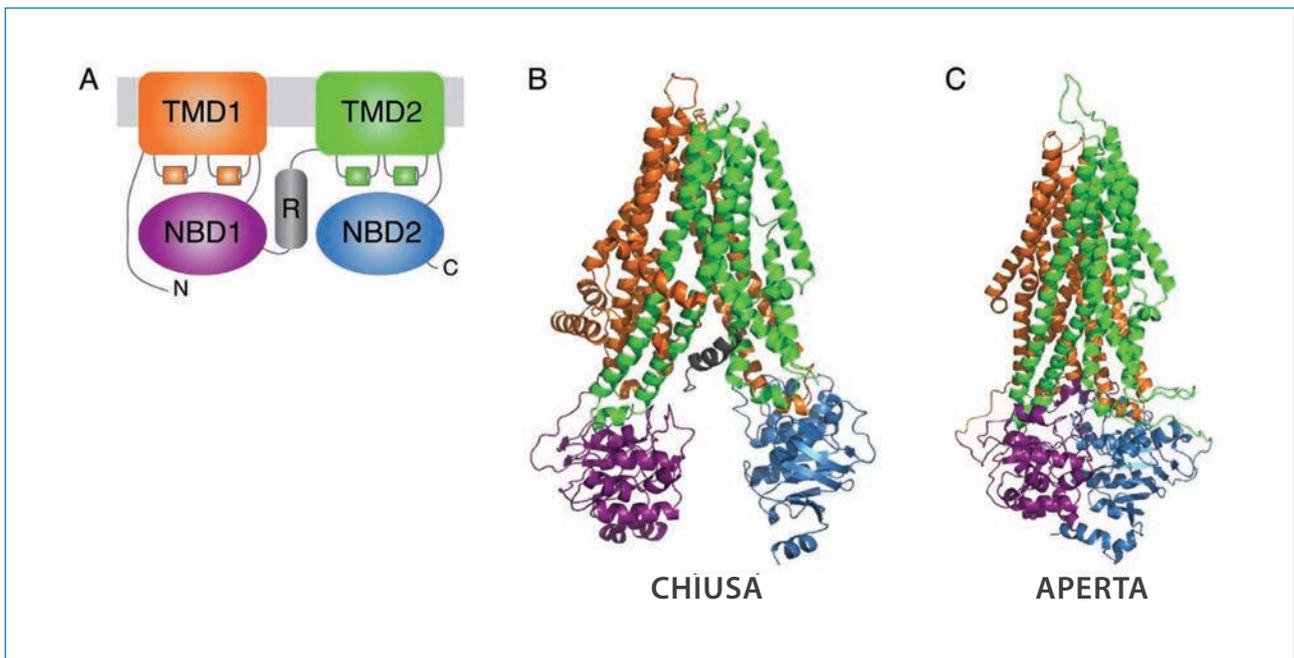
Com'è possibile che la sostituzione o la mancanza di un singolo aminoacido abbia conseguenze così drastiche sulla proteina CFTR?

### **I cinque "domini" della proteina CFTR**

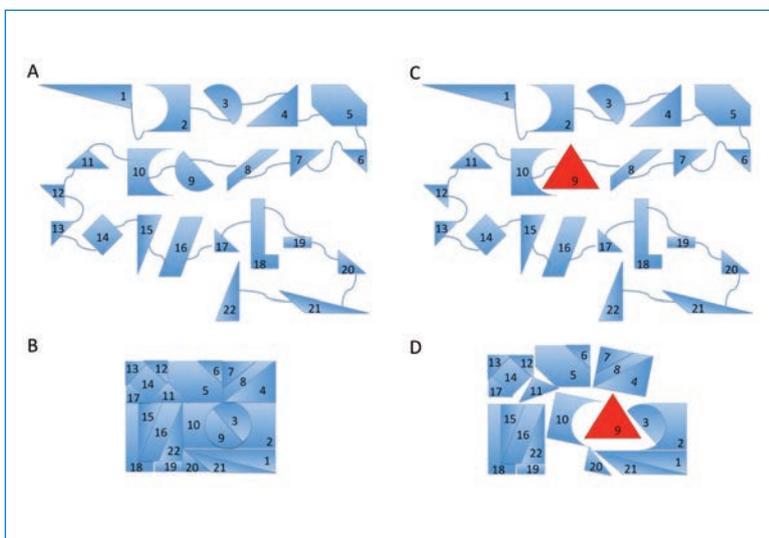
La proteina CFTR è composta da cinque domini (cioè, "regioni" o "parti" della proteina. Vedi fig.1) distinti: due "domini transmembrana" (attraversano la membrana cellulare: TMD1 e TMD2), che contribuiscono alla formazione del canale attraverso cui passano gli ioni; due domini situati sul lato intracellulare (chia-

mati NBD1 e NBD2), che costituiscono una riserva energetica per la cellula, indispensabile per l'apertura e la chiusura del canale di CFTR; un "dominio regolatorio" (R), che regola l'apertura e la chiusura (*gating*) del canale.

Quando parliamo di sequenza e domini di una proteina, probabilmente la prima cosa che immaginiamo è una struttura bidimensionale come quella rappresentata in **Figura 1A**. Le proteine però sono strutture tridimensionali, composte da una catena di aminoacidi (immaginatela come una sequenza di mattoncini) che si ripiega in vari modi (**Figura 1B**). Questi mattoncini però interagiscono fra di loro sulla base delle loro proprietà chimiche: semplificando molto, sono come i pezzi di LEGO che possono essere "attaccati" tra loro solo se hanno la forma e la dimensione giuste. La proteina CFTR inizia a ripiegarsi nella sua struttura tridimensionale tipica già durante la sintesi della catena di aminoacidi che la compone. In questo processo, è aiutata da una serie di proteine, chiamate "chaperoni" (cioè "accompagnatori") molecolari che interagiscono con CFTR favorendone il corretto ripiegamento. La presenza di ogni singolo aminoacido in una determinata posizione è quindi importante e determina il modo in cui tutta la sequenza di aminoacidi si ripiega in una struttura tridimensionale (**Figura 2**).



**Figura 1. Architettura della proteina CFTR.** (A) Modello schematico della proteina CFTR, in cui sono riportate le diverse regioni (chiamate "domini") in cui è suddivisa la proteina. (B e C) Modelli della struttura della proteina CFTR umana nella conformazione CHIUSA (B) e APERTA (C), che mostrano il modo in cui interagiscono i vari domini della proteina. Domini transmembrana (cioè che attraversano la membrana cellulare: TMD1 e TMD2) domini che legano nucleotidi (piccole molecole organiche cariche di energia che vengono "consumate" durante l'apertura e la chiusura del canale CFTR): NBD1 e NBD 2. Dominio regolatorio (R), che regola l'apertura e la chiusura (*gating*) del canale. (Tratto da Mijnders et al [1])



**Figura 2. Ripiegamento della catena di aminoacidi che costituisce una proteina.** (A) Ogni proteina è formata da una catena di aminoacidi. Ogni aminoacido ha caratteristiche chimiche diverse. Possiamo immaginarli come mattoncini LEGO, di forma e dimensioni diverse. (B) Le catene di aminoacidi si ripiegano in una struttura tridimensionale, dove i vari mattoncini interagiscono fra di loro sulla base delle loro proprietà chimiche. La presenza di ogni singolo aminoacido in una determinata posizione è importante e determina il modo in cui tutta la catena si ripiega e funziona. (C) Le mutazioni possono causare la presenza di un aminoacido "sbagliato" (segnato in rosso) in una data posizione della catena. (D) La presenza di un singolo aminoacido "sbagliato" può interferire con il ripiegamento della catena di aminoacidi della proteina e la struttura risultante è difettosa.

---

### La mutazione F508del impedisce la regolare conformazione di CFTR, che viene rimossa dal sistema di controllo

---

La mutazione F508del causa alterazioni nella struttura e nelle interazioni di zone diverse della proteina CFTR: destabilizza la struttura tridimensionale di NBD1, causa dei difetti nell'interazione di NBD1 con TMD1 e TMD2, e altera la struttura e le interazioni di NBD2 (1). Questi difetti sono rilevati da complessi di proteine che svolgono il ruolo di sistemi di controllo della qualità all'interno della cellula e che indirizzano il mutante F508del-CFTR alla degradazione.

Poiché la mutazione F508del risulta essere quella maggiormente diffusa, è su di essa che si sono concentrate inizialmente le ricerche volte all'identificazione di molecole potenzialmente utilizzabili a scopo terapeutico per la FC.

### La ricerca dei modulatori della proteina CFTR mutata

---

#### I potenziatori di CFTR

---

I primi successi sono giunti nella ricerca di potenziatori di CFTR. Nel corso degli anni, è stata identificata una pletera di composti attivi. Uno di questi potenziatori, VX-770, identificato da Vertex Pharmaceuticals (2) ha avuto particolare successo ed è stato il primo farmaco (chiamato Kalydeco) ad essere approvato per il trattamento del difetto di base di pazienti con mutazione G551D e altre mutazioni di classe III, ma anche di pazienti con mutazioni "a funzione residua" (in cui la proteina CFTR ha mantenuto una seppur limitata capacità di funzionare: mutazioni di classe IV e V). Il numero di mutazioni per cui Kalydeco è stato approvato varia a seconda dell'agenzia regolatoria: negli Stati Uniti, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato il farmaco per 38 mutazioni, fra cui mutazioni di classe 3 (difetto di *gating*), di classe 4 (difetto di conduttanza) e di classe 5 (difetto parziale di *splicing*). In Italia, l'Agenzia Italiana Farmaci (AIFA) ha approvato fino ad ora l'uso del Kalydeco per 10 mutazioni: la tabella aggiornata è reperibile sul sito FFC ([www.fibrosicisticaricerca.it/wp-content/uploads/2019/04/Tabella-farmaci-modulatori.jpg](http://www.fibrosicisticaricerca.it/wp-content/uploads/2019/04/Tabella-farmaci-modulatori.jpg)).

---

#### I correttori di CFTR

---

La ricerca dei correttori CFTR è stata più difficile e inizialmente meno efficace rispetto a quella dei potenziatori. Perché è più difficile trovare correttori? Posso solo fornire una risposta "intuitiva": è sicuramente più facile riparare un motore malfunzionante ma ben costruito (potenziatori), rispetto ad un motore malfunzionante perché mal costruito (correttori). Tuttavia, i buoni risultati ottenuti con il potenziatore VX-770 (ivacaftor), dimostrando la fattibilità della farmacoterapia del difetto di base FC, hanno agito da forza trainante per i laboratori accademici e per l'industria coinvolti nella ricerca di correttori di F508del.

### Come si identificano i modulatori di CFTR

In assenza di indicazioni su specifici bersagli farmacologici per il recupero di F508del-CFTR, l'approccio più promettente e diretto è stato lo screening di grandi librerie di piccole molecole attraverso l'impiego di test funzionali o biochimici. Il rationale per questo tipo di approccio è che il recupero della proteina mutante, con conseguente aumento della sua espressione sulla membrana plasmatica, può essere misurato come un aumento del trasporto di anioni, che dipende dal canale CFTR, o rilevando direttamente la proteina CFTR sulla superficie cellulare, cosa possibile per mezzo di uno specifico anticorpo in grado di identificarla.

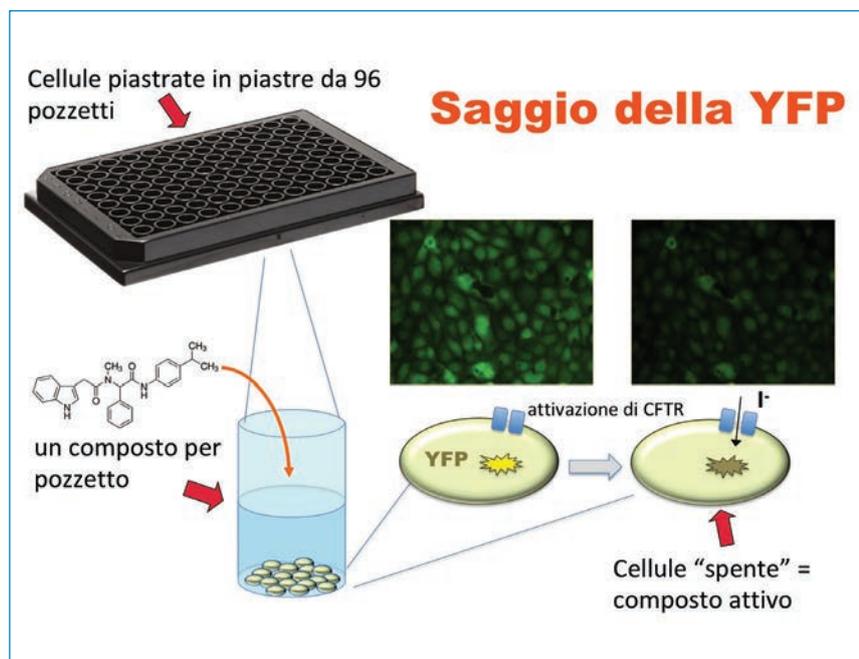
---

#### I primi studi sui correttori

---

Nel 2005, uno studio congiunto fra il laboratorio di Alan Verkman (Università di California, San Francisco) e il nostro laboratorio all'Istituto Gaslini, ha condotto alla identificazione dei primi correttori di F508del-CFTR mediante screening di una collezione molto ampia (150.000) di piccole molecole (3). Lo screening era stato effettuato utilizzando cellule epiteliali di tiroide di ratto di ceppo "Fischer" (chiamate FRT), che esprimevano alti livelli della proteina F508del-CFTR e di una variante di una speciale proteina chiamata "proteina fluorescente gialla" (*Yellow Fluorescent Protein, YFP*) sensibile a determinati anioni, in particolare lo ioduro.

Il saggio basato su YFP sfrutta infatti la capacità di CFTR di far passare, oltre a cloruro e bicarbonato, anche altri anioni, come lo ioduro appunto. Quando lo ioduro entra nella cellula, attraverso CFTR, si lega alla YFP, spegnendone la fluorescenza. Nelle cellule trattate con un composto che agisce come un correttore, ci sarà più CFTR sulle membrane delle cellule, e quindi l'ingresso di ioduro (e lo spegnimento della fluorescenza della YFP) sarà più veloce (Figura 3).



**Figura 3. Schema del saggio funzionale per CFTR basato sulla "proteina fluorescente gialla" (Yellow Fluorescent Protein, YFP).** Il saggio serve a trovare composti in grado di correggere il difetto di attività della proteina CFTR mutata. Le cellule che esprimono sia la CFTR, sia la YFP sono seminate su piastre con 96 pozzetti. In ogni pozzetto viene poi aggiunto un composto chimico diverso che, nel caso del saggio per correttori, viene lasciato agire per 24 ore. Al momento del saggio, le cellule vengono stimulate per attivare al massimo CFTR, e si legge la fluorescenza delle cellule prima e dopo l'aggiunta nel pozzetto di una soluzione "fisiologica" che contiene ioduro. Se CFTR è presente in membrana (perché il difetto di trafficking è stato corretto da un correttore) lo ioduro entrerà nella cellula, spegnendo la fluorescenza della YFP. La velocità di spegnimento della YFP è proporzionale all'attività di CFTR e quindi alla capacità del composto (meso nel pozzetto) di agire come correttore.

