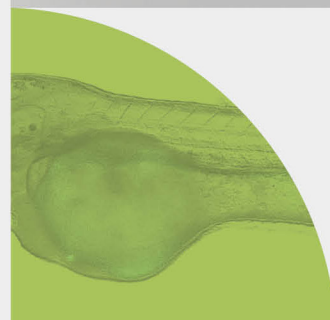
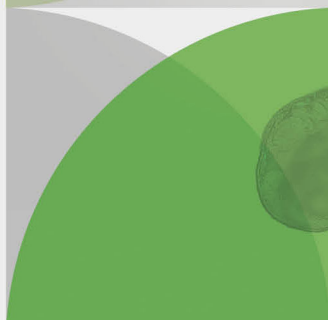
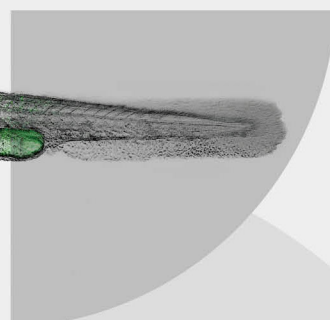
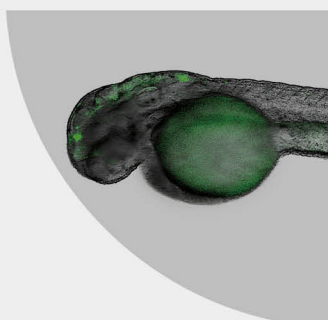


**14-16**  
November  
2024

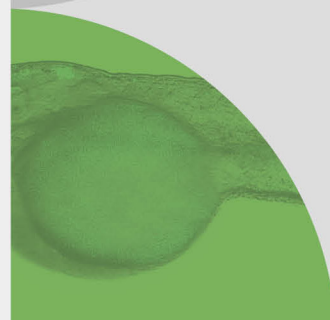
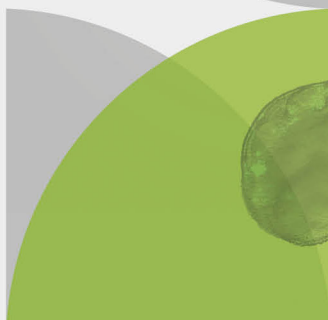


# 22<sup>ND</sup> CONVENTION OF INVESTIGATORS IN CYSTIC FIBROSIS

XXII CONVENTION D'AUTUNNO  
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA



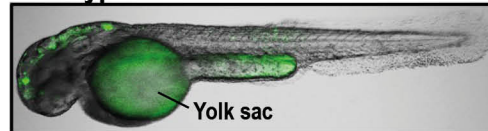
CENTRO  
CONGRESSI  
CAMERA DI  
COMMERCIO  
VERONA



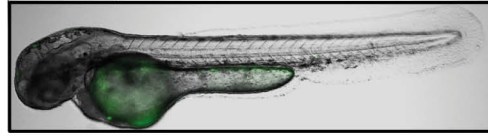
*Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - ETS*  
*italian cystic fibrosis research foundation*

On the cover / In copertina: Zebrafish larvae injected with fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* / Larve di zebrafish in cui è stato iniettato *Pseudomonas aeruginosa* marcato con fluorescenza

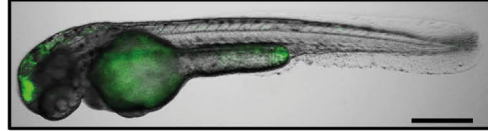
### Wild type



### $\Delta$ DksA1,2



### $\Delta$ DksA1,2::DksA1



**Zebrafish larvae injected with *Pseudomonas aeruginosa*.** Zebrafish (*Danio rerio*) is a small fish used as an animal model in studies concerning cystic fibrosis (CF): its CFTR protein, the protein that is impaired in CF, has a structure that resembles the human one, moreover it is possible to insert mutations on the CFTR gene. The image shows zebrafish larvae, in which CFTR has been inactivated to mimic its impaired function in CF, infected with *Pseudomonas aeruginosa*. The bacterium was used both under normal conditions (wild type) and with a reduction in the expression level of the DskA1 gene ( $\Delta$ DksA1,2), with the aim of testing the role of this gene in the survival of *P. aeruginosa* within macrophages of zebrafish. It was found that intrinsically high expression levels of DskA1 allow the bacterium to exploit the defect present in CF and replicate more in macrophages (first image) compared to experimentally induced lower levels of DskA1 (second and third images).

*P. aeruginosa* was labelled with GFP (Green Fluorescent Protein) and images were taken with the differential interference contrast microscopy.

**Larve di zebrafish in cui è stato iniettato *Pseudomonas aeruginosa*.** Zebrafish (*Danio rerio*) è un piccolo pesce usato come animale modello in studi riguardanti la fibrosi cistica (FC): la sua proteina CFTR, la proteina che è mutata in FC, ha una struttura simile a quella umana ed è inoltre possibile inserire mutazioni sul gene CFTR. L'immagine mostra delle larve di zebrafish, in cui CFTR è stata inattivata per mimare la sua funzione compromessa in FC, infettate con *Pseudomonas aeruginosa*. Il batterio è stato usato sia in condizioni normali (wild type) sia con una riduzione nel livello di espressione del gene DskA1 ( $\Delta$ DksA1,2), con lo scopo di verificare il ruolo di questo gene nella sopravvivenza di *P. aeruginosa* all'interno dei macrofagi di zebrafish. È emerso che i livelli di espressione intrinsecamente elevati di DskA1 permettono al batterio di sfruttare il difetto presente in FC e replicarsi maggiormente nei macrofagi (prima immagine) rispetto alla condizione in cui i livelli di DskA1 sono più bassi (seconda e terza immagine).

*P. aeruginosa* è stato marcato con GFP (Green Fluorescent Protein) e le immagini sono state ottenute con microscopia DIC (Differential Interference Contrast, contrasto interferenziale differenziale).

Weimann A, Dinan AM, Ruis C, Bernut A, Pont S, Brown K, Ryan J, Santos L, Ellison L, Ukor E, Pandurangan AP, Krokowski S, Blundell TL, Welch M, Blane B, Judge K, Bousfield R, Brown N, Bryant JM, Kukavica-Ibrulj I, Rampioni G, Leoni L, Harrison PT, Peacock SJ, Thomson NR, Gauthier J, Fothergill JL, Levesque RC, Parkhill J, Floto RA. *Evolution and host-specific adaptation of Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 385, eadi0908 (2024). [www.science.org/doi/10.1126/science.adi0908](http://www.science.org/doi/10.1126/science.adi0908)

With the patronage of / Con il patrocinio di



AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA INTEGRATA  
VERONA



With the support of / Con il sostegno di



CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO  
AGRICOLTURA VERONA

Editorial staff / Redazione

Alessandra Ria, Luisa Alessio, Federica Lavarini, Ermanno Rizzi

Graphics and layout / Grafica e impaginazione

Porpora ADV di Michela Chesini  
Chiara Maccaferri

Cover image / Foto di copertina

From Aaron Weimann *et al.*, *Evolution and host-specific adaptation of Pseudomonas aeruginosa*.

*Science* 385, eadi0908 (2024). DOI:10.1126/science.adi0908, Reprinted with permission from AAAS, (courtesy of Audrey Bernut)

Print / Stampa

November 2024, Grafichecom



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

# **22<sup>nd</sup> Convention of FFC Ricerca investigators in cystic fibrosis**

XXII Convention d'autunno dei ricercatori  
in fibrosi cistica

Verona

14 - 16 November 2024

Camera di Commercio, Corso Porta Nuova 96

*Work in progress of projects funded by FFC Ricerca (2022-2024)*

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti  
finanziati da FFC Ricerca (2022-2024)

# General Index

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

## Appendices

1. Archive of Publications from FFC Ricerca Projects (2014-2024)..... 64  
2. Institutes and Laboratories involved in the projects presented at the 22<sup>nd</sup> FFC Ricerca Convention ..... 85  
3. International Reviewers of FFC Ricerca Projects ..... 86  
4. FFC Ricerca Projects (2022-2024) adopted by Supporters..... 89



# Program at a glance

## Thursday, 14 November 2024

09:30 - 10:30	Registration and poster display
10:30 - 11:20	Welcome and greetings
11:20 - 11:30	<b>Not only research: education and dissemination by FFC Ricerca</b>
11:30 - 13:05	<b>SESSION 1 - FFC RICERCA STRATEGIC PROJECTS AND RESEARCH FACILITIES</b>
13:05 - 14:30	Lunch
14:30 - 16:15	<b>SESSION 2 - ORPHAN MUTATIONS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES</b>
16:15 - 16:40	<b>SESSION 3 - FLASH PRESENTATION 1: 2024 NEW PROJECTS</b>
16:40 - 18:00	Coffee Break, Poster session and Q&A
18:00 - 18:30	<b>KEYNOTE SPEECH - How clinical and <i>in vitro</i> data can synergize to facilitate access to modulators in people with cystic fibrosis and orphan mutations - Pierre-Régis Burgel</b>

## Friday, 15 November 2024

08:30 - 09:50	<b>SESSION 4 - EXPERIMENTAL MODELS AND CFTR BASIC DEFECTS</b>
09:50 - 10:55	<b>SESSION 5 - BIOLOGICAL EFFECTS OF KAFTRIO</b>
10:55 - 11:20	Coffee Break
11:20 - 12:25	<b>SESSION 6 - PHAGE THERAPY</b>
12:25 - 12:50	<b>SESSION 7 - FLASH PRESENTATION 2: 2024 NEW PROJECTS</b>
12:50	Group photo at Auditorium
13:10 - 15:10	Lunch, Poster session and Q&A
15:10 - 16:40	<b>SESSION 8 - UNDERSTANDING INFLAMMATION</b>
16:40 - 17:05	Coffee Break
17:05 - 17:35	<b>KEYNOTE SPEECH - Inflammation research priorities in the changing scenario of cystic fibrosis - Marcus A. Mall</b>
20:00	Social Dinner