Le cellule FRT e il test con YFP sono state uno strumento molto utile per identificare i modulatori farmacologici CFTR, essendo compatibili con tutte le procedure richieste dallo screening su larga scala (ad esempio lavaggi cellulari e aggiunta di composti), e consentendo inoltre anche di effettuare alcuni test che caratterizzano in maniera più dettagliata la funzione CFTR e l'attività dei modulatori di CFTR. Questi test sono chiamati elettrofisiologici e sono la "corrente di cortocircuito" e le registrazioni "patch-clamp". Le misure di corrente di cortocircuito permettono di valutare la corrente ionica (cioè il flusso di ioni) tra i due "lati" di un epitelio (cioè di un singolo strato composto da migliaia di cellule epiteliali), in assenza di stimolazioni, o in presenza di stimoli farmacologici che provocano l'attivazione o l'inibizione di CFTR o altri trasportatori ionici. La tecnica del patch-clamp permette invece di studiare diversi aspetti: ad esempio, si può valutare la corrente ionica totale che fluisce fra i due lati della membrana di una cellula intera; oppure si può vedere, in maniera molto dettagliata, come funzionano singole molecole di CFTR (inserite in un piccolo pezzettino di membrana cellulare, "strappato via" dalla cellula), esaminando le aperture e chiusure dei canali, e determinando quanta corrente (quanti ioni) fluiscono attraverso di essi. Questa modalità permette ad esempio di valutare se una mutazione provoca o meno un difetto di *gating*.

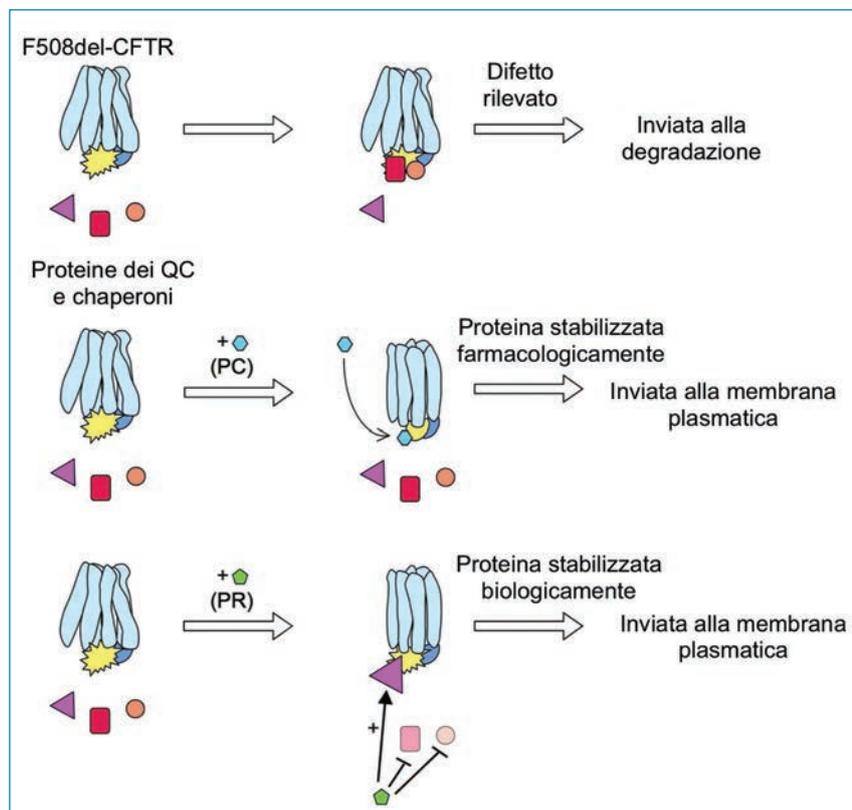
*I test elettrofisiologici per testare la funzione CFTR e l'attività dei modulatori*

Questo nostro primo studio del 2005 ha portato all'identificazione di una serie di correttori di F508del-CFTR, suddivisi in 5 classi. Tuttavia, solo i correttori di classe 4, in particolare il corr-4a, hanno mostrato una seppur modesta efficacia sulle cellule epiteliali bronchiali primarie (3). Negli stessi anni, Vertex Pharmaceuticals otteneva risultati significativi nella scoperta di altri correttori. Con un approccio simile al precedente, la Vertex ha identificato 13 classi di composti chimici, con attività di correttori, sei delle quali attive anche su cellule FRT esprimenti la F508del-CFTR. Il successivo round di ottimizzazione di uno dei risultati dello screening primario ha portato al VX-809 (lumacaftor), il primo correttore approvato per l'uso umano, in pazienti omozigoti per la F508del, in combinazione con il potenziatore VX-770 (4). Nonostante l'efficacia mostrata *in vitro*, l'efficacia del farmaco in vivo su pazienti omozigoti F508del è significativamente inferiore a quella del potenziatore VX-770 (Ivacaftor) su pazienti con G551D. Questi risultati sottolineano la particolare difficoltà nel correggere il difetto di maturazione della mutazione F508del.

*Dai primi correttori al VX-809 e alla sua combinazione con il potenziatore VX-770*

## I meccanismi di azione dei correttori

I correttori possono agire con meccanismi diversi: possono interagire direttamente con CFTR agendo come chaperoni (“accompagnatori” farmacologici) favorendone il corretto ripiegamento o possono modulare l’attività di altre proteine intracellulari, agendo come regolatori della “proteostasi” (Figura 4).



**Figura 4. Meccanismi di azione dei correttori.** Gli scenari illustrano l’attività dei correttori come **chaperoni farmacologici (PC)** o come **regolatori di proteostasi (PR)**. La proteina **F508del-CFTR** interagisce con proteine dei sistemi di controllo di qualità (QC; in arancione e rosso) e con proteine che funzionano da chaperoni (accompagnatori) molecolari (in rosa), cioè assistono CFTR durante il suo ripiegamento. Nello scenario in alto, il difetto di ripiegamento della F508del-CFTR è rilevato dalle proteine QC (in arancione e rosso), che si legano a CFTR, e la proteina mutata è inviata alla degradazione. Nello scenario di mezzo, in presenza di un correttore che agisce come chaperone farmacologico, la proteina mutata viene stabilizzata farmacologicamente, quindi in assenza di interazione con il chaperone molecolare (in rosa). La proteina traffica quindi verso la membrana plasmatica. Nello scenario in basso, in presenza di un correttore che agisce come regolatore di proteostasi, l’attività delle proteine QC (in arancione e rosso) viene inibita, mentre l’attività del chaperone molecolare (in rosa) viene promossa dal regolatore di proteostasi: la proteina mutata viene stabilizzata biologicamente, e può trafficare verso la membrana plasmatica.

Cosa è la proteostasi? È un termine nato dall’unione delle parole proteina e “omeostasi” (cioè, mantenimento dell’equilibrio delle proteine cellulari). Esistono infatti percorsi biologici contrapposti ma tra loro integrati all’interno delle cellule: essi controllano, di concerto, la biogenesi, il ripiegamento, il traffico e la degradazione delle proteine presenti

**Correttori:**  
**“accompagnatori”**  
**della proteina CFTR**  
**mutata o “regolatori**  
**della proteostasi”**

nella cellula. Per i correttori che interagiscono direttamente con CFTR, si può parlare di almeno 3 tipi diversi di meccanismi di azione: sono definiti correttori di tipo 1 (o C1) quelli che correggono i difetti nell’interazione di NBD1 con TMD1 e TMD2; correttori di tipo 2 (o C2) quelli che agiscono su NBD2 e le sue interfacce; e correttori di tipo 3 (o C3) quelli che stabilizzano NBD1 (1). I correttori che agiscono come regolatori di proteostasi, invece, possono promuovere l’attività di proteine che agiscono come chaperoni molecolari, facilitando il ripiegamento (*fold*ing) e la maturazione di F508del-CFTR, oppure modulare

i sistemi cellulari di controllo di qualità responsabili del rilevamento e della degradazione della CFTR mutata. Gli studi eseguiti hanno messo in luce discrepanze tra gli effetti dei correttori in modelli cellulari diversi rispetto alle cellule epiteliali naturali.

Questo ha portato a supporre che una parte dei correttori identificati nel corso degli anni non interagiscano direttamente con F508del-CFTR, ma siano in realtà regolatori di proteostasi. Una diretta conseguenza di questo è che, se si vogliono trovare dei correttori che funzionino bene sulle cellule epiteliali “native” (naturali dell’organismo), sarebbe opportuno testare i composti utilizzando un modello cellulare quanto più possibile simile alle cellule epiteliali native. Ad oggi, il modello più efficiente è costituito da cellule epiteliali bronchiali, opportunamente coltivate *in vitro*, che provengono direttamente da soggetti, con o senza FC (“colture primarie”).

L’esistenza di diversi meccanismi di azione dei correttori di CFTR ha una conseguenza molto interessante: è possibile identificare correttori che, agendo con meccanismi diversi, abbiano effetti additivi sul salvataggio della F508del-CFTR, raggiungendo dei livelli di recupero del difetto di

maturazione mai osservati in precedenza, come dimostrato recentemente dal gruppo di ricerca di Gergely Lukacs (8). Anche l'industria Vertex sta lavorando in questa direzione e attualmente sono in corso due trial clinici di Fase III con due diverse combinazioni di due correttori (più il potenziatore ivacaftor). I primi risultati resi noti a inizio marzo sono estremamente incoraggianti (<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/correcting-and-replacing-two-phase-3-studies-triple-combination>). L'identificazione di combinazioni di correttori particolarmente efficaci apre la possibilità di utilizzare questi composti non solo per pazienti che presentano due copie della F508del, ma anche per pazienti con una sola copia di questa mutazione, in combinazione con un'altra mutazione, non necessariamente responsiva ai modulatori di CFTR (in altre parole, qualunque sia la seconda mutazione del paziente). Infatti, usando una combinazione di correttori particolarmente efficace, l'attività di CFTR che si otterrebbe "correggendo" la sola F508del-CFTR allo stato di eterozigote sarebbe sufficiente a garantire efficacia terapeutica.

---

*Combinazione di correttori per sommare azioni diverse di recupero CFTR*

---

### **Il progetto FFC *Task Force for Cystic Fibrosis***

Abbiamo visto che un concetto da tenere presente nella ricerca di nuovi modulatori di CFTR è l'importanza della scelta dei modelli cellulari usati per gli studi: infatti, solo una parte dei correttori identificati fino ad ora funziona sulle cellule epiteliali native dei pazienti FC. Diventa quindi fondamentale una validazione precoce dell'attività dei composti su cellule di pazienti FC da colture primarie, per mezzo di tecniche elettrofisiologiche, soprattutto la misurazione della corrente di cortocircuito, che permette di valutare non solo l'attività dei composti su CFTR stessa, ma anche di evidenziare eventuali effetti collaterali su altri canali o trasportatori ionici espressi da queste cellule. Questa è la filosofia con la quale è stato sviluppato il progetto *Task Force for Cystic Fibrosis* (TFCF), il progetto strategico voluto e finanziato da FFC, che vede coinvolti il nostro laboratorio all'Istituto G. Gaslini e il Dipartimento "D3-Pharmachemistry" dell'Istituto Italiano di Tecnologia. Obiettivo del progetto TFCF era l'identificazione di nuovi modulatori di CFTR. A tal fine, sono stati valutati più di 11.000 composti chimici in tre screening separati. Due screening sono stati dedicati all'identificazione di correttori su due tipi cellulari diversi (le già citate FRT e cellule bronchiali immortalizzate). Il terzo screening è stato invece rivolto verso la scoperta di nuovi potenziatori. Complessivamente i tre screening effettuati in duplicato hanno comportato l'esecuzione di circa 80.000 test. Attraverso la sintesi chimica e la successiva analisi di diverse centinaia di analoghi dei composti più promettenti, il progetto TFCF ha portato all'identificazione di svariati correttori e potenziatori. Particolare interesse ha destato una classe di composti chimici che agiscono come correttori e funzionano a concentrazioni molto basse (cioè sono composti molto potenti).

---

*Screening di molti composti: quelli attivi (come correttori o potenziatori), modificati poi per ottenerne di più efficaci/potenti*

---

Tra questi è stato selezionato il composto più potente e più promettente sul piano farmacologico, identificato con il codice ARN23765, che è in assoluto il correttore più potente mai identificato finora: funziona a concentrazioni che sono almeno 1.000 volte più basse di quelle necessarie per il VX-809.

Il correttore ARN23765 è al momento in fase preclinica, una fase obbligatoria, propedeutica agli studi clinici, che mira a valutare diversi aspetti: in primo luogo, come si comporta il composto nell'organismo vivente (modelli animali), definendo come e quanto viene assorbito, e quanto a lungo rimane disponibile in circolo e nei tessuti. Il secondo obiettivo è valutare la sicurezza del composto, mediante la ricerca di eventuali, possibili effetti collaterali tossici. Il fine ultimo è di arrivare a stabilire le dosi più adeguate per iniziare lo studio clinico nell'uomo. La fase preclinica di ARN23765 è portata avanti in collaborazione con la società APTUIT di Verona, un'organizzazione specializzata nel supporto alle varie fasi di sviluppo di un farmaco.

---

*Trovato un correttore molto potente (ARN23765), candidato a diventare farmaco, ora in fase di studio preclinico*

---

Gli studi preclinici con ARN23765 sono stati suddivisi in tre parti: i risultati ottenuti nella prima parte degli studi, terminata a dicembre 2018, hanno infatti confermato l'adeguatezza del composto a

diventare farmaco e indicato dati preliminari di non tossicità, permettendo l'avanzamento alla seconda parte di studi. In questa seconda parte, dapprima saranno messe a punto nuove procedure di sintesi chimica che consentiranno di produrre la quantità di composto necessaria per gli studi successivi. Saranno quindi completati gli studi di farmacocinetica e verrà fatta una valutazione più approfondita della possibile tossicità del composto. Questi studi saranno condotti su più animali di specie diverse e con durata di trattamento maggiore rispetto a quelli della prima parte. Se anche questi risultati saranno positivi, si passerà alla terza fase preclinica, finalizzata a confermare i dati di farmacocinetica e di sicurezza, che consentiranno di passare alla eventuale sperimentazione clinica.

### *In modelli animali diversi testare il comportamento del correttore ed escluderne la possibile tossicità*

## **Il contributo predittivo delle cellule nasali e degli organoidi intestinali**

I modulatori di CFTR, sia potenziatori sia correttori, possono avere una valenza terapeutica anche per pazienti FC che hanno mutazioni diverse da quelle per le quali sono stati sviluppati questi composti. Recentemente sono state ottimizzate delle tecniche di coltura cellulare che permettono di prelevare cellule epiteliali delle prime vie aeree (da *brushing* nasale) o intestinali (da biopsia rettale) da pazienti FC. Questo è particolarmente importante per quei pazienti che sono portatori di mutazioni molto rare, di cui non si conosce il tipo di difetto e la sensibilità farmacologica. Su

### *Colture di cellule nasali o di organoidi da cellule intestinali per testare in vitro la funzione CFTR e l'effetto dei modulatori*

queste cellule, infatti, opportunamente cresciute e differenziate *in vitro* (a formare epitelio di cellule nasali o organoidi intestinali) sarà possibile effettuare saggi per valutare la risposta ai modulatori di CFTR. Nel caso delle cellule epiteliali nasali, il saggio di elezione per valutare l'attività di CFTR rimane la misurazione della corrente di cortocircuito. Nel caso delle cellule epiteliali intestinali, invece, la valutazione dell'attività di CFTR viene

fatta attraverso un nuovo tipo di saggio, basato sul rigonfiamento degli "organoidi". Gli organoidi sono delle microscopiche sfere (quindi delle strutture tridimensionali) che hanno come parete esterna uno strato di cellule epiteliali intestinali, e racchiudono al loro interno del liquido. La quantità di liquido all'interno dipende dall'attività di CFTR. Gli organoidi derivati da cellule, opportunamente stimolate, di soggetti sani hanno abbondante liquido al loro interno e sono relativamente "grossi". Al contrario, gli organoidi derivati da cellule di pazienti FC sono piccoli, perché il liquido al loro interno è poco. Tuttavia, se l'attività di CFTR è ripristinata farmacologicamente, mediante trattamento con correttori o potenziatori (a seconda del tipo di mutazione), la quantità di liquido all'interno degli organoidi aumenta, causando il loro rigonfiamento, che è misurabile.

Le cellule nasali e intestinali isolate dai pazienti costituiscono una risorsa molto importante che permette di studiare i meccanismi delle diverse mutazioni e la loro sensibilità farmacologica, al fine di poter fornire ad ogni paziente, in un futuro (si spera prossimo), la soluzione terapeutica più adeguata fra le varie tipologie di modulatori di CFTR che saranno state sviluppate e rese disponibili in clinica.

### *Predire nel singolo paziente il modulatore per lui efficace*

#### **Bibliografia essenziale**

1. Mijnders M, Kleizen B, Braakman I. (2017) Correcting CFTR folding defects by small-molecule correctors to cure cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol.* 34:83-90.
2. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubbran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P. (2009) Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(44):18825-30.
3. Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ, Verkman AS. (2005) Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest.* 115(9):2564-71.
4. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(46):18843-8.
5. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group. (2015) Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 373(3):220-31.
6. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. (2011) A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 365(18):1663-72.
7. Li H, Pesce E, Sheppard DN, Singh AK, Pedemonte N. (2018) Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: From discovery to drug development. *J Cyst Fibros.* 17(25):S14-S21.
8. Veit G, Xu H, Dreano E, Avramescu RG, Bagdany M, Beitel LK, Roldan A, Hancock MA, Lay C, Li W, Morin K, Gao S, Mak PA, Ainscow E, Orth AP, McNamara P, Edelman A, Frenkiel S, Matouk E, Sermet-Gaudelus I, Barnes WG, Lukacs GL. (2018) Structure-guided combination therapy to potentially improve the function of mutant CFTRs. *Nat Med.* 24(11):1732-1742.



## 2011-2019: i modulatori di CFTR negli studi clinici e nella vita reale

### **Cesare Braggion**

*Direttore di "Orizzonti FC",  
già direttore del Centro Fibrosi Cistica di Firenze  
e dirigente nel Centro FC di Verona*

### **Le misure di efficacia e sicurezza nella ricerca clinica**

Le più rilevanti sono quelle che informano sulla durata della vita, su quanto spesso compaiono e quanto rilevanti sono i sintomi acuti di malattia, e sulla qualità di vita. Poiché questi parametri devono essere registrati durante tempi lunghi (mesi e anni), si preferisce utilizzare le cosiddette misure "surrogato", che possono essere valutate in 12-24 settimane e che correlano con le precedenti. Un esempio è rappresentato dal FEV1 (volume di espirazione forzata nel primo secondo), che si misura con la spirometria e che è un indice dell'ostruzione bronchiale e perciò della severità della malattia polmonare. Si tratta di una misura semplice, riproducibile, ottenibile con strumenti di basso costo e molto diffusi, che richiede poca collaborazione e non pone problemi di sicurezza. Altre misure di efficacia sono i "biomarcatori", misure dirette di un processo biologico o di una cascata di eventi che sono alla base di una malattia. Nel caso della fibrosi cistica (FC), sono biomarcatori, ad esempio, la misura del cloro nel sudore, che riflette il funzionamento della proteina CFTR, e la densità batterica nello sputo.

Non è semplice stabilire quale misura di efficacia sia da preferire rispetto ad altre nel caso di un farmaco in studio. Per una classificazione degli studi clinici si veda la nota redazionale in appendice al testo (*ndr*). Per gli studi clinici di fase III e IV, quelli che includono centinaia di pazienti e sono finalizzati, rispettivamente, alla commercializzazione e alla verifica di efficacia e sicurezza nella vita reale e per tempi prolungati (molti mesi), le misure di efficacia comunemente utilizzate nella FC sono quattro:

---

*Quali parametri  
si usano per stabilire  
se un farmaco  
in sperimentazione  
è sicuro ed efficace*

---

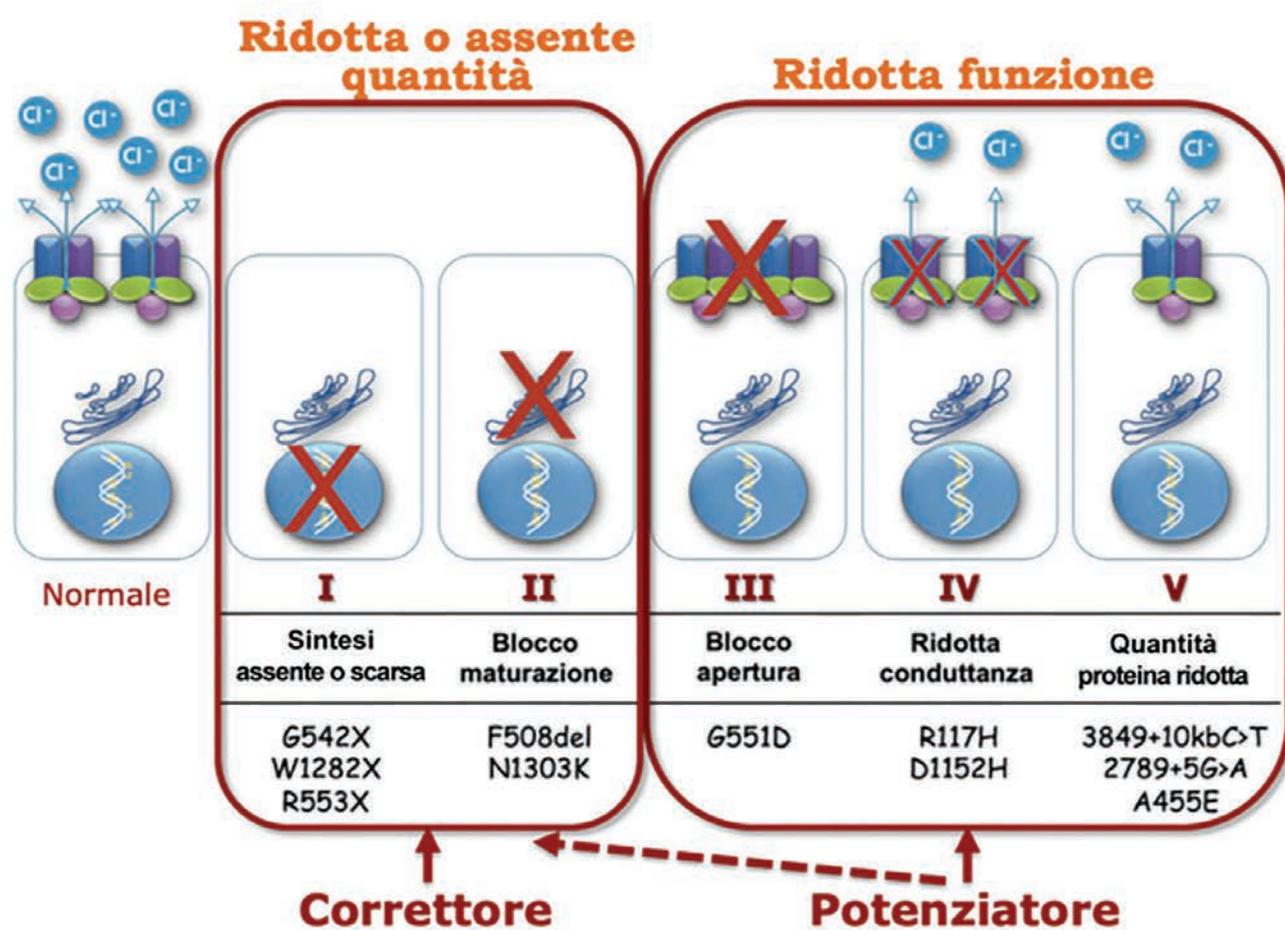
- 1) la misura del FEV1, espresso in percentuale rispetto ai valori normali per età, statura e sesso (% del valore normale predetto): si considera la sua variazione percentuale o la sua variazione in punti di % predetto rispetto al valore iniziale; rappresenta la principale misura di efficacia;
- 2) il numero delle esacerbazioni polmonari, cioè di quegli eventi acuti caratterizzati da un aumento dei sintomi (tosse, quantità dell'espettorato, etc.), da risentimento generale (perdita di appetito, calo di peso, febbre, malessere), da alcuni segni valutati dal medico (aumento della frequenza cardiaca e respiratoria) o da una riduzione del FEV1 maggiore del 10% rispetto al valore precedente; agli eventi sopra descritti deve seguire una terapia antibiotica;
- 3) la stima soggettiva dei sintomi respiratori, del proprio funzionamento e dell'attività fisica svolta, del senso di benessere generale, dell'umore, del carico terapeutico quotidiano, della propria immagine corporea, dell'appetito e del comportamento con il cibo, dei sintomi digestivi, che

vengono valutati con un questionario (CFQ-R) e che nel loro insieme indicano la “qualità della vita”, in rapporto allo stato di salute; si possono utilizzare anche solo 1-2 parametri del questionario, come ad esempio i sintomi respiratori;

- 4) il cloro nel sudore, che dipende dal funzionamento della proteina CFTR nelle ghiandole sudoripare (nella malattia il suo valore è elevato, in media circa 100 mEq/L).

### La ricerca clinica sui farmaci modulatori della proteina CFTR

I farmaci “modulatori” agiscono sulla proteina CFTR difettosa in base al meccanismo attraverso cui le mutazioni ne alterano il funzionamento. Le mutazioni possono differenziarsi in due grandi categorie: quelle che impediscono alla proteina di arrivare in membrana cellulare e quelle che determinano una ridotta funzione della proteina, comunque presente sulla membrana cellulare (**Figura 1**). In entrambi i casi ci può essere una quantità di proteina CFTR funzionante molto bassa, al massimo il 5-10%: da ciò derivano i sintomi della malattia. La Figura 1 mostra le caratteristiche delle 5 classi di mutazioni. I farmaci “potenziatori” agiscono sulla proteina CFTR in membrana, attivandone la funzione. I farmaci “correttori” agiscono sulla maturazione e la conformazione della proteina, in modo che questa arrivi alla membrana cellulare.



Adapted from: <http://www.cff.org/.../2013 Patient Registry Report>

Figura 1

Le mutazioni del gene CFTR.

Classificazione funzionale e farmaci modulatori.

Sono indicati, per ciascuna classe, i meccanismi attraverso cui le mutazioni alterano la proteina CFTR ed alcuni esempi di mutazione. Le mutazioni di classe I e II comportano una sintesi molto scarsa o addirittura assente di proteina CFTR, che non arriva sulla membrana cellulare e viene rimossa. Le mutazioni di classe III e IV, con CFTR comunque presente sulla membrana apicale, determinano invece un difetto di funzione della proteina, mentre le mutazioni di classe V comportano una ridotta quantità di proteina normale, posizionata in membrana.

I farmaci potenziatori correggono il difetto di funzione della proteina, ma anche potenziano la quota normale di CFTR, ridotta per mutazioni di classe V. I correttori incidono sulla maturazione della proteina CFTR mutata, per consentirne il posizionamento sulla membrana cellulare.

Ho scelto di presentare i risultati clinici degli studi con i farmaci modulatori a paragone tra di loro e a paragone con quelli di alcuni studi precedenti su farmaci diversi (**Figura 2**). Benché questo confronto rappresenti una “forzatura”, poiché gli studi sono stati condotti in tempi diversi e con pazienti di caratteristiche cliniche diverse, esso ci consente, però, di “pesare” i risultati raggiunti per ciascuna delle principali misure di efficacia. La Figura 2 presenta i risultati degli studi come valori medi, che possono non corrispondere a quanto può succedere nei singoli individui in studio, come vedremo in seguito.

Ivacaftor (Kalydeco®) è il primo farmaco potenziatore ad essere stato commercializzato, dopo che ha dimostrato sorprendente efficacia nei soggetti con la mutazione G551D, una mutazione di classe III, che impedisce l’apertura della proteina-canale, per consentire il passaggio del cloro. Nella popolazione in studio, dopo circa 2 settimane il FEV1 aumentava in media del 17% rispetto al valore basale, che corrispondeva a 10 punti di % predetto; questo incremento si manteneva inalterato per la durata di un anno (Figura 2). Si riduceva di circa il 50% il numero delle esacerbazioni polmonari e miglioravano i sintomi respiratori. Ma era particolarmente sorprendente la riduzione media di 49 mEq/L del cloro nel sudore, corrispondente a circa un dimezzamento del suo valore di partenza: questo dato era la conferma che l’Ivacaftor agiva sulla proteina difettosa a livello di funzioni ed organi diversi, comprese le ghiandole che producono il sudore.