## Saturday, 16 November 2024

09:30 - 11:25	<b>SESSION 9 - NEW STRATEGIES AGAINST PSEUDOMONAS AND ASPERGILLUS</b>
11:25 - 11:55	Coffee Break
11:55 - 13:25	<b>SESSION 10 - FIGHTING MYCOBACTERIA INFECTIONS</b>
13:25 - 13:35	Closing remarks

# Full Index of Abstracts

## SESSION 1 - FFC RICERCA STRATEGIC PROJECTS AND RESEARCH FACILITIES

1. **Paola Barraja, Luis J.V. Galiotta** (Molecules 3.0 for CF) ..... 8  
New generation of pharmacological modulators to rescue mutant CFTR protein
2. **Anna Cereseto, Sven Even Borgos, Luis J.V. Galiotta, Sheref Mansy, Serena Zacchigna**  
(GenDel-CF), *speaker Sjoerd Hak* ..... 9  
Tackling gene delivery in lungs for the treatment of cystic fibrosis
3. **Maria Cristina Lucanto, Cesare Braggion, Cristina Cigana, Nicoletta Pedemonte**  
(Kaftrio in the real life)..... 10  
Efficacy and safety of Kaftrio in real life: an observational multicenter Italian clinical study
4. **Alessandra Bragonzi** (CFaCore) ..... 11  
FFC Ricerca Research facilities: The cystic fibrosis animal core
5. **Valeria Capurro** (SCP)..... 12  
FFC Ricerca Research facilities: The primary cell cultures service
6. **Roberto Buzzetti** (CFDB) ..... 13  
FFC Ricerca Research facilities: The cystic fibrosis database

## SESSION 2 - ORPHAN MUTATIONS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES

7. **Massimo Aureli, Anna Tamanini** (FFC#1/2022) ..... 14  
A lipid-based therapeutic approach to rescue CFTR with orphan mutations and implications  
in bacterial infections in cystic fibrosis
8. **Emilio Hirsch** (FFC#3/2022) ..... 15  
Rescuing rare CFTR mutants with a PI3K $\gamma$  mimetic peptide
9. **Giulia Maule** (GMSG#1/2022)..... 16  
Development of CRISPR-Cas delivery system for genome editing applications in cystic fibrosis
10. **Riccardo Percudani, Gianfranco Pasut, Rosaria Casciaro** (FFC#14/2022)..... 17  
Actin-resistant acidic DNase for the treatment of CF pulmonary symptoms
11. **Maria Luisa Mangoni, Arianna Venturini, Mattia Mori** (FFC#4/2022) ..... 18  
Esculentin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator  
activities to address cystic fibrosis lung disease

## SESSION 3 - FLASH PRESENTATION 1: 2024 NEW PROJECTS

12. **Giovanni Marzaro, Tamas Hegedus, Gergely L. Lukacs** (FFC#1/2024)..... 20  
Development of new potentiators active on (ultra)rare mutants of CFTR
13. **Mauro Salvi** (FFC#3/2024) ..... 21  
Promoting correct folding to enhance F508del-CFTR rescue induced by correctors
14. **Giovanni Bertoni, Silvia Ferrara** (FFC#5/2024)..... 22  
Targeting bacterial small RNA to develop non-traditional therapeutic options against  
*Pseudomonas aeruginosa*
15. **Sandra Gemma, Arianna Pompilio** (FFC#7/2024) ..... 23  
Targeting quorum sensing to fight *Pseudomonas aeruginosa* infections

16. <b>Santiago Ramón-García</b> (FFC#9/2024), <i>speaker Lara Muñoz Muñoz</i> .....	24
Understanding the contribution of Kaftrio to antimicrobial therapies against nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis	
17. <b>Antonio Recchiuti</b> (FFC#13/2024) .....	25
Unraveling proresolving effects of CFTR modulators on lung inflammation and infection	
18. <b>Martina Rossitto, Marco Artini</b> (FFC#15/2024).....	26
Analysis of the evolution of virulence factors and antimicrobial resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in people with cystic fibrosis	

#### SESSION 4 - EXPERIMENTAL MODELS AND CFTR BASIC DEFECTS

19. <b>Roberto Plebani</b> (GMSG#1/2023).....	27
Developing a new respiratory 3D model as an innovative strategy to study the inflammation pathology in cystic fibrosis	
20. <b>Marco Cafora</b> (GMRF#1/2023) .....	28
<i>Ex vivo</i> pig lung as a new model to study the efficacy of phage therapy against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection in cystic fibrosis	
21. <b>Carlos M. Farinha, Valeria Tomati</b> (FFC#2/2023).....	29
Exploring the cellular pathways to promote rescue of mutant CFTR protein in cystic fibrosis	
22. <b>Alessandra Bragonzi, Federica Ungaro, Valeria Daccò</b> (FFC#5/2023) .....	30
Beyond the lung: the gut's role in the pathology of cystic fibrosis	
23. <b>Luis J. V. Galiotta</b> (FFC#9/2022).....	31
Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis	

#### SESSION 5 - BIOLOGICAL EFFECTS OF KAFTRIO

24. <b>Andrea Armirotti, Rosaria Bassi</b> (FFC#1/2023).....	32
Investigation of Kaftrio secondary effects on sphingolipid synthesis	
25. <b>Renata Bocciardi</b> (FFC#3/2023).....	33
Understanding the mechanisms behind the variable efficacy of CFTR modulators on the N1303K mutation on human primary nasal epithelial cells	
26. <b>Cristina Cigana, Daniela Girelli, Ersilia Vita Fiscarelli</b> (FFC#16/2021) .....	34
Linking elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease	

#### SESSION 6 - PHAGE THERAPY

27. <b>Anna Silvia Pistocchi</b> (FFC#12/2022).....	35
Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application	
28. <b>Federica Briani</b> (FFC#16/2023) .....	36
Facing resistance to therapeutic phages observed in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates from people with cystic fibrosis	
29. <b>Loris Rizzello, Giulia Degiacomi</b> (FFC#11/2023) - <i>speaker Anna Griego</i> .....	37
Resolving <i>Mycobacterium abscessus</i> infections with a phages-inspired therapy	

## SESSION 7 - FLASH PRESENTATION 2: 2024 NEW PROJECTS

30. <b>Lucilla Nobbio, Andrea Armirotti</b> (FFC#2/2024).....	38
Investigating the safety of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) exposure during pregnancy and early development	
31. <b>Onofrio Laselva, Valeria Capurro, Enza Montemitro</b> (FFC#4/2024).....	39
A personalized repurposing approach based on antiinflammatory/antioxidant treatment to increase the efficacy of CFTR modulators	
32. <b>Mariagrazia Di Luca, Laura Rindi, Andrea Moscatelli</b> (FFC#6/2024) .....	40
Development of phage therapy for treating <i>Mycobacterium abscessus</i> lung infections in people with cystic fibrosis	
33. <b>Annalisa Guaragna, Eliana De Gregorio</b> (FFC#8/2024) .....	41
A combined therapy against <i>Pseudomonas aeruginosa-Staphylococcus aureus</i> co-infections in cystic fibrosis	
34. <b>Stefano Sabatini, Laura Rindi</b> (FFC#10/2024) .....	42
Phenotypic medicinal chemistry approaches to identify new anti- <i>Mycobacterium abscessus</i> agents	
35. <b>Alberto Battezzati, Federico Alghisi, Stefano Costa</b> (FFC#14/2024).....	43
Long-term clinical outcomes of insulin secretory defects and effects of CFTR modulators	
36. <b>Daniela Guidone</b> (GMRF#1/2024).....	44
Airway surface as a battleground against bacteria	
37. <b>Michele Genovese</b> (GMSG#1/2024).....	45
Alternative therapeutic target to restore the mucociliary clearance in CF	

## SESSION 8 - UNDERSTANDING INFLAMMATION

38. <b>Domenico Mattoscio</b> (FFC#11/2022, FFC#12/2024) .....	46
Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis	
39. <b>Mario Romano, Mauro Perretti</b> (FFC#15/2023) .....	47
Melanocortins to control cystic fibrosis airway inflammation	
40. <b>Moira Paroni, Clelia Peano</b> (FFC#14/2023) .....	48
Identification of molecular mechanisms which underpin the activation of pathogenic pulmonary Th1/17 cells in cystic fibrosis	
41. <b>Ilaria Lampronti, Adriana Chilin</b> (FFC#10/2022, FFC#11/2024) .....	50
Towards the development of GY971a as anti-inflammatory drug in cystic fibrosis	

## SESSION 9 - NEW STRATEGIES AGAINST PSEUDOMONAS AND ASPERGILLUS

42. <b>Barbara Citterio, Massimiliano Lucidi</b> (FFC#7/2023) - <i>speaker Gianmarco Mangiaterra</i> .....	51
Evaluation of cefiderocol activity against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in cystic fibrosis lung infections	
43. <b>Giordano Rampioni</b> (FFC#10/2023) .....	52
Drug repurposing to inhibit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> adaptation to the CF lung environment	
44. <b>Silvia Buroni, Antonio Coluccia</b> (FFC#6/2023) .....	53
Using a Virtual Screening approach to find new drugs against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	