*Effetti clinici molto rilevanti del potenziatore Ivacaftor nelle mutazioni “gating”*

Anche nei soggetti che presentavano altre mutazioni di classe III (mutazioni di “gating”), (G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D) sono stati ottenuti gli stessi buoni risultati (Figura2). Il farmaco si è dimostrato sicuro nel breve termine. Recentemente l’agenzia dei farmaci nordamericana ha approvato l’uso di ivacaftor anche in quei soggetti che hanno una mu-

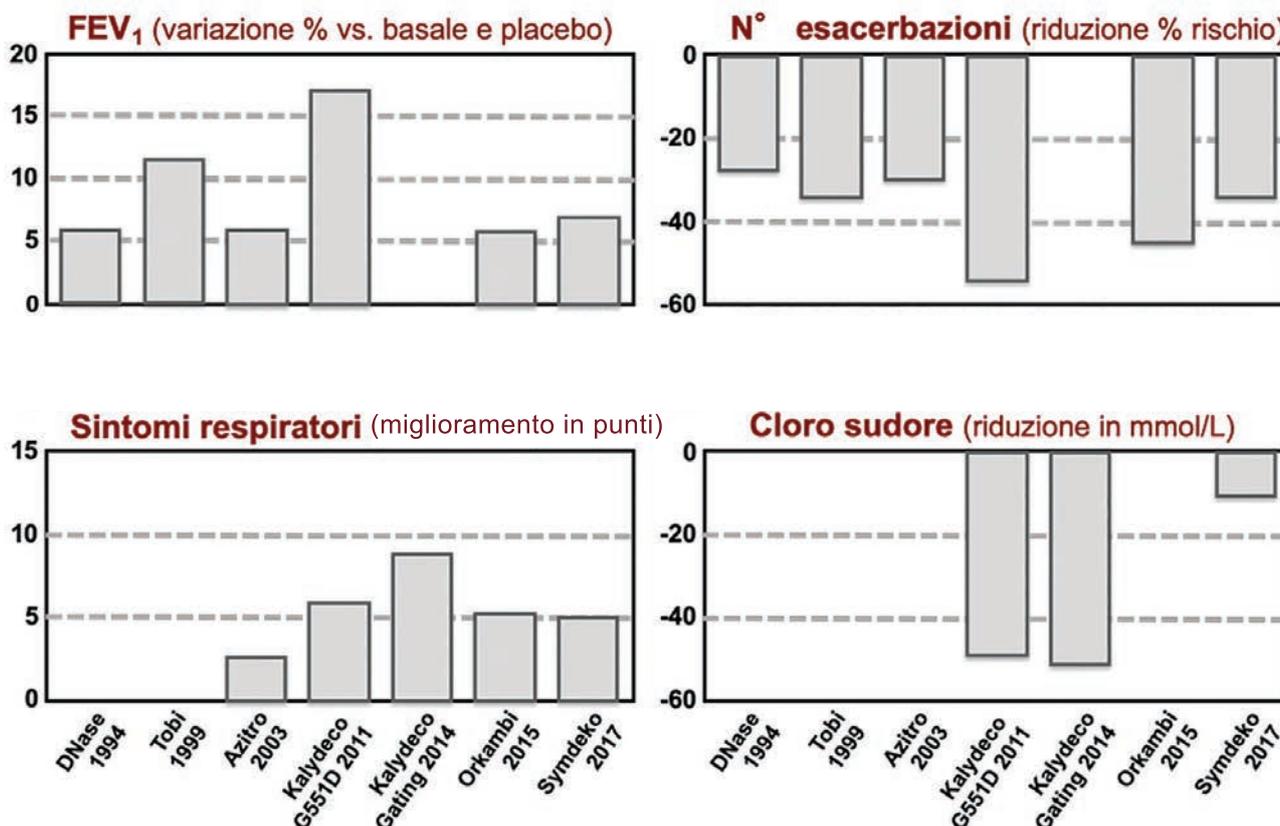


Figura 2

Ricerca clinica: i progetti di fase III. Modulatori a confronto con altri farmaci.

Sono riportate le quattro misure di efficacia principali negli studi clinici ed è indicata la loro variazione, come riportato nei singoli studi clinici con i farmaci modulatori della proteina CFTR e con alcuni farmaci antecedenti. Si veda il testo per i risultati dei singoli studi. Gli studi in cui mancano le barre non hanno rilevato il parametro corrispondente

tazione a “funzione residua”: si tratta di una ventina di mutazioni, in genere associate a sufficienza digestiva, per le quali gli studi in vitro hanno dimostrato che anche in questi casi il potenziatore correggeva parzialmente la funzione della proteina CFTR.

*In soggetti F508del/F508del la combinazione potenziatore Ivacaftor + correttore Lumacaftor mostra minore efficacia e maggiori effetti collaterali rispetto a Ivacaftor per le mutazioni “gating”*

Risale al 2015 la pubblicazione di uno studio, che ha arruolato circa un migliaio di soggetti omozigoti per la mutazione F508del, che rappresenta la mutazione più frequente nella FC. In questi soggetti è stata somministrata una combinazione di un potenziatore, l’ivacaftor, con un correttore, il lumacaftor, a due diverse dosi. Il farmaco di combinazione, poi commercializzato con il nome Orkambi®, ha dimostrato di raggiungere risultati statisticamente significativi per le diverse misure di efficacia, quindi di funzionare, ma i risultati sono stati decisamente inferiori a quelli raggiunti dal potenziatore ivacaftor per le mutazioni di classe III (Figura 2). Lo studio ha dimostrato che il FEV1 aumentava del 5.6% rispetto al valore basale,

che corrispondeva a circa 3 punti di % predetto, e riduceva del 45% il numero delle esacerbazioni polmonari (Figura 2). La somministrazione del farmaco è stata associata a più frequenti effetti collaterali rispetto a Kalydeco®: fame d’aria e senso di costrizione al torace sono stati segnalati nei primi giorni di trattamento, con riduzione dei disturbi entro le prime 2-3 settimane mediante l’uso del broncodilatatore; anche un aumento transitorio nel sangue degli enzimi epatici risultava un effetto più frequente rispetto ai soggetti che assumevano il placebo. Meno effetti collaterali, specie quelli respiratori, e gli stessi risultati clinici sono stati ottenuti nei soggetti omozigoti per la mutazione F508del, sostituendo il lumacaftor con un altro correttore, il tezacaftor, che aveva caratteristiche di farmacocinetica migliori, pure in combinazione con l’ivacaftor (Figura 2). Questo farmaco, Symdeko®,

*Il correttore Tezacaftor associato al potenziatore Ivacaftor in soggetti F508del/F508del*

prodotto come i precedenti dall’azienda Vertex, è stato anche confrontato con Kalydeco® nei soggetti con una mutazione F508del e una mutazione a “funzione residua” (ad es. 2789+5G>A o 3849+10kbC>T): il farmaco combinato è risultato superiore al solo Kalydeco® per il guadagno in FEV1.

Il modesto effetto clinico di Orkambi® e Symdeko® ha spinto i ricercatori ad identificare nuovi correttori, in grado di agire con un meccanismo d’azione diverso dai precedenti. La tripla combinazione di ivacaftor, tezacaftor ed uno dei correttori di nuova generazione, VX445 e VX659, ha dimostrato in vitro di essere più efficace nelle cellule di omozigoti F508del ma anche di eterozigoti, rispetto ad

*Combinazione di due nuovi correttori (VX445 o VX659) + Tezacaftor + Ivacaftor*

Orkambi® e Symdeko®. Nel 2018 sono stati pubblicati i risultati degli studi di fase II che hanno utilizzato dosi crescenti di VX445 e VX659 in combinazione con tezacaftor+ivacaftor: i risultati clinici, ottenuti sia negli omozigoti che eterozigoti per F508del (soggetti con una mutazione F508del ed una mutazione a funzione “minima”=MF), sono paragonabili a quelli ottenuti da

ivacaftor nei soggetti con mutazioni di classe III, sia per quanto riguarda l’incremento di FEV1, che il miglioramento dei sintomi e la riduzione del cloro sudorale. Questi risultati sono molto promettenti.

### Variabilità di risposta clinica ai modulatori

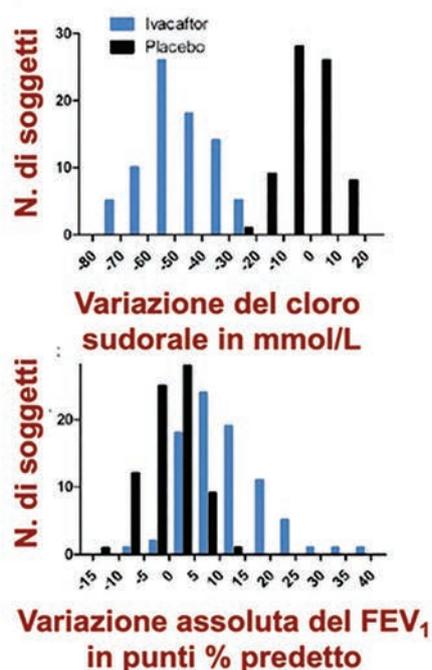
Le variazioni nelle misure di efficacia, ottenute con la somministrazione dei modulatori, sono state presentate come valori medi. Un valore medio indica che una proporzione maggiore di soggetti mostra quella certa variazione di un parametro, ma ci sono anche soggetti che hanno una

*La risposta media ad un farmaco non corrisponde alla risposta individuale*

risposta minore o maggiore. La **Figura 3** mostra sulla sinistra le differenti distribuzioni di risposta del cloro sudorale (in alto) e del FEV1 (in basso) nei soggetti con mutazione G551D che assumevano l’ivacaftor rispetto ai soggetti che assumevano il placebo. I soggetti che assumevano il farmaco si differenziavano nettamente rispetto a chi assumeva il placebo per il

valore del cloro sudorale. Si osserva invece una sovrapposizione nella variazione del FEV1 tra i soggetti che assumevano il farmaco e chi assumeva il placebo: alcuni soggetti in terapia con ivacaftor avevano una risposta ben inferiore alla media e alcuni anche un calo del FEV1.

### Ivacaftor nei soggetti con la mutazione G551D



### Ivacaftor + lumacaftor nei soggetti omozigoti per la mutazione F508del

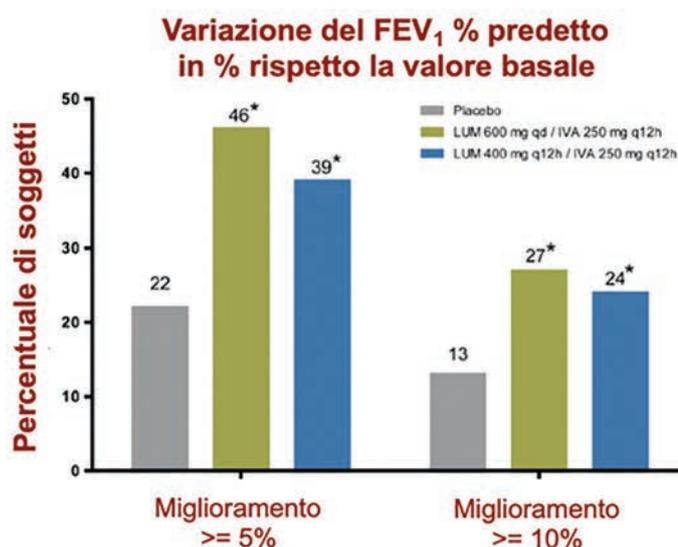


Figura 3

Variabilità di risposta clinica ai modulatori. Variabilità della risposta nello studio che ha valutato l'ivacaftor nei soggetti con la mutazione G551D (sulla sinistra) e la combinazione ivacaftor-lumacaftor nei soggetti con la doppia mutazione F508del (sulla destra). Si veda il testo. N Engl J Med 2011; 365:1663 - N Engl J Med 2015; 373:220

Sulla destra della Figura 3 si osserva che meno della metà dei soggetti che assumevano Orkambi® avevano un guadagno del FEV1 maggiore o uguale al 5% (3). Più della metà perciò guadagnavano meno o addirittura avevano calo del parametro funzionale.

Questi dati si possono interpretare nel modo seguente: laddove una funzione d'organo dipende in modo preponderante dalla proteina CFTR, come è il caso delle ghiandole del sudore, il farmaco mostra in modo inequivocabile il suo effetto. Laddove una funzione dipende solo in parte dalla proteina CFTR, come è il caso del polmone, la risposta al farmaco è più variabile. Infatti, la malattia polmonare è influenzata anche dall'ambiente, da aspetti clinici e sociali individuali, ed anche da altri geni detti "modificatori", che influenzano i meccanismi di difesa e di infiammazione nel polmone.

### Effetto dei modulatori nel medio periodo

Sia nel caso del Kalydeco® per i soggetti con la mutazione G551D, che nel caso dell'Orkambi® per i soggetti omozigoti per la mutazione F508del, l'andamento nel tempo del FEV1 è stato confrontato con chi nella popolazione generale non assumeva il farmaco: entrambi i farmaci hanno dimostrato di rallentare il declino del FEV1. Un rallentamento, ma non l'arresto della perdita di funzione polmonare convincono che, al momento, si debba raccomandare di mantenere le attuali terapie croniche sintomatiche.

### Efficacia dei modulatori nella vita reale e nei soggetti esclusi dalla ricerca clinica

Gli studi clinici di fase III sono molto rigorosi nella metodologia (randomizzazione, doppio cieco, criteri di selezione, placebo, etc.), per dimostrare l'efficacia e la sicurezza di un farmaco: i campioni di soggetti in studio, il numero e le modalità dei controlli periodici sono però diversi da ciò che avviene nella realtà clinica. L'osservazione di quest'ultima è attuata con studi "osservazionali" (fase IV), vale a dire studi che "osservano ma non intervengono" sull'assistenza e sulle terapie in atto quotidianamente e riguardano anche i soggetti che per ragioni diverse

*Gli studi osservazionali dopo che il farmaco è stato sperimentato nei trial clinici*

non sono stati inclusi negli studi clinici: soggetti con una malattia più severa o con una situazione normale, quelli con germi “difficili” o con un’aderenza scarsa al piano di cura. Anche i Registri di patologia consentono di fare queste valutazioni “osservazionali”.

---

*Ivacaftor risulta efficace anche quando la funzione polmonare è normale o molto compromessa*

---

Ivacaftor si è dimostrato efficace anche in individui con la mutazione G551D e funzione polmonare normale. Parametro di efficacia è stato l’“indice di clearance polmonare”, una misura della funzione polmonare che è precocemente alterata in FC, prima che diventi anormale il FEV1. Questo indice è usato in particolare nei bambini piccoli, che non sono in grado di collaborare all’esecuzione delle prove di funzionalità respiratoria classiche. Per contro, negli adulti con malattia polmonare severa (FEV1 < 40% predetto) il farmaco potenziatore si è dimostrato incisivo sulla funzione polmonare ma con un effetto inferiore a quanto è stato riportato negli studi di fase III.