45. <b>Marco Sette, Mattia Falconi, Marco Rinaldo Oggioni</b> (FFC#13/2023) .....	54
Building simple molecules containing regions of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to stimulate the immune system against this pathogen	
46. <b>Eugenio Notomista, Ivana D'Angelo</b> (FFC#8/2023).....	55
Inhalable nanoparticles delivering peptidomimetic/antibiotic combinations for local treatment of CF lung infections	
47. <b>Andrea Battistoni, Luigi Scipione</b> (FFC#4/2023) .....	56
A Trojan horse strategy to improve the treatment of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infections	
48. <b>Teresa Zelante</b> (FFC#15/2022).....	57
Study on anti-fungal immunoglobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis	

## SESSION 10 - FIGHTING MYCOBACTERIA INFECTIONS

49. <b>Nicola Ivan Lorè, Lisa Cariani</b> (FFC#7/2022) .....	58
Genomic and phenotypic characterization of <i>Mycobacterium abscessus</i> and detection of host biomarkers to define mycobacterial infection in cystic fibrosis	
50. <b>Laurent Robert Chiarelli, Fiorella Meneghetti, Sonia Covaceuszach</b> (FFC#5/2022) .....	59
Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against <i>Mycobacterium abscessus</i> iron acquisition pathways	
51. <b>Maurizio Fraziano, Daniela Maria Cirillo</b> (FFC#13/2022) .....	61
Fighting <i>Mycobacterium abscessus</i> infections by a novel combination therapy	
52. <b>Edoardo Scarpa, Daniela Maria Cirillo</b> (FFC#12/2023).....	62
Fostering pathogen host-mediated clearance to neutralize <i>Mycobacterium abscessus</i> infection	
53. <b>Maria Rosalia Pasca, Fabio Saliu, Riccardo Manganelli</b> (FFC#9/2023).....	63
Evaluation of the efficacy of the “VOMG” new antibiotic against <i>Mycobacterium abscessus</i>	



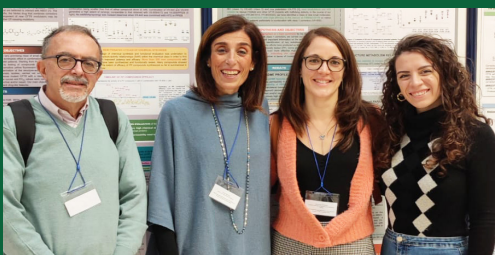
# Abstracts of oral presentations

## SESSION 1

## FFC Strategic Projects and research facilities

New generation of pharmacological modulators to rescue mutant CFTR protein

Nuovi modulatori farmacologici per il recupero della proteina CFTR mutata



From the left: Luis J.V. Galietta, Paola Barraja, Arianna Venturini and Anna Borrelli

1

**Marilia Barreca<sup>1</sup>, Fabiana Lo Mascolo<sup>1</sup>, Alessandra Li Pani<sup>1</sup>, Stefano Giuffrida<sup>1</sup>, Virginia Spanò<sup>1</sup>, Maria Valeria Raimondi<sup>1</sup>, Alessandra Montalbano<sup>1</sup>, Paola Barraja<sup>1</sup>, Mario Renda<sup>2</sup>, Anna Borrelli<sup>2</sup>, Arianna Venturini<sup>2</sup>, Daniela Guidone<sup>2</sup>, Michele Genovese<sup>2</sup>, Luis J. V. Galietta<sup>2</sup>**

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

### Background and rationale

The development of Kaftrio, a triple drug combination that includes two correctors (VX-661, VX-445) and one potentiator (VX-770), has represented a great advancement for the treatment of people with cystic fibrosis (CF). However, the identification of new pharmacological modulators is still needed to maximize the rescue of mutant CFTR. The project Molecules 3.0 aims at the development of novel CFTR correctors endowed with maximal potency and efficacy.

### Hypothesis and objectives

Our previous studies identified the tricyclic compound PP028 as a lead candidate for the development of class 3 correctors, whose mechanism of action involves interaction with the second membrane spanning domain (MSD2) of CFTR protein. Interestingly, the process of PP compounds optimization by structure-activity relationship (SAR) studies led to a new chemotype (SH compounds) characterized by a free rotatable structure. To maximize the possibility to obtain compounds endowed with the characteristics needed to reach preclinical and clinical studies, we coupled traditional SAR analysis of PP and SH compounds to computational studies. Crucial information from in vitro and in silico analysis oriented the synthesis towards an elongation of compound structure, to increase the number of chemical interactions with CFTR protein, as well as the inclusion of fluorine in a specific position as a key feature of most active compounds.

### Essential methods

Cycles of chemical synthesis and functional analysis are used to explore three different regions identified for both PP and SH families on the basis of their predicted interactions with CFTR (lasso domain and transmembrane helices 10-11). All compounds are functionally tested on CFBE41o-cells expressing F508del-CFTR and most promising compounds are validated on primary bronchial epithelial cells from people with CF. In vivo pharmacokinetic studies on mice are ongoing in collaboration with the Facility of Translational Pharmacology (IIT).

### Preliminary results

We have so far isolated 450 compounds divided in two families, PP and SH compounds, from which several effective compounds were identified. Considering the favorable potency in vitro, compounds PP028, PP209, SH157A were selected for in vivo pharmacokinetic evaluation on rodents which are preparatory to assess the dose efficacy for possible future use in humans (IIT). In our exploration, we have surprisingly discovered a new chemotype related to PP compounds that is associated with pure potentiator or dual corrector/potentiator activity.

### Conclusions

The increasing amount of data collected so far by exploring the chemical space around PP and SH compounds provides useful information for the generation of compounds with improved features, either in terms of potency/efficacy as correctors of mutant CFTR and of drug-likeness.

### Razionale dello studio

Lo sviluppo del Kaftrio, una tripla combinazione che include due correttori (VX-661, VX-445) e un potenziatore (VX-770), ha rappresentato un importante avanzamento nel trattamento delle persone con fibrosi cistica (FC). Tuttavia l'identificazione di nuovi modulatori che possano essere usati in nuovi trattamenti combinatori è ancora necessario per massimizzare il recupero della proteina CFTR mutata. Il progetto *Molecole 3.0* ha l'obiettivo di sviluppare nuovi correttori con massima potenza ed efficacia

### Ipotesi e obiettivi

Nel corso dei nostri studi abbiamo identificato PP028, a struttura tricyclica, come candidato pilota per lo sviluppo di correttori di classe 3 il cui meccanismo coinvolge l'interazione con il secondo dominio transmembrana (MSD2) della proteina CFTR. Il processo di ottimizzazione dei composti PP sulla base della relazione struttura-attività (SAR) ha condotto a un nuovo chemotipo (composti SH), caratterizzato da una struttura flessibile. Allo scopo di massimizzare la possibilità di ottenere composti con caratteristiche idonee per studi preclinici e clinici, abbiamo accoppiato il metodo tradizionale di analisi SAR a studi computazionali.

Le informazioni derivanti dai dati *in vitro* e *in silico* hanno orientato la sintesi verso un allungamento della struttura chimica dei nostri composti, utile ad aumentare il numero di interazioni chimiche con la proteina CFTR. Inoltre, la presenza di un atomo di fluoro in una posizione specifica sembra avere un ruolo chiave sull'attività.

#### Metodi

Per esplorare il ruolo che le tre regioni che compongono i composti PP ed SH hanno nell'interazione con la proteina CFTR, sono stati effettuati cicli di sintesi e di analisi funzionale. I nuovi composti sono stati testati su cellule CFBE41o- con espressione della proteina CFTR mutata e i composti più promettenti sono stati validati su cellule bronchiali epiteliali primarie di persone con FC. Sono in corso studi di farmacocinetica su topi presso la facility di *Translational Pharmacology* (IIT).

#### Risultati preliminari

Tra i 450 composti isolati delle due famiglie, PP e SH, sono stati identificati diversi composti efficaci. PP028, PP209, SH157A sono stati selezionati per gli studi di farmacocinetica *in vivo* su topi che sono propedeutici per stabilire la dose efficace per una futura applicazione sull'uomo (IIT). Inoltre, nel corso della nostra esplorazione abbiamo identificato un nuovo chemotipo che sorprendentemente ha mostrato attività come potenziatore o come correttore/potenziatore.

#### Conclusioni

I numerosi dati collezionati fino a ora nell'esplorazione dello spazio chimico dei composti PP ed SH ci hanno fornito preziose informazioni per lo sviluppo di composti migliori in termini di potenza/efficacia sulla CFTR mutata e come proprietà *drug-like*.