I Registri di patologia si sono dimostrati molto utili per mettere in evidenza l’efficacia di ivacaftor nei soggetti con la mutazione G551D. Il limite di queste rilevazioni è rappresentato dalla scelta dei soggetti che non assumevano il farmaco: non disponendo di soggetti con una mutazione G551D (già tutti in trattamento con il farmaco), il paragone è stato fatto con soggetti con una prevalenza di mutazioni di classe I e II. Sia nel registro nordamericano che in quello inglese l’effetto sul FEV1 è risultato positivo ma meno evidente rispetto a quanto rilevato negli studi di fase III. L’osservazione è stata ancora breve (1 anno) per valutare la sicurezza del farmaco.

Gli studi nella vita reale, che hanno monitorato gli effetti della somministrazione di Orkambi® hanno confermato i risultati clinici emersi nella ricerca clinica di fase III, ma una maggior frequenza di effetti collaterali. Questi ultimi, di tipo respiratorio (fame d’aria, senso di costrizione al torace), comparivano nelle prime 24-48 ore, si mantenevano anche per un mese di terapia ed hanno portato a sospensione del farmaco in una percentuale discreta di pazienti (17-30%). Questi effetti avversi sono comparsi

---

*Nella vita reale confermata efficacia di Ivacaftor + Lumacaftor con più frequenti effetti collaterali rispetto alle sperimentazioni cliniche*

---

più frequentemente nei soggetti con ostruzione bronchiale severa (FEV1 < 40% pred.). La spirometria ha confermato un calo evidente tra le 2 e le 4 ore dopo la somministrazione del farmaco e una risposta parziale all’inalazione del broncodilatatore. Ciò suggerisce di monitorare gli effetti almeno alla prima somministrazione e di ridurre eventualmente la dose del farmaco, aumentandola con gradualità fino alla dose standard, specie in coloro che hanno un’ostruzione bronchiale severa.

## Prospettive future

Nel corso di quest’anno conosceremo i risultati della ricerca clinica di fase III sulla tripla combinazione per correggere il difetto della mutazione F508del sia in eterozigosi che in omozigosi. Sono in corso altri studi in fase II e in fase I per verificare l’efficacia di nuovi potenziatori, correttori, amplificatori e stabilizzatori.

Ma restano attivi anche altri filoni di terapia del difetto di base: la terapia genica, il “taglia-cuci” del DNA per correggere lo specifico difetto prodotto da una mutazione (*Gene editing*: tecnica CRISPR/Cas9) o la riparazione dell’RNA messaggero nel caso di F508del (QR-010). Dopo che lo studio clinico con ataluren non aveva dimostrato l’efficacia attesa del farmaco, si stanno valutando,

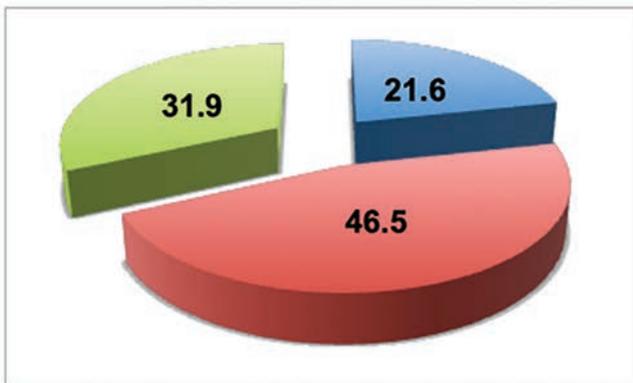
---

*Nuovi composti per mutazioni stop in fase iniziale di studio*

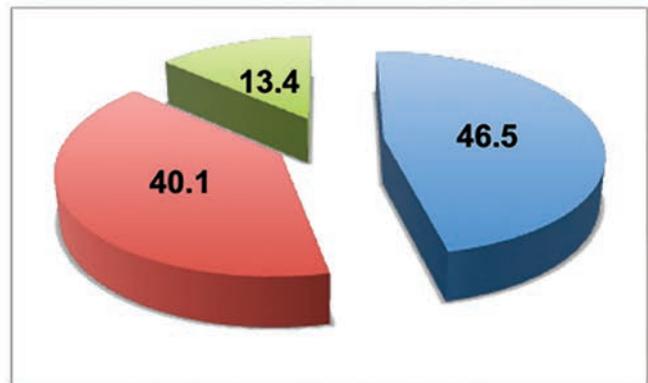
---

nel caso delle mutazioni di classe I mutazioni stop, nuove molecole (NB124 e G418) che consentano di superare i codoni di stop prematuri e completare la sintesi di proteina CFTR. Altri filoni di ricerca riguardano i farmaci in grado di inibire l’attività di eliminazione delle proteine anomale (N91115) dal citoplasma cellulare, inibire il canale del sodio (P1037) o attivare i canali del cloro calcio-dipendenti. Si tratta di studi di fase I o di fase pre-clinica.

### Registro Italiano 2014



### Registro USA 2014



-  Percentuale di individui con genotipo **F508del/F508del**
-  Percentuale di individui con genotipo **F508del/altra**
-  Percentuale di individui con genotipo **altra/altra**

**Figura 4**

#### Le mutazioni: Italia e Nord America

È riportata la distribuzione della mutazione più frequente, la F508del, nei soggetti omozigoti, eterozigoti per la stessa e nei soggetti con entrambe le mutazioni diverse da F508del, ricavata dal report del 2014 del Registro italiano (sulla sinistra) e nordamericano (sulla destra). In Italia c'è un numero inferiore di soggetti omozigoti per la mutazione F508del e superiore di soggetti con entrambe le mutazioni diverse da F508del, rispetto a quanto registrato negli USA. Va segnalato che in Italia il 16% dei pazienti FC ha almeno una mutazione con funzione residua, di classe IV o V, suscettibili quindi al trattamento con Kalydeco (dati del Registro Italiano FC 2016) (ndr).

Occorre considerare che in Italia la distribuzione delle mutazioni è diversa da quella dei paesi nordamericani e nordeuropei (Figura 4). Tra l'altro esiste una discreta percentuale di soggetti che hanno almeno una mutazione con funzione residua che sarebbe sensibile al trattamento con Ivacaftor. Esiste una quota di mutazioni ancora non identificate (9.9% dei soggetti italiani con FC) e di mutazioni rare, per le quali non si conosce il meccanismo d'azione. Anche le mutazioni di classe I sono più frequenti in Italia (circa il 18% dei pazienti censiti dal Registro Italiano). Occorre perciò poter disporre di cellule nasali (sfere nasali) o da biopsia rettale (organoidi intestinali) di un individuo, per studiarne in vitro l'effetto dei farmaci modulatori disponibili. Questa è la strada della personalizzazione della terapia ("teratyping"), che rappresenterà la scommessa per il prossimo futuro.

*Studiare su cellule nasali  
o su organoidi intestinali  
l'effetto individuale  
dei farmaci*

## Appendice (redazionale)

### Classificazione degli studi (trial) clinici in fibrosi cistica per la valutazione di un farmaco o associazione di farmaci.

- **Studi di fase I.** Sono studi condotti su numero limitato di soggetti, in genere sani, non FC. Hanno lo scopo di: 1) analizzare il comportamento (farmacocinetica) del farmaco nel soggetto umano, già considerato negli studi preclinici su modelli animali; 2) valutarne la sicurezza/tolleranza.

- **Studi di fase II.** Sono studi condotti su piccolo numero di soggetti con FC. Hanno lo scopo di: 1) verificare la cinetica del farmaco in condizioni di malattia; 2) valutarne la sicurezza/tolleranza; 3) fare i primi saggi di efficacia.

- **Studi di fase III.** Si basano su un numero più ampio di malati con FC, adottando rigorosi criteri adeguati a ottenere risultati di "evidenza". Sono in genere "controllati" (il trattamento con il farmaco viene comparato con il trattamento con "placebo" (sostanza inerte, senza azione farmacologica) e "randomizzati" (assegnazione con criteri di "casualità" al gruppo farmaco o al gruppo placebo). Possono seguire disegni e modalità di attuazione diversi. Valutano l'efficacia clinica del farmaco, in genere assumendo come indicatore "primario" un parametro riconosciuto come certamente valido per misurare l'efficacia (es. FEV1), ma misurando anche altri indicatori ritenuti di valenza utile ma "secondaria" (es. il peso corporeo, la frequenza di esacerbazioni respiratorie, il punteggio di "qualità della vita", ed altri). La sicurezza/tolleranza viene valutata registrando tutti gli eventi patologici occorsi durante lo studio, più o meno correlabili al farmaco ("eventi avversi").

- **Studi di fase IV.** Sono studi condotti su vasta casistica tra pazienti che già assumono correntemente il farmaco. Hanno carattere "osservazionale", cioè registrano tutti gli eventi clinici occorsi nella realtà quotidiana: sia quelli ritenuti positivi sia quelli presumibilmente avversi. Questi studi consentono di monitorare continuamente o periodicamente il comportamento del farmaco dopo che è entrato in commercio e nell'uso corrente.

#### Riferimenti bibliografici essenziali

1. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011; 365:1663
2. De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros* 2014; 13:674
3. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015; 373:220
4. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, et al. Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* 2017; 377:2013
5. Rowe SM, Daines C, Ringhausen FC, et al. Tezacaftor-ivacaftor in residual-function heterozygotes with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2017; 377:2014
6. Davies J, Sheridan H, Bell N, et al. Assessment of clinical response to ivacaftor with lung clearance index in cystic fibrosis patients with a G551D-CFTR mutation and preserved spirometry: a randomized controlled trial. *Lancet Respir Med* 2013; 1:630
7. Bessonova L, Volkova N, Higgins M, et al. Data from the US and UK cystic fibrosis registries support disease modification by CFTR modulation with ivacaftor. *Thorax* 2018; 73:731
8. Jennnings MT, Dezube R, Paranjape S, et al. An observational study of outcome and tolerance in patients with cystic fibrosis initiated on lumacaftor/ivacaftor. *Ann Am Thorac Soc* 2017; 14:1662
9. Hubert D, Chiron R, Camara B, et al. Real-life initiation of lumacaftor/ivacaftor combination in adults with cystic fibrosis homozygous for the Phe508del CFTR mutation and severe lung disease. *J Cyst Fibros* 2017; 16:388
10. Quon BS, Rowe SM. New emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ* 2016; 352:i859
11. Pranke IM, Hatton A, Simonin J, et al. Correction of CFTR function in nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients predicts improvement of respiratory function by CFTR modulators. *Scientific Reports* 2017; 7:7375 (doi:10.1038/s41598-017-07504-1)



## La fibrosi cistica che cambia: il contributo della ricerca FFC

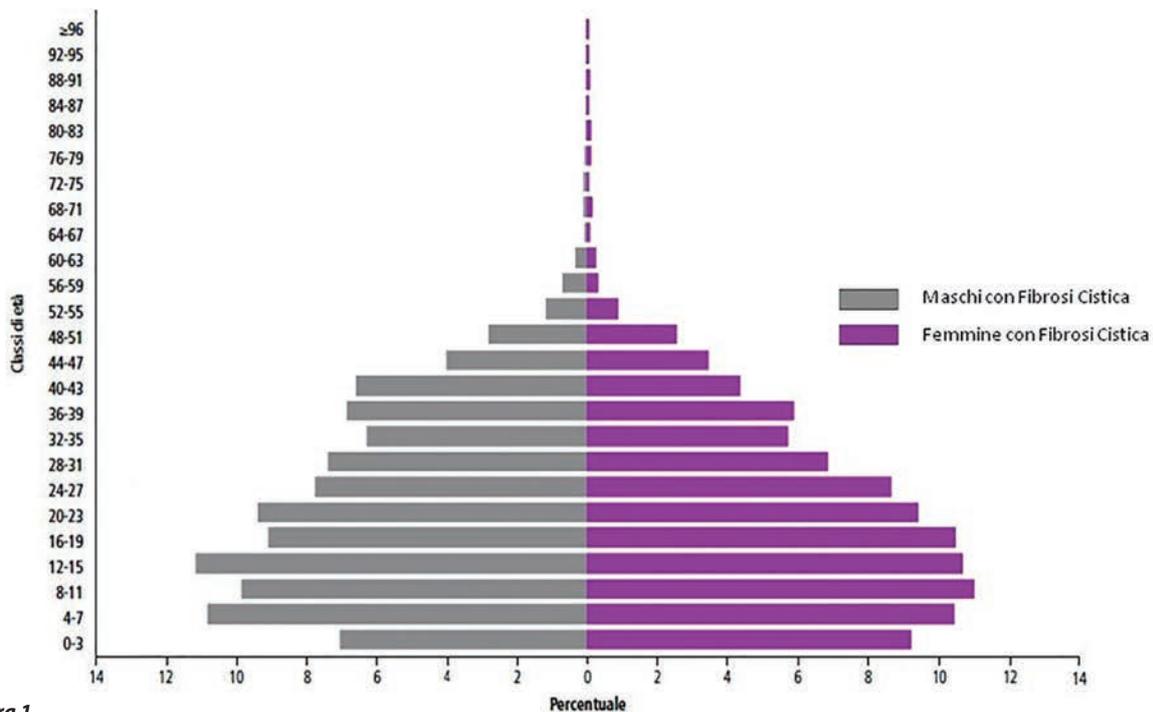
**Graziella Borgo**

Vicedirettore Scientifico Fondazione Ricerca FC

La fibrosi cistica è malattia notevolmente cambiata nel corso dell'ultimo ventennio e cambierà ancor più in futuro. Succede in tutti i paesi che godono di buone condizioni socio-sanitarie: i malati vivono più a lungo e soprattutto arrivano in migliori condizioni alla vita adulta. I dati 2016 del Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC) indicano che il numero degli adulti con FC ha superato quello dei bambini e la metà di loro è in buone condizioni di salute. E da meno di un decennio ha fatto irruzione nel panorama delle terapie la possibilità di intervenire farmacologicamente sulla proteina CFTR mutata alla base della malattia, introducendo un'innovazione quale mai si era verificata prima, al punto che si parla dell'inizio di una "nuova era" per la fibrosi cistica, quella dei farmaci "modulatori" della proteina CFTR (**Figura 1**)

### La piramide dell'età

Registro Italiano Fibrosi Cistica - Rapporto 2011-2014



**Figura 1**

La figura rappresenta in forma di piramide la distribuzione percentuale della popolazione dei soggetti con fibrosi cistica registrati nel Registro Italiano Fibrosi Cistica: nel 2014 il totale della popolazione è costituito da 4981 soggetti. Nella retta verticale a sinistra si leggono le classi d'età, nella retta orizzontale la percentuale. Complessivamente i soggetti che hanno più di 18 anni rappresentano il 57% dell'intera popolazione. (Dati e grafico tratti da "RIFC-Rapporto 2011-2014")

Per questa Fondazione è importante fare un bilancio e documentare se e come ha portato contributi orientati a questo cambiamento. Passerò quindi in rassegna le linee di ricerca che FFC ha tracciato e che raccolgono i progetti proposti dai ricercatori attraverso il bando annuale: 1) Difetto di base e nuove terapie per CFTR difettosa; 2) Genetica e Modelli Biologici; 3) Infezione polmonare; 4) Infiammazione; 5) Ricerca clinica (**Figura 2**). Nell'ambito di ciascuna area selezionerò alcuni progetti, scegliendo quelli che ho ritenuto di particolare impatto rispetto alle finalità divulgative di questo Seminario. Non sarà quindi una panoramica esaustiva della produzione scientifica FFC, ma la messa in risalto di progetti di ricerca che a mio parere nel corso degli anni 2002-2018 hanno rispecchiato alcuni problemi della malattia e hanno contribuito ad orientarne la soluzione.

RICERCA FFC 2002-2018	
366 Progetti	
Aree di Ricerca	progetti
Difetto di base e nuove terapie CFTR	116
Genetica e modelli biologici	25
Infezione polmonare	102
Infiammazione	79
Ricerca clinica	44

Figura 2

## Ricerca clinica

Partirò dall'area della ricerca clinica, descrivendo due progetti importanti per la loro valenza socio-sanitaria. Non c'è dubbio che uno dei fattori che ha inciso sul cambiamento della malattia è stato la possibilità di diagnosticarla precocemente, ancora prima della comparsa dei sintomi, una rivoluzione silenziosa realizzata attraverso lo screening neonatale, introdotto nel Veneto, prima regione in Italia e fra le prime nel mondo, dal centro FC di Verona nel 1973. Il progetto FFC#23/2010 ha fatto il punto su questa rivoluzione: aveva l'obiettivo di registrare e valutare sotto vari aspetti i comportamenti operativi dell'attività di screening neonatale per fibrosi cistica messa in atto fino a quel momento. L'anno preso in considerazione era il 2009 e lo screening raggiungeva allora circa il 78% di tutti i neonati italiani, con un valore mediano dell'età di diagnosi pari a 56 giorni. Oggi i dati del RIFC dicono che i bambini di età compresa fra 0 e 2 anni non sottoposti a screening neonatale sono diminuiti dal 23% del 2011 al 13% del 2014, grazie all'aumentata attivazione di programmi regionali.

### Miglioramento delle procedure dello screening neonatale

Sono programmi nel complesso ben funzionanti, anche se presentano ancora aree di miglioramento, tra le quali una certa disomogeneità delle procedure. In anni recenti si registra un problema rappresentato dall'alto numero di neonati che rimangono con una diagnosi incerta. Un uso improprio del test genetico, associato al test enzimatico, che è alla base dello screening, ne è la causa principale. Quest'argomento è affrontato dal nuovo progetto di ricerca clinica, collaborativo fra vari centri FC italiani, FFC#30/2018.

L'applicazione dello screening neonatale permette di conoscere il numero dei bambini che ogni anno in Italia nascono con la fibrosi cistica (nel 2016 sono stati 153). È solo conoscendo il numero degli affetti dalla malattia che si può, attraverso una formula di statistica genetica, risalire al numero dei portatori sani. Infatti mancano ricerche nella popolazione generale (sia in Italia che altrove) della frequenza del portatore diagnosticato attraverso test genetico. Quindi la frequenza di 1 portatore ogni 25 persone che viene usata correntemente è una ragionevole stima (basata sull'assunzione di un'incidenza media della malattia pari a 1 nato malato su 2500 nati), e non un dato ricavato da esperienze dirette di ricerca. In Italia, per identificare il portatore di fibrosi cistica è necessario un test genetico che indaghi un ampio numero di mutazioni CFTR, perché la popolazione è caratterizzata da elevata eterogeneità genetica, che comporta anche notevole diversità di mutazioni CFTR. Il progetto FFC#7/2004 ha contribuito a creare una mappa delle mutazioni FC in Italia, in modo che, unitamente ai dati del RIFC, è stato più facile allestire test genetici adatti alle indagini di popolazione, su scala regionale prima e nazionale poi. Con un test accurato, basato su

oltre 40 mutazioni, FFC ha finanziato due progetti-pilota di screening del portatore nella popolazione generale del Veneto-Est (FFC#8/2011 e FFC#26/2015). Questa regione è stata così oggetto di un'esperienza unica in Italia e molto rara a livello internazionale. Nel periodo 1993-2017 in quest'area sono stati eseguiti oltre 200.000 test e diagnosticati più di 7.000 soggetti portatori di fibrosi cistica. Gli studi hanno mostrato che quanto maggiore è il numero di soggetti sottoposti ai test per il portatore, tanto minore risulta l'incidenza dei nati malati. In particolare hanno indicato che, quando il test è attivamente offerto, i nati malati diminuiscono, ma riprendono a crescere quando la promozione del test si fa più debole (nel 2008, anno in cui è stato massimo il numero di coppie di portatori identificate, l'incidenza della malattia è scesa a un minimo storico e poi è risalita progressivamente). Queste ricerche non hanno portato informazioni su quali siano state le scelte riproduttive delle coppie di portatori e quindi la ragione della diminuzione del numero dei nati affetti, argomento complesso, delicato e difficile da indagare per vari motivi: rimane un'area di ricerca ancora aperta.

*Promozione dello screening del portatore di fibrosi cistica*

Venendo a progetti di più immediato interesse clinico, ne scelgo uno che riguarda il trapianto polmonare. Nel 2016 sono stati 46 i malati FC trapiantati in Italia (dati RIFC 2016) e, sempre in quest'anno, 2.314 erano i soggetti trapiantati viventi in Europa. Il trapianto polmonare è dunque oggi una realtà terapeutica fondamentale nel caso in cui la malattia sia progredita verso lo stato di insufficienza respiratoria intrattabile. Sul trapianto polmonare, FFC ha finanziato più di un progetto, ma cito FFC#24/2017 perché rappresenta nel panorama internazionale la prima esperienza controllata di applicazione di "fotoferesi extracorporea" come terapia d'induzione per prevenire il rigetto acuto dell'organo.

*Prevenzione del rigetto nel trapianto polmonare con fotoferesi extracorporea*

Questo progetto è realizzato presso il centro trapianti di Milano e sfrutta una speciale macchina in grado di separare la parte corpuscolata (vale a dire le cellule) dalla parte liquida del sangue del soggetto ricevente. Fra le cellule ci sono i linfociti, responsabili della risposta immunitaria, che vengono trattati con un farmaco fotosensibilizzante (tale da renderli sensibili alla luce) e poi esposti a una luce con lunghezza d'onda particolare. Il risultato è una modificazione di queste cellule che, una volta reinfuse, dovrebbero diventare più tolleranti nei confronti dell'organo trapiantato e quindi non sviluppare il rigetto. Il procedimento è già usato per prevenire il rigetto nel trapianto di midollo, non ci sono ancora esperienze pubblicate in FC. Il progetto dovrebbe concludersi quest'anno e ci auguriamo porti buone novità (**Figura 3**)



**Figura 3**  
Trapianto polmonare (Progetto FFC#24/2017)  
*Fotoferesi extracorporea per prevenire il rigetto acuto di trapianto polmonare*

## Infezione polmonare

Nel campo dell'infezione polmonare, i primi anni 2000 rendono evidente la centralità del batterio *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) nella malattia polmonare FC: sono anni in cui si cercano le ragioni della sua facilità all'impianto cronico, e la sua provenienza. Come in altre patologie (ad esempio nelle persone con immunodepressione) il sospetto era che una fonte di contagio fosse il centro di cura dove si verifica sempre gran passaggio e concentrazione di malati. Ma la possibilità di distinguere con molta precisione, usando nuove tecniche di genetica molecolare,

*Diffusione delle misure di prevenzione della trasmissione batterica fra persone con FC*

i ceppi di Pa ha fatto capire che il contagio avveniva soprattutto fra malato e malato (Progetto FFC#8/2005). In quegli anni a livello internazionale sono state formulate le prime raccomandazioni per scoraggiare le persone con FC a stare a lungo insieme, cosa che fino a pochi anni prima era invece promossa, sostenendo l'utilità di iniziative di socializzazione tra malati.

Venne pubblicata un'esperienza importante che indicava senza dubbi come la trasmissione di Pa avvenisse durante un campeggio estivo di ragazzi con FC. Stando così le cose, ecco il progetto FFC#16/2007, che aveva uno scopo molto pratico, stabilire quale era la distanza di sicurezza da tenere tra persone con FC per contenere il rischio di trasmissione del batterio. Si parlava fino allora genericamente di "1 metro": lo studio dimostrò che non era sufficiente, perché Pa si trasmetteva anche oltre 1 metro di distanza. Da qui il titolo del recente film "A due metri da te". Vari studi successivi hanno portato, alla fine del 2014, alle linee-guida internazionali molto precise sull'opportunità della "segregazione" (orribile termine perché in italiano evoca più il carcere che la separazione) delle persone con FC, pratica che numerosi studi successivi hanno confermato come molto efficace per prevenire la trasmissione di batteri multiresistenti.

Conosciuta la contagiosità e la facilità all'impianto cronico del batterio, numerosi progetti FFC si sono dedicati a sperimentare in Italia strategie terapeutiche che permettessero di aggredirlo alla prima comparsa in modo da eradicarlo o ritardare l'epoca della sua cronicizzazione. I progetti FFC#18/2004,

---

### *Protocolli antibiotici condivisi fra i centri di cura italiani per l'eradicazione di batteri*

---

FFC#17/2007 e FFC#30/2015 hanno definito protocolli antibiotici che sono entrati in varia misura nell'uso clinico corrente. Va a questi progetti il merito di aver esplorato la fattibilità nella realtà italiana dei nuovi protocolli e aver orientato i centri di cura all'avanzamento e all'omogeneità dei comportamenti terapeutici nei confronti di Pa.

Oltre a sperimentare protocolli con antibiotici già in uso ci vorrebbero antibiotici nuovi: per avere nuove armi contro Pa bisogna conoscere meglio il batterio. Ecco quindi studi importanti, come ad esempio FFC#10/2007, che hanno portato nuove conoscenze sulla sua aggressività e resistenza agli antibiotici. Sono stati indagati i fattori che regolano il "biofilm" (la pellicola protettiva in cui Pa si avvolge e resiste) e il "quorum sensing", il linguaggio mediato da proteine, che permette al batterio di riconoscersi, "richiamarsi" e aggregarsi in colonie avvolte dal biofilm. Ne sono derivati progetti orientati a individuare nuovi composti con azione antibatterica. Un filone molto battuto dalla ricerca FFC in quest'ambito è quello dei peptidi antibatterici: i peptidi sono corti frammenti di proteine di origine naturale o prodotti per sintesi chimica. Ad oggi un antibiotico di questa famiglia molto usato è la colimicina (nome commerciale Colistina) che è una miscela di polipeptidi con particolare struttura chimica ("ciclica"). Ora, un nuovo peptide (brevetto depositato), derivato dalla pelle della rana e identificato da progetti FFC (FFC#14/2011, FFC#11/2014, FFC#15/2017) è arrivato alla fase dei primi saggi

---

### *Ricerca di nuovi antibiotici e di nuove strategie*

---

su modelli murini. Dal filone della ricerca sui peptidi antimicrobici sembra emergere un loro ruolo di molecole a supporto dell'azione degli antibiotici tradizionali: ne risulterebbe possibile in definitiva una combinazione "antibiotico+ peptide", dotata di maggiore potenza antiinfettiva.

Anche molecole di altra derivazione si pongono come coadiuvanti degli antibiotici tradizionali: è il caso del gallio, un metallo atossico che si trova in natura associato allo zinco, che è già usato come strumento diagnostico in medicina. I batteri come Pa si nutrono di ferro: scambiano il gallio per il ferro, ma per loro il gallio è un veleno e rappresenta un'esca letale. In sostanza, se non è possibile uccidere del tutto i batteri con l'antibiotico, si possono nutrire con il veleno (FFC#21/2015, FFC#18/2017) (**Figura 4**). Nei progetti FFC il gallio andrebbe somministrato per via aerosolica, mentre un trial clinico di fase II supportato dalla Fondazione americana lo sta sperimentando per via endovenosa. C'è anche come via innovativa la terapia con "batteriofagi", virus che infettano i batteri, già molto usati nei paesi dell'Est Europa, arrivati a dimostrare, con il progetto FFC#22/2017, buona efficacia su modello animale. I risultati ottenuti sono incoraggianti verso altri studi che approdino alla sperimentazione clinica.



**Figura 4**

**Il Gallio come nuovo antibatterico ad ampio spettro** (Progetti FFC#21/2015, FFC#18/2017)

*Il Gallio è un metallo atossico, già usato in medicina per altri scopi, che risulta dannoso per i batteri e agisce come coadiuvante degli antibiotici tradizionali.*

## **Infiammazione polmonare**

Sappiamo che l'infiammazione, una reazione fisiologica finalizzata alle difese dell'organismo, è una condizione attiva molto precoce e subdola nei soggetti con FC: essa precede addirittura l'infezione batterica, che a sua volta la potenzia. L'infiammazione FC è sregolata ed eccessiva, non si autolimita e si pensa sia connessa direttamente al difetto della proteina CFTR. In questo senso la ricerca FFC ha portato prove di questa particolare connessione: i monociti FC, un tipo di globuli bianchi, sono risultati difettosi nella capacità di adesione e migrazione, azione indispensabile per le difese di prima linea (Progetto FFC#26/2011). Comunque, una panoramica dei progetti FFC sull'infiammazione ci permette di dire che nel tempo c'è stata la tendenza a spostarsi dallo studio dei meccanismi a quello dell'individuazione di bersagli per nuovi farmaci antinfiammatori. Per abbreviare i tempi del percorso di ricerca, in particolare i progetti FFC hanno esplorato il campo del "riposizionamento", vale a dire lo studio in FC di farmaci già in uso per altre patologie.

*Il riposizionamento in fibrosi cistica di composti con effetto antinfiammatorio già in uso in altre patologie*

Vari progetti, confluiti nel più recente FFC#23/2018, rappresentano bene l'evoluzione del percorso di ricerca. Infatti, partendo dallo studio della composizione della membrana cellulare i ricercatori ne hanno individuato alcuni lipidi costituenti, gli sfingolipidi, importanti nella risposta infiammatoria. Da queste conoscenze sono approdati a due composti, il miglustat e il betasistosterolo. Il primo, con il nome di Zavesca, è già in uso in una grave malattia genetica come il morbo di Gaucher, l'altro è un composto di origine vegetale in commercio per controllare il colesterolo. Di entrambi è stata dimostrata l'efficacia in vitro e in vivo su modelli animali con FC (FFC#23/2018).