### Tackling gene delivery in lungs for the treatment of cystic fibrosis

Strategie di trasferimento genico nei polmoni per il trattamento della fibrosi cistica



Anna Cereseto (2<sup>nd</sup> from the right) with her collaborators

2

**Anna Cereseto<sup>1</sup> Sheref S. Mansy<sup>2</sup>, Luis J. V. Galletta<sup>3</sup>, Serena Zacchigna<sup>4</sup>, Sven Even Borgos<sup>5</sup>, Sjoerd Hak<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Department for Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Italy - <sup>2</sup>University of Alberta (Canada) - <sup>3</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>4</sup>ICGEB, Trieste, Italy - <sup>5</sup>SINTEF Trondheim, Norway - (**GenDel-CF, ongoing**)

#### Background and rationale

*Gene therapy has the potential to improve the prognosis for people with cystic fibrosis (CF) and may even offer a cure. A significant challenge in realising this is delivering the gene therapy at needed doses in the correct cells. Here we aim to achieve this goal by exploring three different delivery technologies, of which one is based on lipid nanoparticles (LNPs). The most effective system will be used to deliver the genome editing machinery to correct the CF causing mutations.*

#### Hypothesis and objectives

*The goal of the GenDel-CF consortium is to advance delivery technology in gene therapy for CF. The GenDel-CF unit from SINTEF has the primary objective of developing LNP formulations to efficiently deliver mRNA to lung epithelial cells and tissues. To this aim we formulate various LNPs with reported lung tropism, evaluate their transfection efficiency in vitro and in vivo, and select the most promising formulations for further optimization.*

#### Essential methods

*We are using a flow-mixing technique, like the one used for clinically approved mRNA-based COVID-19 vaccines, to formulate LNPs with different lipid ingredients reported in the literature. These LNPs encapsulate GFP or luciferase mRNA for in vitro transfection assessment in lung epithelial cell lines and differentiated lung epithelia, and Cre mRNA for in vivo studies in tdTomato mice. LNPs are characterized using dynamic light scattering for size and polydispersity, multidetector field flow fractionation for size and quality assessment, and Quantit Ribogreen assay for mRNA encapsulation.*

#### Preliminary results

*We have successfully formulated 10-15 LNP formulations, 8 of which have been selected for further study based on their physicochemical properties. Two formulations have shown successful transfection in CFBE41o cells but not in differentiated lung epithelia. Several other formulations exhibit satisfactory properties and will be tested in further in vitro and in vivo experiments. Formulations with suboptimal properties will be optimized by altering flow-mixing conditions.*

#### Conclusions

*Our ongoing project has identified several promising mRNA-LNP formulations. Moving forward, we will conduct in vitro and in vivo experiments within the GenDel-CF consortium to assess their transfection efficacy and select the most promising candidates for the delivery of the genome editing machinery. Formulations containing the CRISPR/Cas system will also be developed. The expected results of this study will provide critical insights into improving gene therapy delivery for CF.*

#### Razionale dello studio

La terapia genica ha il potenziale per migliorare la prognosi delle persone con fibrosi cistica (FC) e potrebbe offrire una cura. Tuttavia, una sfida significativa è somministrare la terapia genica in dosi sufficienti nelle cellule corrette. In questo progetto esploriamo tre diverse tecnologie di somministrazione, una delle quali si basa su nanoparticelle lipidiche (LNP). Le LNP più promettenti verranno usate per la somministrazione del macchinario di *editing* del genoma per correggere le mutazioni che causano la FC.

**Ipotesi e obiettivi**

Il nostro obiettivo principale è migliorare le formulazioni di LNP per fornire efficacemente mRNA alle cellule e ai tessuti epiteliali polmonari. A tal fine, sono state formulate varie LNP con diverse composizioni lipidiche ed è stata valutata la loro efficienza di trasfezione *in vitro* e *in vivo*.

**Metodi**

È stata usata una tecnica di miscelazione a flusso, simile a quella impiegata per i vaccini a mRNA clinicamente approvati contro COVID-19, per formulare LNP con diversi tipi di lipidi, riportati in letteratura. Queste LNPs sono in grado di incapsulare sia l'mRNA con GFP o luciferasi, usate come reporter per valutare la trasfezione *in vitro* in linee cellulari epiteliali polmonari ed epitelii polmonari differenziati, sia l'mRNA Cre per studi *in vivo* in topi tdTomato.

Le LNPs sono state caratterizzate usando la tecnica del *dynamic light scattering* (o scattering dinamico della luce) per valutare la dimensione e la polidispersione, il frazionamento a flusso multifiltrante per valutare la dimensione e la qualità e il test Quantit Ribogreen per l'incapsulamento dell'mRNA.

**Risultati preliminari**

Abbiamo generato 10-15 formulazioni di LNP, 8 delle quali sono state selezionate per ulteriori studi in base alle loro proprietà fisico-chimiche. Due formulazioni hanno mostrato una trasfezione altamente efficiente nelle cellule CFBE41o ma non negli epitelii polmonari differenziati. La maggior parte delle altre formulazioni presenta ottime proprietà fisico-chimiche e sarà testata in ulteriori esperimenti *in vitro* e *in vivo*. Le formulazioni con proprietà sub-ottimali saranno ottimizzate modificando le condizioni di miscelazione a flusso.

**Conclusioni**

Il progetto ha identificato diverse formulazioni promettenti di mRNA-LNPs. In futuro, condurremo esperimenti *in vitro* e *in vivo* per valutare la loro efficacia di trasfezione e selezionare i candidati migliori. Verranno anche create formulazioni contenenti il sistema CRISPR/Cas. I risultati di questo studio forniranno informazioni critiche per migliorare la somministrazione della terapia genica per la FC.

**Efficacy and safety of Kaftrio in real life: an observational multicenter Italian clinical study**

**Efficacia e sicurezza di Kaftrio nella vita reale: studio italiano osservazionale e multicentrico**



Maria Cristina Lucanto

3

**Maria Cristina Lucanto<sup>1</sup>, Sonia Volpi<sup>2</sup>, Cesaere Braggion<sup>3</sup> and the working group for the SPIKE study**

<sup>1</sup>Regional Cystic Fibrosis Center, Messina, Italy - <sup>2</sup>Cystic Fibrosis Center of Verona, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy - <sup>3</sup>FFC Ricerca scientifica direction, Clinical Research Area

**(Kaftrio in the real life, ongoing)**

**Background and rationale**

The Italian Cystic Fibrosis Research Foundation funded two post-marketing observational studies, to assess the real-world effectiveness and safety of ETI in people with cystic fibrosis (pwCF), 12 years of age or older and heterozygous for F508del (F) and one minimal function mutation. The first study (SITTMA) evaluated pwCF with advanced lung disease over 2 years and ended in 2023. The second ongoing study (SPIKE) will evaluate pwCF with normal or mild-moderate lung disease over 2 years and pwCF of the first study over 4 years.

**Hypothesis and objectives**

No data exist on the long-term effectiveness and safety of ETI in pwCF with advanced lung disease, and our aim is to assess its effects in a real-life setting over 4 years. Our interest is also focused on the individual responsiveness to the drug and on differences in clinical benefits according to severity of lung disease.

**Essential methods**

18 Italian CF Centers participated in the SPIKE study, designed to obtain real-world data in pwCF with either advanced respiratory disease (group A, ppFEV1<40) or normal and mild-moderate lung disease (group B, ppFEV1>40). Demographic and clinical data were collected from patient files for 2 years prior to and 2-4 years after ETI was initiated. Outcomes included changes in ppFEV1, sweat chloride (SwCl) concentration, use of antibiotics, body mass index (BMI) and quality of life, treatment-related adverse events, temporary or definitive interruption of the drug. Two sub-studies will be aimed to assess: i) the correlation between *ex vivo* CFTR activity and the clinical benefit obtained with ETI and the reasons behind the lack of response to the drug; ii) the changes in phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* after prolonged treatment in responsive and no responsive subjects to ETI treatment.

**Preliminary results**

The SPIKE study is ongoing. The main results of the SITTMA study in 124 pwCF with advanced lung disease are as follows: i) most adverse effects are mild and short but in 28% of pwCF we observed recurrent liver biochemical abnormalities; ii) the mean differences (95% CI) for ppFEV1 and SwCl, assessed as mean values in the pre-ETI and ETI treatment periods, were +12.8 (9.2 to 16.4) points and -43.9 (-49.3 to -38.6 mmol/L); iii) the number of antibiotic courses and hospitalizations decreased significantly; iv) 20 pwCF (16.3%) had a change in ppFEV1 between the pre-ETI and ETI periods lower than 5 percentage points; v) in only 3/82 (3.7%) subjects with chronic airway infection by *P. aeruginosa* cultures were always negative during ETI treatment

**Conclusions**

Our data showed that treatment with ETI was associated with a broad range of clinically significant outcomes through a 2-year period. The liver biochemical abnormalities, the variability in lung function and SwCl, and the limited clearance of *P. aeruginosa* suggest that real-world observation should proceed with careful long-term monitoring to understand the benefit-risk profile of ETI in pwCF with advanced lung disease.



<b>Razionale dello studio</b>	FFC Ricerca ha finanziato due studi post marketing, osservazionali allo scopo di verificare l'efficacia e la sicurezza di ETI (Kaftrio) nella vita reale di persone con fibrosi cistica (FC), di età uguale o superiore ai 12 anni, eterozigoti composti per la mutazione F508del e una mutazione a funzione minima. Il primo studio (SITTMA) ha valutato persone con FC e malattia polmonare avanzata per due anni e si è concluso nel 2023. Il secondo studio (SPIKE) valuterà persone con FC con funzione polmonare normale o malattia polmonare lieve-moderata per 2 anni e persone con FC del primo studio prolungando l'osservazione per 4 anni.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Non esistono dati a lungo termine su efficacia e sicurezza di ETI in persone con FC e malattia polmonare avanzata; l'obiettivo di questo studio è di valutare i suoi effetti nella vita reale per 4 anni. Inoltre si vuole verificare la risposta individuale al trattamento e il differente beneficio clinico in relazione alla gravità della malattia.
<b>Metodi</b>	18 Centri FC italiani hanno aderito allo studio SPIKE, finalizzato a valutare nella vita reale gli effetti di ETI nelle persone con FC con malattia polmonare severa (gruppo A, ppFEV1<40) o funzione polmonare normale o lieve moderata (gruppo B, ppFEV1>40). Verranno raccolti i dati demografici e clinici durante i due anni precedenti e per i 2-4 anni successivi all'avvio del farmaco. Le misure di esito sono gli effetti avversi correlati al farmaco, la sua sospensione temporanea o definitiva, la variazione di FEV1, del cloro sudorale, del numero di cicli antibiotici, dell'indice di massa corporea e della qualità della vita. Due sub-studi valuteranno: i) la relazione fra l'attività della proteina CFTR nelle cellule nasali e i benefici clinici ottenuti con ETI, e le ragioni di una mancata risposta al trattamento; ii) cambiamenti nel fenotipo e genotipo di ceppi di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dopo trattamento prolungato con ETI in soggetti <i>responders</i> e <i>non responders</i> .
<b>Risultati preliminari</b>	Lo studio SPIKE è in corso. I principali risultati dello studio SITTMA in 124 persone FC e malattia severa sono stati: i) la comparsa di effetti avversi lievi e di breve durata ma riscontro di alterazioni biochimiche epatiche ricorrenti nel 28% di persone con FC in trattamento con ETI; ii) la differenza (IC 95%) per il FEV1 e il cloro sudorale, tra il valore medio nel periodo precedente e successivo al trattamento con ETI che è stata di +12,8 (da 9,2 a 16,4) punti e di -43,9 (da -49,3 a -386 mmol/L); iii) la significativa riduzione del numero dei trattamenti con antibiotico in vena e delle ospedalizzazioni; iv) 20 persone con FC (16,3%) hanno presentato un incremento del FEV1 tra il periodo precedente e successivo all'avvio di ETI inferiore a 5 punti di percentuale predetta; v) solo 3/82 persone (3,7%) con infezione cronica da <i>P. aeruginosa</i> hanno presentato colture negative durante il trattamento con ETI.
<b>Conclusioni</b>	I dati raccolti mostrano risultati clinicamente rilevanti durante i due anni di trattamento. Le alterazioni registrate a carico degli enzimi epatici, la variabilità nelle variazioni del FEV1 e del cloro sudorale, e il numero limitato di persone in trattamento con ETI e scomparsa di <i>P. aeruginosa</i> , suggeriscono di continuare l'osservazione a lungo termine nella vita reale per comprendere i rischi/benefici di ETI in soggetti con malattia polmonare avanzata.

FFC Ricerca Research facilities:  
the Cystic Fibrosis Animal Core  
(CFaCore)

Servizi alla ricerca:  
Cystic Fibrosis Animal Core  
(CFaCore)



Alessandra Bragonzi (3<sup>rd</sup> from the left) with her collaborators

4

**Alice Rossi, Ida De Fino, Davide Gugliandolo, Alessandra Bragonzi**

Infections and Cystic Fibrosis Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

### Background and rationale

*Treating bacterial infections and inflammation remains a top priority for the cystic fibrosis (CF) community, as these are key challenges in people with CF, regardless of the availability of CFTR modulator treatments. Within this area, FFC Ricerca supports studies focused on identifying and validating new antibacterial and anti-inflammatory therapies, which require testing in preclinical animal models to advance translational research.*

### Objectives

*The Cystic Fibrosis animal Core Facility (CFaCore) was established to support research by offering dedicated scientific and regulatory expertise. It provides models within a preclinical platform designed to study pathological processes and evaluate candidate therapeutic molecules aimed at reducing infection or inflammation, thus facilitating the development of new drugs.*

## Resources and services

*Consolidated experience in research, state-of-the-art infrastructures and innovation capacity are our core values. Our team has developed mouse models for both acute and long-term chronic infections and continues to enhance the CFaCore with new models to meet evolving research needs. We have defined protocols and endpoints to ensure the predictive value and preclinical relevance of drug testing. Specifically, we offer: i) access to preclinical models of acute and chronic respiratory infections, utilizing reference and clinical bacterial strains, as well as transgenic cystic fibrosis mice; ii) customized experimental protocols, including systemic or aerosol pharmacological delivery, tailored to each project's needs; iii) comprehensive read-outs and data analysis, covering both the pathogen and host response, including lung function measurements.*

*Clear milestones are set for each project to ensure efficient progress toward the overall goal. Our vision is to foster a truly collaborative effort to achieve tangible impacts for the benefit of patients.*

## Contesto

Il trattamento delle infezioni batteriche e dell'infiammazione rimane una priorità fondamentale per la comunità della fibrosi cistica (FC), poiché queste rappresentano sfide centrali per le persone con FC, indipendentemente dalla disponibilità di trattamenti con modulatori del CFTR. In questo ambito, FFC Ricerca supporta studi mirati sull'identificazione e la validazione di nuove terapie antibatteriche e antinfiammatorie, che necessitano di essere testate in modelli animali preclinici per promuovere la ricerca traslazionale.

## Obiettivi

La *Cystic Fibrosis animal Core Facility* (CFaCore) è stata istituita per supportare la ricerca preclinica, offrendo un'assistenza scientifica e regolatoria specializzata. La struttura fornisce modelli all'interno di una piattaforma preclinica progettata per studiare i processi patologici e valutare candidati terapeutici volti a ridurre l'infezione e l'infiammazione facilitando lo sviluppo di nuovi farmaci.

## Risorse e servizi

Una consolidata esperienza nella ricerca, infrastrutture d'avanguardia e capacità di innovazione rappresentano i nostri principali punti di forza. Il nostro team ha sviluppato modelli animali per infezioni acute e croniche a lungo termine, e continua a potenziare il CFaCore introducendo nuovi modelli per rispondere alle esigenze di ricerca in continua evoluzione. Abbiamo definito protocolli e endpoint che garantiscono il valore predittivo e la rilevanza preclinica dei test farmacologici.

In particolare, offriamo: i) accesso a modelli animali preclinici di infezioni respiratorie acute e croniche, utilizzando varianti batteriche di riferimento e clinici, oltre a topi transgenici per la fibrosi cistica; ii) protocolli sperimentali personalizzati, inclusa la somministrazione farmacologica sistemica o aerosol, adattati alle esigenze di ciascun progetto; iii) risultati dettagliati e analisi dei dati che valutano sia la risposta del patogeno che quella dell'ospite, inclusi i parametri di funzionalità polmonare.

Vengono stabiliti obiettivi chiari per ogni progetto, al fine di garantire un avanzamento rapido. La nostra visione è promuovere un autentico sforzo collaborativo per raggiungere risultati tangibili a beneficio dei pazienti.

## FFC Ricerca Research facilities: the Primary Cultures Service (SCP)

Servizi alla ricerca:  
Servizio Colture Primarie



Valeria Capurro

5

### Valeria Capurro<sup>1</sup>, Luis J. V. Galiotta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy – <sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy

## Background and rationale

*The Cell Culture Facility began its activities in 2012 in the frame of the collaboration between the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (FFC Ricerca) and the Medical Genetics laboratory of the Giannina Gaslini Institute. The facility provides a collection of primary human bronchial epithelial cells (HBECs; obtained from both cystic fibrosis (CF) and non-cystic fibrosis (non-CF) bronchi) to researchers.*

## Objectives

*The Facility aims to provide the most relevant biological model of the airway epithelium to researchers of the FFC Ricerca network and researchers with CF-related grants for studies related to CF focused on: i) the physiology of the epithelium and the alterations caused by CFTR loss of function; ii) the efficacy of pharmacological and genetic therapies aiming at the correction of CF basic defect; iii) the interaction between bacteria and epithelial cells and the mechanisms associated with the inflammatory response.*

## Resources and services

*The Facility isolates HBECs from explanted bronchi and subsequently expands the cells to generate a large stock of cell aliquots. Over the years the facility has collected a large variability of genotypes and a great number of different non-CF subjects. Aliquots of frozen cells can be retrieved on request and sent to investigators together with a specific culture medium to perform a variety of studies.*

*To get access to the facility, the researcher must provide, within the request form, a brief description of the experiments to be done on HBECs to address their technical feasibility. The Facility furthermore provides to all its users: i) a protocol for the correct culture of the cells sent; ii) the possibility for interested researchers to carry out a period of training at the Facility laboratories; iii) the expertise of facility members. The facility also supplies, upon request, fully-differentiated, ready-to-use epithelia that are shipped refrigerated, embedded into a solid medium (Advance Service).*



<b>Contesto</b>	Il Servizio <i>Culture Primarie</i> è stato avviato nel 2012 grazie alla collaborazione tra Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC Ricerca) e il laboratorio di Genetica Medica dell'Istituto G. Gaslini. Il Servizio mette a disposizione dei ricercatori una collezione di cellule epiteliali bronchiali umane (HBECs; ottenute da bronchi sia di persone con fibrosi cistica (FC) sia da soggetti non-FC).
<b>Obiettivi</b>	Il Servizio ha lo scopo di fornire, ai ricercatori della rete FFC Ricerca e a quelli con grants correlati a FC, il modello biologico più rilevante delle vie aeree. Il modello può essere impiegato per studi correlati alla FC focalizzati su: i) la fisiologia dell'epitelio e le alterazioni causate da CFTR non funzionante; ii) l'efficacia di terapie farmacologiche e genetiche finalizzate a correggere il difetto di base della FC; iii) l'interazione tra batteri e cellule epiteliali e meccanismi associati alla risposta infiammatoria.
<b>Risorse e servizi</b>	Il Servizio isola, da bronchi espantati, le cellule HBE che successivamente vengono espanse per generare una biobanca di aliquote cellulari. Negli anni il Servizio ha collezionato un'ampia varietà di genotipi e un gran numero di soggetti non-FC. Su richiesta, è possibile l'invio di aliquote di cellule congelate, insieme a un terreno di coltura specifico. Per accedere al Servizio, il ricercatore deve fornire un modulo di richiesta contenente una breve descrizione degli esperimenti che compirà sulle HBECs per verificarne la fattibilità tecnica. Inoltre il Servizio fornisce a tutti i suoi utilizzatori: i) un protocollo per la corretta coltura delle cellule inviate; ii) la possibilità, per i ricercatori interessati, di effettuare un periodo di formazione presso i laboratori del Servizio; iii) l'esperienza dei membri del Servizio. Se richiesto, il Servizio può anche fornire epitelii differenziati e pronti all'uso. Questi epitelii vengono spediti incorporati in un mezzo solido in condizioni refrigerate (Servizio Avanzato).