Anche un altro composto antinfiammatorio, la trimetilangelicina (TMA) è di origine vegetale, derivando da una pianta (il nome inglese è *Aegle marmelos*, in italiano "mela di legno") diffusa nel Medio Oriente e in India. Attraverso vari progetti, alla molecola originale sono stati tolti gli effetti sfavorevoli (in particolare la fototossicità) e potenziati gli effetti antinfiammatori, dimostrati su modelli animali e su cellule epiteliali primarie FC. È molecola con brevetto depositato, riconosciuta dalla Commissione Europea come farmaco orfano (FFC#8/2014). Invece è una molecola prodotta naturalmente dal nostro corpo la Resolvina, un composto lipidico che appartiene alla famiglia degli acidi grassi Omega3, che i ricercatori hanno dimostrato agire come potente mediatore chimico naturale contro l'infiammazione e uno stimolatore delle difese contro i batteri patogeni (FFC#21/2014, FFC #19/2016). È stata sperimentata con successo in vitro e in vivo in modelli di topi FC.

La partita della ricerca di un antinfiammatorio alternativo al cortisone è ancora tutta aperta: lo testimoniano i trial clinici di fase II in corso, sostenuti da Fondazione americana, con molecole finora sconosciute, come Acebilustat e Lenabasum.

## Servizi alla ricerca centralizzati e nuovi modelli biologici

Le aree di ricerca dell'infezione polmonare e dell'infiammazione, come quella riguardante il difetto di base, si avvantaggiano dei Servizi alla ricerca, unità centralizzate che FFC sostiene per mettere a disposizione competenze tecniche e materiale per i laboratori dei ricercatori che ne fossero carenti. I Servizi attualmente attivi sono tre, rappresentano una risorsa importante per i ricercatori ed esprimono l'attenzione di FFC alla creazione di una rete di ricerca. 1) Servizio Colture Primarie (SCP): è una biobanca di colture cellulari derivate da epitelio bronchiale di polmoni espianati da soggetti con FC sottoposti a trapianto polmonare. 2) Servizio per modelli animali (CFaCore): supporta tecnicamente progetti FFC che prevedono studi preclinici in vivo. 3) Cystic Fibrosis Database (CFDB): una banca dati online contenente tutti gli studi clinici FC. Altre prospettive sono aperte, come quella di allestire strutture centralizzate che sfruttino i modelli biologici di malattia più recenti (organoidi) per il saggio della risposta individuale ai farmaci.

Spunti estremamente innovativi in questo senso vengono anche dal Progetto FFC#8/2017. In questo progetto l'ingegneria dei tessuti, la scienza che si propone di ricreare tessuti e organi sani, e anche di mettere a punto modelli artificiali di tessuti/organi in cui sia riprodotta una malattia, studia la costruzione di microdispositivo, denominato *microfluidic chip*. È una sorta di modello di tessuto bronchiale semiartificiale con caratteristiche molto simili a quelle del malato FC, utile sia per studiare la patofisiologia della malattia sia per testare nuove strategie terapeutiche (Figura 5).

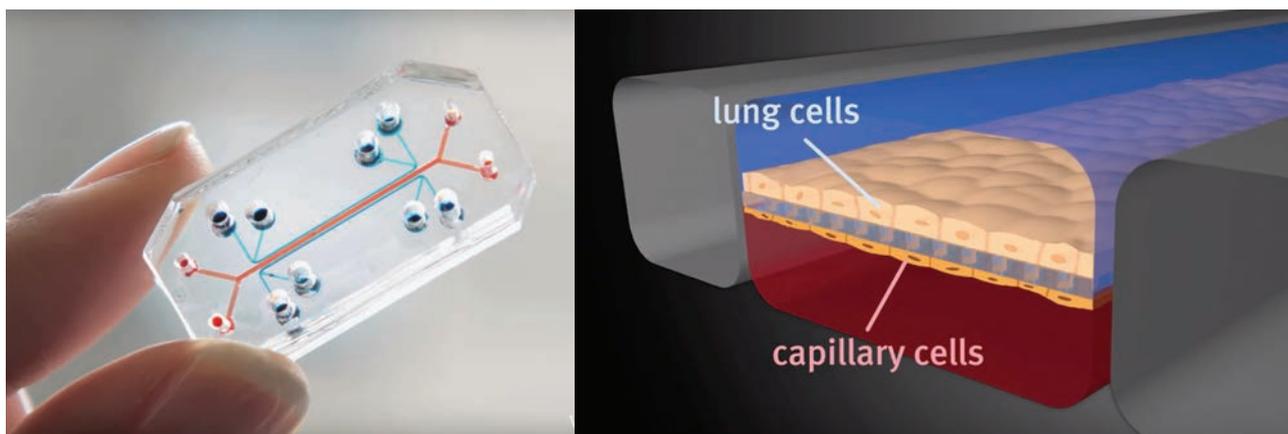


Figura 5

### Il polmone FC in un chip (Progetto FFC#8/2017)

*I ricercatori creeranno in vitro tessuto connettivo polmonare adatto all'insediamento di cellule epiteliali bronchiali di pazienti FC. Queste cellule saranno indotte a proliferare in modo tale da rappresentare fedelmente la composizione e l'organizzazione in vivo dell'epitelio di un bronco FC. Il tutto viene contenuto in un microdispositivo "microfluidic cheap" che risponde a stimoli biologici o farmacologici.*

## Difetto di base e terapie per CFTR difettosa

Ho tenuto per ultima questa, che è l'area in cui FFC ha maggiormente investito e lo stesso intende fare in futuro: ritengo infatti che possa esemplificare al meglio il modo di intendere la ricerca come un percorso che va dallo studio e dalla produzione di conoscenze all'utilizzo di queste per la messa a punto di nuove terapie. Per scoprire nuove terapie per la proteina CFTR geneticamente mutata era importante conoscere la struttura di CFTR e il suo funzionamento come canale per gli ioni cloruro e bicarbonato; inoltre, per indagare dove si localizza il difetto a seconda della mutazione

*Conoscere la struttura della proteina CFTR per scoprire nuove molecole per trattarla*

in causa, e quali potrebbero essere i siti di legame utili per i farmaci, diversi a seconda della mutazione. La ricerca ha fatto ricorso a varie tecniche, fra cui alcune molto raffinate che hanno unito bioinformatica strutturale, dinamica molecolare e strumenti avanzatissimi come il sincrotrone (acceleratore di particelle subatomiche).

La proteina CFTR è apparsa in movimento, nella sua fase di apertura e chiusura del canale che rappresenta (FFC#4/2012, FFC#4/2014, FFC# 8/2016). I ricercatori si sono poi spostati a indagare come interagisce CFTR con le altre proteine all'interno della cellula, nel fitto contesto di segnali e controsegnali che regolano il suo *trafficking* (percorso) dal nucleo, in cui inizia la sua storia, alla membrana apicale della cellula (FFC #1/2008). Questi studi hanno contribuito, a livello internazionale, alla scoperta dapprima dei potenziatori, che agiscono quando CFTR è sulla membrana cellulare, e poi dei correttori, che agiscono sui processi di maturazione di CFTR. Tutto questo insieme di conoscenze è confluito nel progetto *Task Force for Cystic Fibrosis* (TFCF), una via della ricerca italiana per la correzione di CFTR mutata per effetto della più frequente mutazione F508del.

## Prospettive

Per il futuro la ricerca FFC per nuove terapie del difetto di base si muove su tre grandi fronti:

1) Nuovi farmaci per "modulare" CFTR difettosa entrando nella composizione di associazioni farmacologiche polivalenti. In questo senso vanno alcuni progetti selezionati nel 2018, presentati alla Conferenza NordAmericana di Denver, dove hanno riscosso molto interesse: sono composti che possono entrare nella composizione di quella politerapia prevista come arma vincente per il trattamento farmacologico del difetto mutazionale, in associazione ai correttori e potenziatori già in commercio. Fra questi il ganglioside GM1 (progetto FFC#2/2018) che è uno "stabilizzatore" di CFTR-F508del sulla membrana cellulare (CFTR quando è difettosa tende a essere instabile e quindi a durare poco); si tratta di un composto già in uso per altre patologie (neurodegenerative in particolare). Inoltre il peptide sintetico PI3Kgamma (progetti FFC#25/2014, FFC#2/2015, FFC#11/2017), con particolare doppia efficacia su F508del, sia come potenziatore che come correttore (brevetto depositato).

*Trovare modulatori di CFTR mutata migliori di quelli già disponibili o composti che li rendano più efficaci*

2) Il secondo obiettivo è trovare trattamenti per mutazioni diverse da F508del, in particolare per le mutazioni stop (la mutazione G542X è la terza per frequenza in Italia). Qui si stanno seguendo due strade, che sono quelle battute anche a livello internazionale: la prima mira a trovare il modo di riavviare la sintesi della proteina che è interrotta dalla mutazione. Un composto con queste caratteristiche chiamato ELX-02 entrerà in un trial di fase II, sostenuto dall'*European Cystic Fibrosis Society-Clinical Trial Network* (ECFS-CTN). La ricerca FFC sta sostenendo un altro composto con proprietà analoghe chiamato NXV (FFC#3/2017 in corso, brevetto depositato). La seconda strada esplora la nuova versione della terapia genica, l'editing (modifica) genomico e, nel caso delle mutazioni stop, questa via si propone di correggere non il DNA del gene, ma il messaggio inviato dal gene attraverso una copia di sé stesso (RNA messaggero) (progetto FFC#5/2018).

3) Il terzo obiettivo FFC è scoprire terapie per CFTR mutata che siano indipendenti dal tipo di mutazione. Su questo fronte, FFC intende tener presente la particolare realtà italiana, dove la frequenza della mutazione F508del è più bassa che altrove e porta a un numero complessivamente più basso di soggetti con doppia o singola copia di F508del, mentre invece è elevata la presenza di mutazioni "altre" (32% sul totale in Italia, rispetto al 18% in Europa, dati da Registro Europeo 2016). Per queste "altre" mutazioni vi è discreta presenza di soggetti con mutazioni con funzione residua, trattabili con il potenziatore Ivacaftor (16% del totale dei malati), ma anche di mutazioni che ancora oggi non hanno prospettive di trattamento farmacologico.

Per queste, è necessario pensare a terapie alternative. A tale riguardo è bene ricordare che nel bagaglio di conoscenze che i ricercatori FFC hanno accumulato nel corso degli anni vi sono scoperte che non hanno ancora trovato pieno sfruttamento, per esempio quella della proteina TMEM16A, che ha meritato di essere pubblicata sulla prestigiosa rivista "Science". TMEM16A è un canale di riserva della cellula per il trasporto dello ione cloruro e potrebbe essere attivata/potenziata nelle cellule FC, per supplire al difetto di CFTR. Ricerche venute dopo la sua scoperta ne hanno confermato la potenziale importanza come bersaglio terapeutico alternativo (FFC#2/2012).

Un altro approccio mutazione-indipendente è la terapia genica. Qui dobbiamo citare che alcuni gruppi di ricerca, inglesi in particolare (*UK CysticFibrosis Gene Therapy Consortium*) stanno investendo tuttora nella forma tradizionale di terapia genica basata sul trasferimento, attraverso speciali vettori, di una copia di gene normale alle cellule epiteliali FC. Ma la forma più nuova di terapia genica è chiamata "editing genetico" (**Figura 6**), realizzata con tecnica CRISPR/Cas9 o analoghe, vale a dire con un sistema di proteine/enzimi "taglia e incolla" che viene introdotto nella cellula e può modificare direttamente il DNA che compone il gene (*DNA editing*) o il messaggero del gene

*Cercare nuovi approcci terapeutici, validi per tutte le mutazioni*

(RNA messaggero e quindi *RNA editing*). Siamo ancora ai primi passi, a livello d'interessanti studi di laboratorio su modelli cellulari. FFC ha in corso due progetti, uno con DNA editing per mutazioni splicing (FFC#1/2017) e un altro con RNA editing per mutazioni stop (FFC#5/2018).



**Figura 6**

**Nuove terapie per il difetto di base indipendenti dal tipo di mutazione CFTR**

(Progetti FFC#1/2017, FFC# 5/2018)

**Applicazione delle tecniche di Gene editing correggendo il DNA del gene o il suo messaggio (RNA messaggero)**

La ricerca d'interventi terapeutici basati su DNA o RNA editing avrà certamente tempi più lunghi rispetto a quella che ha portato, in tempi sorprendentemente brevi, ai modulatori farmacologici della proteina CFTR. Comunque è un'area dove è in atto una notevolissima convergenza d'interessi (accademici, industriali, scientifici in generale). Una sorta di accelerazione che è impressa non solo dalla ricerca FC ma dall'insieme delle malattie genetiche, dato che potrebbe rappresentare una prospettiva per molte di loro. Per esempio, rispetto alla relazione del nostro Seminario sullo stesso argomento un anno fa, l'industria Vertex ha annunciato che una terapia basata su editing genetico con sistema CRISPR/Cas9 per talassemia e anemia falciforme è in fase di sperimentazione clinica

*Migliorare le tecniche di gene editing*

inizialissima (Trial di fase 1).

Inoltre, nel febbraio 2019 è stato avviato un grande progetto europeo (durata 5 anni, finanziamento di 15 milioni di euro, titolo "UPGRADE: *Unlocking Precision Gene Therapy*"). Ha come obiettivo quello di risolvere due punti deboli della tecnica: individuare il vettore ottimale per trasportare il sistema taglia-incolla all'interno della cellula e ottenere la precisione di taglio del materiale genetico. Non possiamo dire se a questa fase di accelerazione corrisponda in tempi brevi una maggior possibilità di risultato. Comunque FFC c'è e darà il suo contributo. Non è questione di ottimismo o di pessimismo ma di realismo nel valutare che le basi scientifiche su cui ci si muove sono per ora molto promettenti.

A commento finale, si può dire che in generale oggi le malattie genetiche sono guardate con più interesse dalle industrie farmaceutiche. Inoltre, sono state approntate varie misure negli USA e in Europa per aiutare lo sviluppo dei cosiddetti "farmaci orfani" (*orphan drugs*), cioè farmaci per malattie relativamente rare. Queste particolari misure possono effettivamente attrarre l'interesse e favorire il coinvolgimento delle grandi aziende nello sviluppo di un farmaco. L'interesse industriale può essere facilitato se la molecola scoperta è stata brevettata e sono 16 i brevetti depositati che

riguardano composti derivati da progetti FFC, che partecipa a 6 di questi. Indipendentemente dall'approdo alla brevettazione, secondo la visione per cui il ruolo di FFC è soprattutto quello di produrre conoscenze, ogni progetto di ricerca, purchè rigorosamente selezionato e condotto, rappresenta un mattone del ponte ideale fra la ricerca e la cura. FFC ha comunque in previsione un affinamento delle strategie di ricerca che tengano conto dell'urgenza e dell'accelerazione dei tempi attuali. Per farlo dovrà affrontare una nuova sfida: continuare a fare "la buona ricerca", come ha detto Giorgio Berton, presidente del Comitato Scientifico FFC, e nello stesso tempo orientarla a conoscenze che possono risultare più vicine alla trasferibilità nella pratica clinica.