FFC Ricerca Research facilities:  
Cystic Fibrosis DataBase  
(CFDB)

Servizi alla ricerca:  
Cystic Fibrosis DataBase  
(CFDB)



Clockwise: Valeria Raia, Donatello Salvatore, Natalia Cirilli, Roberto Buzzetti, Alessio Daniele

6

**Roberto Buzzetti<sup>1</sup>, Natalia Cirilli<sup>2</sup>, Valeria Raia<sup>3</sup>, Donatello Salvatore<sup>4</sup>, Alessio Daniele<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, ETS, Verona, Italy - <sup>2</sup>University Hospital of Marche, Cystic Fibrosis Centre, Ancona, Italy - <sup>3</sup>Cystic Fibrosis Centre, Department of Translational Medical Sciences (DISMET), University of Napoli Federico II, Italy - <sup>4</sup>Cystic Fibrosis Centre Ospedale San Carlo, Potenza, Italy - <sup>5</sup>OnLime, Milan, Italy

### Background and rationale

*The Cystic Fibrosis DataBase (CFDB), a web based facility supported by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation and active since 2011 ([www.cfdb.eu](http://www.cfdb.eu)) is a collection of almost 1,400 articles on the clinical effectiveness of interventions in cystic fibrosis (CF). The website is free of charge, completely compatible with mobile devices, smartphones and tablets and available to both the scientific and the patient's communities. It classifies the papers (Systematic Reviews and primary clinical studies, both completed and in progress) in a structured and easily accessible system.*

### Objectives

*To help specialists involved in CF care and clinical research to know the current best evidence about clinical effectiveness of interventions in CF. A project team of clinicians together with a leading expert in epidemiological and clinical research made a systematic search in Medline, Embase, Cochrane Library and in worldwide trial registries using "cystic fibrosis" as a keyword or a title word, with no limit of time or language.*

### Resources and services

*For the non-pharmacological interventions, controlled and observational studies were included; for pharmacological interventions and for ongoing trials only randomised controlled studies. Studies without a control group, or focusing on "basic science", etiology, epidemiology, and prognosis were excluded. Studies were classified according to an "ad hoc" dictionary of keywords. CFDB offers everyone: i) the possibility of querying by keywords or free text, by author, by year; ii) fifty thematic summary sheets, on relevant clinical topics in CF, which critically summarize on the one hand the state of the art of the available evidence, on the other the "unresolved questions".*

### Results

*To October 31, 2024 the database included 1,384 records: 109 Cochrane reviews, of which 3 protocols, 84 other reviews (including HTA reports), 1,111 primary studies including congress abstracts, and 74 ongoing trials.*

### Contesto

Il Cystic Fibrosis DataBase (CFDB), uno strumento basato sul web supportato dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC Ricerca) e attivo dal 2011 ([www.cfdb.eu](http://www.cfdb.eu)), è una raccolta di circa 1.400 articoli sull'efficacia clinica degli interventi in fibrosi cistica (FC). Il sito è gratuito, completamente compatibile con dispositivi mobili, smartphone e tablet e disponibile sia per la comunità scientifica che per quella dei pazienti. Classifica gli articoli (revisioni sistematiche e studi clinici primari, sia completati che in corso) in un sistema strutturato e facilmente accessibile.

<b>Obiettivi</b>	Aiutare gli specialisti coinvolti nella cura delle persone con FC e nella ricerca clinica a conoscere le migliori prove attuali sull'efficacia clinica degli interventi in persone con FC. Un team di progetto di clinici insieme a un esperto nella ricerca epidemiologica e clinica ha effettuato una ricerca sistematica in Medline, Embase, Cochrane Library e nei registri di sperimentazione in tutto il mondo utilizzando "fibrosi cistica" come parola chiave o parola nel titolo, senza limiti di tempo o lingua.
<b>Risorse e servizi</b>	Per gli interventi non farmacologici sono stati inclusi anche studi controllati osservazionali; per quelli farmacologici solo studi randomizzati controllati e studi in corso. Sono esclusi studi senza gruppo di controllo o focalizzati su "ricerca di base", eziologia, epidemiologia, prognosi. Gli studi sono indicizzati in base a un dizionario <i>ad hoc</i> di parole chiave. CFDB offre: i) la possibilità di interrogazione per parole chiave o testo libero, per autore, per anno; ii) 50 schede tematiche, su altrettanti temi clinici rilevanti in FC, che riassumono criticamente da un lato lo stato dell'arte delle prove disponibili, dall'altro le "questioni irrisolte".
<b>Risultati</b>	Al 31 ottobre 2024, il database include 1.384 record: 109 revisioni Cochrane, di cui 3 protocolli, 84 altre revisioni (inclusi report HTA), 1.111 studi primari inclusi abstract di congressi e 74 studi in corso.

## SESSION 2

# Orphan mutations and new therapeutic approaches

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

Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con mutazioni orfane di terapia e per contrastare le infezioni batteriche in fibrosi cistica



Left to right: Laura Mauri, Dorina Dobi, Massimo Aureli, Rosaria Bassi, Nicoletta Loberto. In the smaller pics: Dorina Dobi (on the left) and Anna Tamanini (on the right)

7

**Anna Tamanini<sup>1</sup>, Nicoletta Loberto<sup>2</sup>, Laura Mauri<sup>2</sup>, Rosaria Bassi<sup>2</sup>, Dorina Dobi<sup>2</sup>, Christian Boni<sup>3</sup>, Diletta Onorato<sup>4</sup>, Federica Quiri<sup>3</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>5</sup>, Valeria Tomati<sup>5</sup>, Giulio Cabrini<sup>6</sup>, Valentino Bezzerri<sup>3</sup>, Debora Oliosio<sup>1</sup>, Alessandro Rimessi<sup>7</sup>, Massimo Aureli<sup>2</sup>**

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

### Background and rationale

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

### Hypothesis and objectives

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

### Essential methods

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

### Preliminary results

We verified that: i) the expression of different variants of CFTR influences the membrane composition of bronchial epithelial cells, ii) the administration of either GM1, its structural analogues, or LDL-associated cholesterol ameliorates the effect of Kaftrio increasing the PM stability of the mutated channel without exerting toxic effects, even if in case of *P. aeruginosa* infection, iii) GM1 restores the clearance of *P. aeruginosa* in bronchial epithelial cells expressing F508del-CFTR, iv) the treatment with GM1 is safe and enhance the activity of immune cells to kill *P. aeruginosa* in animal models with chronic infections.

### Conclusions

Results of this study contribute to defining the role of the lipid microenvironment in the stability of CFTR in the plasma membrane. In addition, they serve as a starting point for the development of new therapeutic strategies based on the combination of lipids with correctors and potentiators, aimed at increasing the effectiveness of the treatment of people with CF, as well as improving their inflammatory status.

## Razionale dello studio

Diverse persone con fibrosi cistica (FC) sono portatrici di mutazioni ancora prive di opzioni terapeutiche. Grazie a finanziamenti precedenti della Fondazione, abbiamo dimostrato che il lipide GM1 stabilizza e migliora l'attività di F508del-CFTR recuperata da Kaftrio. In FC, la stabilità in membrana plasmatica (MP) di CFTR mutata è fortemente influenzata dall'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) anche a seguito del trattamento con i modulatori. Inoltre, considerando l'attività immunomodulatoria di GM1, questo lipide potrebbe migliorare anche la risposta immunitaria delle persone con FC.

## Ipotesi e obiettivi

Attraverso questo progetto vogliamo studiare se la somministrazione esogena di GM1 e colesterolo migliorino l'efficacia di Kaftrio nel ripristinare CFTR mutato anche in presenza di infezione con Pa. Intendiamo inoltre valutare l'effetto di GM1 sull'interazione ospite-patogeno in modelli di FC *in vitro* e *in vivo*.

## Metodi

L'implicazione di GM1 e del colesterolo come coadiuvanti di Kaftrio è stata valutata in cellule delle vie aeree con diverse varianti di CFTR, in termini di effetto sulla sua stabilità del canale anche in presenza di infezione con Pa. L'effetto di questi lipidi sull'interazione ospite-patogeno è stato studiato in termini di internalizzazione di Pa nelle cellule delle vie aeree. L'effetto immunomodulatorio di GM1 è stato valutato in modelli animali di FC sottoposti a infezione acuta e cronica da Pa.

## Risultati preliminari

Abbiamo osservato che: i) l'espressione di diverse varianti del CFTR influisce sulla composizione della MP delle cellule epiteliali bronchiali, ii) l'uso di GM1, dei suoi analoghi strutturali e del colesterolo migliora l'effetto di Kaftrio aumentando la stabilità in MP del canale mutato senza causare effetti tossici e in presenza di infezione con Pa, iii) il GM1 ripristina l'eliminazione di Pa nelle cellule epiteliali bronchiali che esprimono F508del-CFTR, iv) il trattamento con GM1 non è tossico e aumenta l'attività del sistema immunitario nell'eliminazione di Pa in topi sottoposti a infezione cronica.