#### **Riferimenti bibliografici essenziali**

1. Bossi A, Casazza G, Padoan R, Milani S; Assemblée Dei Direttori Dei Centri HumBiol. 2004 Jun; 76(3):455-67 "What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the National Registry (1988-2001)" Hum Biol. 2004 Jun; 76(3):455-67
2. [http://www.registroitalianofibrosicistica.it/documenti/servizi/rifc\\_2018.pdf](http://www.registroitalianofibrosicistica.it/documenti/servizi/rifc_2018.pdf)
3. *Epidemiol Prev* 2018;42(1) Suppl 1:1-32.
4. Brimicombe RW, Dijkshoorn L, Van der Reijden TJ et al. Transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis attending summer camps in the Netherlands. *J Cyst Fibros* 2008 Jan;7 (1):30-6
5. Saiman L, Siegel JD, LiPuma JJ; Cystic Fibrosis Foundation; Society for Healthcare Epidemiology of America. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Aug;35
6. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*. 2015 Jul;14(4):419-30.
7. Smith WD, Bardin E, Cameron L et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Aug 1;364(14)
8. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol*. 2019 Feb 27;10:121

# Dati essenziali su attività di Ricerca FFC dal 2002 al 2018



Figure 1 e 2.

I progetti FFC sono rivolti a 5 aree (o linee) di ricerca: 1) correzione del difetto genetico e nuove terapie per CFTR difettosa; 2) genetica e modelli biologici; 3) nuove strategie per l'infezione polmonare; 4) infiammazione polmonare; 5) studi clinici ed epidemiologici.

I Servizi alla ricerca (facilities) sono strutture centralizzate sostenute da FFC per supporto ai progetti di rete FFC. Attualmente operativi sono: 1) Servizio per i modelli animali "CFaCore"; 2) Servizio "Colture Primarie" (SCP), colture di cellule epiteliali derivate da polmoni FC espianati; 3) Cystic Fibrosis Database (CFDB), database on line di tutti gli studi clinici FC su base internazionale.

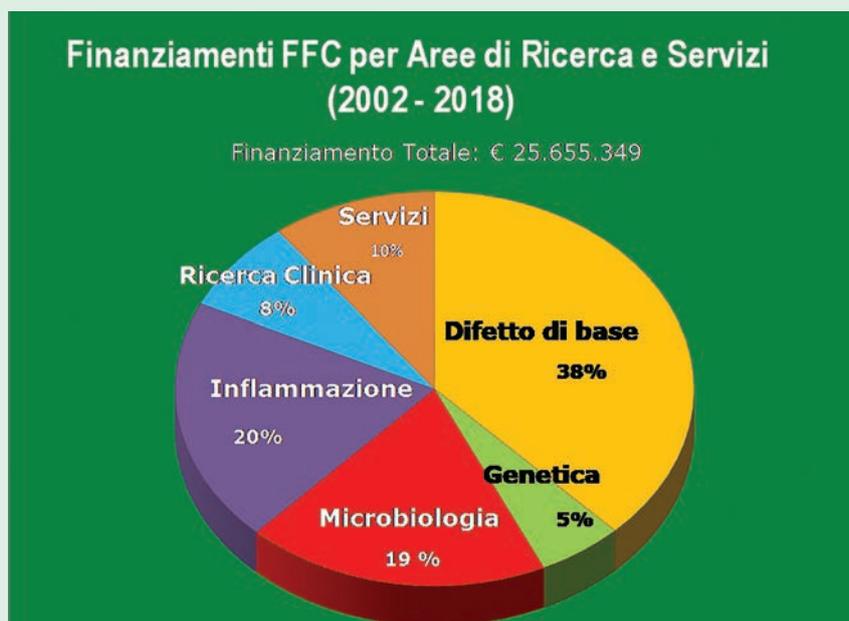


Figura 3. Supporto economico della Fondazione ai 366 progetti selezionati e a 4 Servizi di ricerca in 17 anni (il 4° Servizio, "QuantiGENE", fu interrotto nel 2016). Distribuzione percentuale per aree di ricerca.

<b>RICERCA FFC 2002-2018</b>	
<b>366 Progetti</b>	
Aree di Ricerca	progetti
Difetto di base e nuove terapie CFTR	116
Genetica e modelli biologici	25
Infezione polmonare	102
Infiammazione	79
Ricerca clinica	44

Figura 4

**AREA DIFETTO DI BASE E NUOVE TERAPIE CFTR**  
2002-2018

- Struttura CFTR difettosa
- CFTR: interazioni-regolazione-stabilità
- Bersagli terapeutici
- Nuovi correttori e potenziatori
- Task Force CF (TFCF) per F508del
- Gene editing

Figura 5

**AREA INFEZIONE POLMONARE**  
2002-2018

- Studio dei meccanismi: biofilm, quorum sensing, fattori di virulenza
- Trasmissione dei microbi
- Microbioma
- Terapia con Fagi
- Nuovi antibatterici
- Batteri emergenti

Figura 6

**AREA INFIAMMAZIONE**  
2002-2018

- Studio dei meccanismi
- Nuovi bersagli terapeutici
- Trimetilangelicina
- Anakinra
- Sfingolipidi-Miglustat
- Resolvina

Figura 7

**AREA CLINICA**  
2002-2018

- Screening neonatale
- Mappa mutazioni CFTR Italia
- Screening portatore
- Correlazione genotipo sintomi clinici
- Protocolli antibiotici per eradicazione batteri multiresistenti
- Prevenzione trasmissione batteri
- Diabete
- Trapianto polmonare

Figura 8

# Per donare

- Online sul sito: [fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)
- Bonifico Unicredit Banca (senza commissione presso questi sportelli):  
IT 47 A 02008 11718 000102065518
- SWIFT-BIC code (per pagamenti dall'estero) UNCRITM1N58
- Banco BPM: IT 92 H 05034 11708 000000048829
- c/c postale n. 18841379
- 5x1000 alla FFC n. 93100600233

Le donazioni effettuate a favore di Onlus comportano il diritto di usufruire di alcune agevolazioni fiscali, così come previsto dal nostro sistema tributario.  
Per approfondire: [fibrosicisticaricerca.it/sostieni-la-fondazione](http://fibrosicisticaricerca.it/sostieni-la-fondazione) nella sezione benefici fiscali



DONARE CON FIDUCIA

FFC aderisce all'Istituto Italiano della Donazione che ne attesta l'uso trasparente ed efficace dei fondi raccolti, a tutela dei diritti del donatore.



**Presidente**  
MATTEO MARZOTTO



**Direttore Scientifico**  
GIANNI MASTELLA



**Presidente Comitato Scientifico**  
GIORGIO BERTON

### Consiglio di Amministrazione

**Presidente** Matteo Marzotto

**Presidente emerito** Vittoriano Faganelli

**Vicepresidenti** Paolo Faganelli,  
Michele Romano

**Consiglieri** Michele Bauli, Sandro Caffi,  
Francesco Cobello, Paolo Del Debbio,  
Francesco Ernani, Gianni Mastella,  
Donatella Treu, Patrizia Volpato

### Direzione scientifica

**Direttore** Gianni Mastella

**Vicedirettore** Graziella Borgo

### Comitato di consulenza scientifica

**Presidente** Giorgio Berton

**Consulenti** Paolo Bernardi, Paola Bruni,  
Roberto Buzzetti, Carlo Castellani,  
Gian Maria Rossolini

### Presidenza e Segreteria

**(G. Cadoni, F. Lavarini)**

Tel. 045 8123438-7037 – Fax 045 8123568

Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani 1  
37126 Verona

fondazione.ricercafc@aovr.veneto.it

gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it

federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

### Direzione Scientifica (G. Mastella)

Tel. 045 8123567

gianni.mastella@aovr.veneto.it

### Vicedirezione Scientifica (G. Borgo)

Tel. 045 8127027

graziella.borgo@fibrosicisticaricerca.it

**Assistente:** Flaminia Malvezzi

Tel. 339 5740729

flaminia.malvezzi@fibrosicisticaricerca.it

### Direzione di Gestione (G. Zanferrari)

Tel. 045 8127028

giuseppe.zanferrari@fibrosicisticaricerca.it

### Amministrazione (G. Cadoni,

**M. Bergamaschi, M. Giacomuzzi)**

Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025

gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it

michela.bergamaschi@fibrosicisticaricerca.it

marina.giacomuzzi@fibrosicisticaricerca.it

### Comunicazione

**(M. Zanolli, S. Chignola, I. Boarato)**

Tel. 045 8123599 - 7026

comunicazione.ffc@aovr.veneto.it

**Ufficio stampa (P. Adami)**

Tel. 348 3820355

patrizia@clabcomunicazione.it

### Raccolta Fondi e Rapporti con il Territorio

**(F. Cabianca, L. Fratta, G. Buemi,**

**F. Morbioli)**

Tel. 045 8123605 - 7032 - 7033 - 7029

fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it

laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it

giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it

francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it

### Raccolta Fondi Corporate (P. Briigliodoro)

Tel. 045 8127029 - 345 6889589

paolo.briigliodoro@fibrosicisticaricerca.it

### fibrosicisticaricerca.it



**Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica**

**fondazioneffc**

### Delegazioni della Fondazione

Alessandria - Valle Scrivia	347 3095778
Ancona - Fabriano	347 8638704
Ascoli Piceno	320 4792114
Avellino	349 3940749
Bari - Alberobello	329 2113764
Belluno	0437 943360
Bergamo - Trescore Balneario	338 4276716
Bergamo - Villa D'almè	335 8369504
Biella	331 9028525
Bologna	348 1565099
Brescia	030 5233919
Brescia - Franciacorta	340 6589530
Brindisi - Torre	327 2056244
Cagliari - Villasimius	348 7162291
Catania Mascalucia	333 1909983
Catania - Paternò	348 7237760
Catanzaro - Soverato	347 5283975
Cecina e Rosignano	340 6113886
Como - Dongo	334 3081368
Cosenza Nord	349 0519433
Cosenza Sud	347 9041138
Cuneo - Alba	333 6301943
Fermo	339 4758897
Ferrara	347 4468030
Foggia	320 4848190
Genova	348 1634818
Grosseto - Manciano	333 8221877
Imola e Romagna	347 9616369
Latina	328 8042186
Lecce	388 3498587
Lecco Valsassina	338 9993582
Livorno	0586 808093
Lodi	347 0969534
Lucca	340 3436289
Matera Montescaglioso	334 3477508
Messina	349 7109375
Milano	335 456809
Napoli e Pompei	081 679151
Napoli - San Giuseppe Vesuviano	338 7032132
Novara	331 7287449
Olbia	334 6655844
Padova - Monselice	042 974085
Palermo	338 4124077
Parma	0521 386303
Pavia	338 3950152
Pavia - Vigevano	339 2001843
Pesaro	347 0191092
Pescara	347 0502460
Ragusa - Vittoria Siracusa	338 6325645
Reggio Calabria	342 5618929
Reggio Emilia	0522 874720
Roma	339 7744458
Roma - Monterotondo	349 6500536
Roma - Pomezia	349 1538838
Rovigo	349 1252300
Sassari - Castelsardo	338 8437919
Siena	348 5435913
Sondrio - Valchiavenna	333 7063142
Taranto "A Carmen La Gioia"	320 8715264
Taranto - Massafra	329 2025039
Torino	328 8352087
Torino - Rivarolo Canavese	347 9672344
Trapani - Marsala	333 7240122
Treviso - Montebelluna	335 8413296
Treviso - Trevignano	340 6749202
Trieste	349 7246586
Varese	347 8347126
Varese - Tradate Gallarate	347 2441141
Verbania e V.C.O.	338 2328074
Vercelli	335 1264091

Verona	347 8480516
Verona - Bovolone	348 3395278
Verona - Cerea "Il Sorriso di Jenny"	339 4312185
Verona - Lago di Garda	348 7632784
Verona - Boschi Sant'Anna Minerbe	328 7140333
Verona - Val d'Alpone	328 9688473
Verona - Valdadige	340 6750646
Verona - Valpolicella	339 3316451
Vibo Valentia San Costantino Calabro	388 7767773
Vicenza	333 8877053
Viterbo	339 2107950

### Gruppi di sostegno della Fondazione

Agrigento	347 5490769
Alessandria - Acqui Terme	366 1952515
Alessandria - Casale Monferrato	392 6657566
Ancona Falconara	347 3329883
Arezzo	331 3700605
Asti - Moncalvo	339 5819218
Bari - Altamura	334 7295932
Bari - Bitritto	340 1618950
Barletta	0883 519569
Benevento	347 4722532
Bergamo - Isola Bergamasca	349 5002741
Bolzano - Val Badia	0474 520127
Brindisi - Latiano	347 6350915
Cagliari - Isili	388 8925391
Campobasso	346 8744118
Cremona	389 1191703
Cremona - Genivolta	347 9345030
Crotone	340 7784226
Ferrara - Comacchio	339 6511817
Firenze - Reggello	328 7043136
Foggia - Manfredonia	347 5012570
Foggia - San Giovanni Rotondo	340 8789661
Frosinone	320 7277330
Genova "Mamme per la ricerca"	333 4761744
Gorizia - Grado	328 6523404
Imperia	339 5073139
La Spezia - Sarzana "Natalina"	349 7665757
Macerata - Civitanova Marche	349 3746720
Medio Campidano	349 7829841
Messina - Capo D'Orlando	331 9564678
Messina - Tremestieri	328 5541071
Milano - Casarile	339 2055787
Milano - Lainate	348 3807009
Milano - Magenta	339 4887552
Milano - Seregno	338 4848262
Modena - Sassuolo	333 5862932
Napoli - Saviano	339 3185405
Nuoro - Siniscola	320 7953209
Oristano - Riola Sardo	342 5133252
Padova - Urbana	347 0814872
Parma - Fidenza	334 6994359
Perugia - Città di Castello Umbertide	320 9273469
Prato	328 9076797
Ravenna - Faenza	0546 44310
Roma - Vaticano	328 2442701
Rovigo - Adria	377 2077527
Salerno - Golfo di Policastro	328 8660690
Sassari - Alghero	347 8658006
Savona - Spotorno	334 3368141
Siracusa - Melilli	333 2005089
Sondrio - Morbegno	349 6852688
Taormina	347 4222790
Teramo - Martinsicuro	388 9400461
Torino - Chivasso	011 9172055
Torino - Ivrea	335 7716637
Torino - Nichelino	333 2923955
Trento - Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica	340 5228888
Venezia - Mirano	340 1668645
Verona "Rita"	347 6064471



**Fondazione Ricerca  
Fibrosi Cistica - Onlus**  
*italian cystic fibrosis research foundation*

[www.fibrosicisticaricerca.it](http://www.fibrosicisticaricerca.it)