## Conclusioni

I risultati di questo studio contribuiscono a definire il ruolo fondamentale del microambiente lipidico di CFTR nella stabilità in MP. Inoltre, rappresentano il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'associazione di lipidi con correttori e potenziatori, per migliorare l'efficacia dei trattamenti nelle persone con FC e per migliorarne lo stato infiammatorio.

## Rescuing rare CFTR mutants with a PI3Kγ mimetic peptide

Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3Kγ



Emilio Hirsch (in the middle) and his research group

8

**Alessandra Murabito<sup>1</sup>, Marco Mergio<sup>1</sup>, Valeria Capurro<sup>2</sup>, Alessia Loffreda<sup>3</sup>, Andrea Raimondi<sup>3</sup>, Carlo Tacchetti<sup>3</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>2</sup>, Alessandra Ghigo<sup>1,4</sup>, Emilio Hirsch<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, University of Turin, Italy - <sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy - <sup>3</sup>Experimental Imaging Center, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>4</sup>Kither Biotech Srl, Turin, Italy (FFC#3/2022, concluded)

## Background and rationale

*Kaftrio (ETI) is currently the standard of care for people with CF (pwCF) carrying the F508del mutation and is approved in the U.S. for pwCF with other CFTR mutants that have shown an increase in chloride transport in vitro. Despite its high clinical efficacy, with improvements in lung function and quality of life, ETI restores F508del-CFTR activity up to 50% of wild type levels. This partial restoration highlights the need for further therapeutic advancements to fully restore CFTR function in pwCF.*

## Hypothesis and objectives

*We hypothesize that the PI3Kγ mimetic peptide (PI3Kγ MP) developed in our lab can enhance the efficacy of ETI therapy by acting as a cAMP-elevating agent. Elevated cAMP has been shown to boost CFTR modulator efficacy by enhancing PKA-mediated CFTR phosphorylation and anchoring the plasma membrane (PM) CFTR at the cytoskeleton. This project aims to determine to what extent PI3Kγ MP improves ETI efficacy and to further explore the underlying mechanisms.*

## Essential methods

*CFTR activity was assessed by Ussing chamber measurements in F508del/G542X primary bronchial epithelial cells. To study the mechanism of action of the peptide, cell surface biotinylation, streptavidin pulldown, cycloheximide (CHX) pulse-chase, western blotting, and phosphoproteomics were performed in immortalized cell lines (HEK293t, and F508del-CFBE41o-).*

## Results

*In primary F508del/G542X HBE cells, treatment with ETI and PI3Kγ MP increased total CFTR activity by 25% compared to ETI alone, suggesting an increase in channel density at the membrane. This was confirmed by experiments showing that the combination of PI3Kγ MP and ETI significantly enhanced the amount of corrected CFTR at the PM compared to ETI alone. Furthermore, we also demonstrated that PI3Kγ MP doubled the stability of corrected F508del-CFTR, suggesting that the peptide acts as a stabilizer. Phosphoproteomic analysis identified PKD1 (Protein Kinase D1), a known regulator of cytoskeletal dynamics, recycling, and endocytosis of membrane proteins, as a possible mediator of the stabilizing effects of PI3K MP. Accordingly, inhibition of PKD1 blocked the increase of F508del-CFTR at the membrane induced by PI3Kγ MP and ETI, confirming the role of PKD1 in CFTR stabilization.*

## Conclusions

*With this project, we identified PI3Kγ MP as a new effective approach to stabilize pharmacologically corrected F508del-CFTR at the PM and to increase the therapeutic effect of ETI.*



<b>Razionale dello studio</b>	Kaftrio (ETI) è attualmente lo standard di cura per persone con fibrosi cistica (pFC) con mutazione F508del ed è approvato negli USA per pFC con altri mutanti che hanno mostrato un aumento del trasporto di cloruro <i>in vitro</i> . Nonostante la sua elevata efficacia clinica, ETI ripristina l'attività del F508del-CFTR al 50% dei livelli del wild type. Questo ripristino parziale evidenzia la necessità di trovare nuove molecole per ripristinare completamente la funzione CFTR.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Nello studio ipotizziamo che il peptide mimetico della PI3K $\gamma$ (PI3K $\gamma$ MP) possa aumentare l'efficacia della terapia ETI elevando il cAMP. È stato dimostrato infatti che un aumento nel livello di cAMP migliora l'efficacia dei modulatori aumentando la fosforilazione di CFTR e ancorando il canale in membrana plasmatica al citoscheletro. Questo progetto mira a determinare se, e in che misura, PI3K $\gamma$ MP migliora l'efficacia di ETI e a esplorare ulteriormente i meccanismi sottostanti.
<b>Metodi</b>	L'attività CFTR è stata valutata con misurazioni in camera di Ussing in cellule epiteliali bronchiali primarie F508del/G542X. Per studiare il meccanismo d'azione del peptide, abbiamo impiegato biotilizzazione e pulldown con streptavidina, chase con cicloesimide (CHX), western blotting e fosfo-proteomica in linee cellulari.
<b>Risultati</b>	In cellule primarie con genotipo F508del/G542X, il trattamento con ETI e PI3K $\gamma$ MP ha aumentato l'attività totale di CFTR del 25% rispetto a ETI da solo, suggerendo un aumento della densità del canale alla membrana. Questo è stato confermato da esperimenti che hanno rivelato come il PI3K $\gamma$ MP combinato con ETI aumenti la quantità di CFTR corretto alla membrana plasmatica rispetto a ETI da solo. Inoltre, abbiamo anche dimostrato che PI3K $\gamma$ MP raddoppi la stabilità di F508del-CFTR corretto, suggerendo che il peptide agisca come stabilizzatore. L'analisi fosfo-proteomica ha identificato come modulata dal peptide PKD1 (protein kinasi D1), proteina coinvolta nella dinamica del citoscheletro, così come nel riciclaggio e nell'endocitosi delle proteine di membrana. L'inibizione di PKD ha bloccato l'aumento di F508del-CFTR in membrana indotto da PI3K $\gamma$ MP ed ETI, confermando il ruolo di PKD1 nella stabilizzazione di CFTR.
<b>Conclusioni</b>	Questo progetto evidenzia il potenziale del PI3K $\gamma$ MP come strategia terapeutica per stabilizzare F508del-CFTR alla membrana plasmatica, migliorando così l'efficacia della terapia ETI e aprendo nuove prospettive future.

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

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



Left to right: Irene Carrozzo, Elena Gurrieri, Marta Stancampiano, Alessandro Umbach, Giulia Maule, Anna Cereseto, Francesca Zerbini

9

#### Giulia Maule

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

(GMSG#1/2022, ongoing)

### Background and rationale

*Advancement in genome editing technologies have enabled the development of efficient correction strategies for several CFTR mutations which were validated in people with cystic fibrosis (CF) derived experimental models. Despite the growing enthusiasm, the delivery methods remain still very inefficient thus significantly limiting the translation to the clinic, especially in lungs being the leading cause of morbidity and mortality in people with CF. Promising delivery methods consist of engineered extracellular vesicles, biocompatible particles with tunable tissue tropisms.*

### Hypothesis and objectives

*In this study we aim at developing genome editing vesicles, GE-vesicles, a new and effective system to deliver genome editing technologies as ribonucleoprotein complex to target the airway epithelia cells for CF treatment. This approach will result in a limited lifespan of cargo expression in target cells, to achieve correction of CFTR gene without generating unwanted alteration in the genome.*

### Essential methods

*We incorporated into GE-vesicles the adenine base editor ABE8e-SpCas9. We optimized the production of these particles by maximizing the amount of editor and sgRNA incorporated into the vesicles. The particles were characterized for size, particles number and editor content.*

### Preliminary results

*Several sgRNAs targeting different CFTR exons were tested in HEK293T and CFBE41o- cell lines, reaching up to 60% of base conversion proving GE-vesicles as an efficient delivery method. We are currently testing GE-vesicles to correct some of the most frequent CF-causing nonsense mutations (R553X, R1162X and W1282X). To achieve an efficient delivery of the genome editing complex to airway cells, we plan to alter the tropism of GE-vesicles exploiting envelopes from different viruses. We are currently evaluating the efficacy of selected envelopes to enter the polarized airway epithelial cells from people with CF by measuring editing efficiency in the CFTR gene. Moreover, to evaluate delivery efficiency in vivo we will exploit the use of mice expressing a reporter that will switch from Tomato to GFP expression upon Cre recombination. For this purpose, we will produce vesicles containing Cre recombinase as cargo.*

### Conclusions

*The development of this new delivery system will lead to an advancement in the treatment of people with CF, since the delivery in the lung tissue is still one of the main obstacles in the search for a cure. The developed GE-vesicles system could also be used for other lung diseases or be further adapted to specifically target other tissues, expanding its applications for genetic diseases treatment.*

## Razionale dello studio

Il progresso delle tecnologie per l'editing genomico ha consentito lo sviluppo di nuove strategie per correggere mutazioni nel gene CFTR che si sono dimostrate efficienti in modelli sperimentali derivati da persone con fibrosi cistica (FC). Nonostante l'entusiasmo crescente, il trasporto (*delivery*) di queste tecnologie nei polmoni, principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti, è inefficiente, limitando il loro impiego in clinica. Un metodo di *delivery* promettente consiste in vescicole extracellulari ingegnerizzate, particelle biocompatibili con tropismo regolabile.

## Ipotesi e obiettivi

In questo studio ci proponiamo di sviluppare vescicole per l'editing genomico, *GE-vesicles*, un sistema nuovo e efficace per trasportare strumenti di editing genomico sotto forma di ribonucleoproteine nelle cellule delle vie aeree per trattare la FC. Questo sistema consente un'espressione del cargo nelle cellule target limitata, permettendo la correzione di CFTR senza generare alterazioni indesiderate nel genoma.

## Metodi

Abbiamo incorporato nelle *GE-vesicles* il base editor ABE8e-SpCas9 e ottimizzato la produzione massimizzando la quantità di editor e sgRNA incorporati. Le vescicole sono state caratterizzate per dimensioni, numero di particelle e quantità di editor.

## Risultati preliminari

Sono stati testati numerosi sgRNAs con target CFTR in cellule HEK293T e CFBE41o-, raggiungendo fino al 60% di efficienza di editing, dimostrando che *GE-vesicles* sono un metodo di *delivery* efficiente. Attualmente stiamo testando le *GE-vesicles* per correggere le mutazioni missenso più frequenti che causano la FC (R553X, R1162X e W1282X).

Per il *delivery* di editor genomici nelle vie aeree vogliamo modificare il tropismo delle *GE-vesicles* sfruttando *envelope* virali. La loro efficacia verrà misurata in cellule epiteliali polarizzate delle vie aeree di persone con FC, misurando l'efficienza di editing nel gene CFTR, e *in vivo*, usando topi reporter esprimenti proteine fluorescenti. A tal fine, produrremo vescicole contenenti la ricombinasi Cre che promuoverà la conversione della fluorescenza da Tomato a GFP.

## Conclusioni

Lo sviluppo di questo nuovo sistema porterà a un avanzamento nel trattamento della FC, poiché il *delivery* nel tessuto polmonare è tuttora uno dei principali ostacoli nella ricerca di una cura. Il sistema *GE-vesicles* sviluppato potrebbe anche essere usato per altre malattie polmonari o ulteriormente adattato per mirare specificamente ad altri tessuti, espandendo le sue applicazioni per il trattamento delle malattie genetiche.

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

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



In the first pic, left to right: Danila Delfino, Claudio Rivetti, Giulia Mori and Ricardo Percudani. In the second pic, Antonella Grigoletto and Gianfranco Pasut. In the third pic, Rosaria Casciaro.

10



**Giulia Mori<sup>1</sup>, Danila Delfino<sup>1</sup>, Antonella Grigoletto<sup>2</sup>, Gloria Bizzotto<sup>2</sup>, Benedetta Campara<sup>2</sup>, Claudio Rivetti<sup>1</sup>, Giovanni Merici<sup>1</sup>, Francesca Buttini<sup>5</sup>, Stefania Glieca<sup>5</sup>, Nicola Tirelli<sup>4</sup>, Rosaria Casciaro<sup>3</sup>, Gianfranco Pasut<sup>2</sup>, Riccardo Percudani<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Italy -

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua, Italy - <sup>3</sup>Cystic Fibrosis Center, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy - <sup>4</sup>Italian Institute of Technology (IIT), Genoa, Italy - <sup>5</sup>Department of Food and Drug, University of Parma, Italy

(FFC#14/2022, concluded)

## Background and rationale

*DNase treatment for cystic fibrosis (CF) is needed for people who don't benefit from corrector therapy. Improving drug properties through bioconjugation and using DNase1L2, with actin resistance and acidic pH activity, could enhance therapy.*

## Hypothesis and objectives

*We aim to enhance the pharmacological properties of DNase1 (rhDNase) through PEGylation, and complete preclinical evaluation of DNase1L2 by expanding its activity with bioconjugation and protein engineering.*

## Essential methods

*Three PEGylated rhDNase variants were created: PEG20kDa (N-terminus), PEG2kDa-aldehyde, and PEG24mer-NHS (lysines). In vitro activity was tested via rheological analysis on artificial mucus, with/without actin. Aerodynamic properties of PEG24mer-rhDNase were evaluated using Next Generation Impactor (NGI) and eFlow nebulizer. Recombinant DNase1L2 was expressed in Pichia pastoris and Escherichia coli as an MBP fusion. Ancestral sequence reconstruction (ASR) was performed for rhDNase and DNase1L2 using GRASP, with genes expressed in E. coli as His-tagged proteins. DNase activity was assessed using supercoiled DNA. PEGylated DNase1L2 variants were analyzed for conjugation sites. Mucus samples were collected post-physiotherapy and stored at -80°C.*



## Results

PEG2kDa-rhDNase showed 2.95 polymer chains per protein with 71.4% activity, PEG24mer-rhDNase had 2.47 chains with 33.7% activity, and PEG20kDa-rhDNase had one chain with 83.8% activity. PEG24mer-rhDNase demonstrated significant resistance to actin inhibition and better viscosity reduction than other variants. NGI tests indicated a higher fine particle fraction for PEG24mer-rhDNase, with deeper deposition compared to native rhDNase. Expression of DNase1L2 in *E. coli* with an MBP tag prevented inclusion bodies, but tag removal rendered the protein unsuitable for further studies. Expression in *P. pastoris* yielded active glycosylated protein at low yield. Two ancestral DNases expressed in *E. coli* showed excellent catalytic properties. mPEG24mer conjugated primarily to three lysines on DNase1L2, away from the active site. DNase1L2 conjugates included PEG2kDa-aldehyde, PEG20kDa (N-terminus), and Z-Gln-Gly-mPEG20kDa (lysines). Protocols for DNase1L2 activity on patient mucus were established at the Italian Institute of Technology.

## Conclusions

PEGylation of rhDNase with shorter polymer chains emerged as the most promising strategy. Nebulization of PEG24mer-rhDNase achieved the highest respirable fraction. Ancestral DNases demonstrated strong potential as therapeutic proteins.

## Razionale dello studio

Il trattamento con DNasi per la fibrosi cistica (FC) è necessario per le persone con FC che non rispondono alla terapia correttiva. Migliorare le proprietà del farmaco tramite bioconiugazione e usare DNasi1L2, resistente all'actina e attiva a pH acido, potrebbe migliorare i risultati terapeutici.

## Ipotesi e obiettivi

L'obiettivo è potenziare l'efficacia mucolitica della DNasi1 (rhDNase) tramite PEGilazione e completare la valutazione preclinica di DNasi1L2 ampliando il suo spettro d'azione con bioconiugazione e ingegneria proteica.

## Metodi

Sono state create tre varianti PEGilate di rhDNase: PEG20kDa (N-terminale), PEG2kDa-aldeide e PEG24mer-NHS su lisine. L'attività *in vitro* è stata valutata tramite analisi reologica su muco artificiale con/senza actina. Le proprietà aerodinamiche di PEG24mer-rhDNase sono state testate con NGI e nebulizzatore eFlow. La DNasi1L2 è stata espressa in *Pichia pastoris* ed *Escherichia coli* come fusione MBP. La ricostruzione ancestrale (ASR) di rhDNase e DNasi1L2 è stata fatta con GRASP e i geni sono stati espressi in *E. coli* come proteine con His-tag. L'attività è stata testata su DNA plasmidico. Le varianti PEGilate sono state analizzate per i siti di coniugazione. I campioni di muco sono stati raccolti dopo fisioterapia e conservati a -80°C.

## Risultati

PEG2kDa-rhDNase ha rivelato 2,95 catene con un'attività del 71,4%, PEG24mer-rhDNase 2,47 catene con il 33,7% e PEG20kDa una catena con l'83,8% di attività. PEG24mer-rhDNase ha mostrato resistenza all'actina e riduzione della viscosità migliore rispetto alle altre varianti e rhDNase non modificata. I test NGI hanno indicato una frazione di particelle fini più alta e una deposizione più profonda per PEG24mer-rhDNase rispetto alla rhDNase nativa. L'espressione di DNasi1L2 in *E. coli* con tag MBP ha evitato i corpi di inclusione, ma la rimozione del tag ha reso la proteina inadatta. L'espressione in *P. pastoris* ha prodotto proteina attiva con una bassa resa. Due DNasi ancestrali in *E. coli* hanno mostrato buone proprietà catalitiche. Il mPEG24mer si è coniugato principalmente a tre lisine della DNase1L2, lontano dal sito attivo. I coniugati di DNase1L2 comprendevano PEG2kDa-aldeide, PEG20kDa (N-terminale) e Z-Gln-Gly-mPEG20kDa (lisine). I protocolli per testare l'attività della DNase1L2 sul muco dei pazienti sono stati stabiliti presso l'Istituto Italiano di Tecnologia.

## Conclusioni

La PEGilazione con catene più corte è risultata la strategia migliore. La nebulizzazione di PEG24mer-rhDNase ha raggiunto la frazione respirabile più alta. Le DNasi ottenute tramite ASR hanno mostrato un forte potenziale terapeutico.

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

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



Left to right: Carlo Vetrano, Giacomo Cappella, Maria Luisa Mangoni, Bruno Casciaro. Second picture: Arianna Venturini. Third picture: Mattia Mori



### **Maria Luisa Mangoni<sup>1</sup>, Arianna Venturini<sup>2</sup>, Mattia Mori<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Italy - <sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>3</sup>Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy

**(FFC#4/2022, concluded)**

## Background and rationale

The most common mutation in people with cystic fibrosis (CF) is the deletion of phenylalanine 508 in the CFTR channel of epithelial cells, including those at the airways. This mutation significantly hinders CFTR trafficking to the cell surface and the function of channel gating. While current CFTR modulators are effective in restoring defective CFTR function, treatment of pulmonary infections remains a major challenge, especially in people with advanced lung disease. Recently, we discovered two antimicrobial peptides (AMPs), Esc(I-21) and Esc(I-21)-1c (known as Esc peptides), that can promote repair of damaged bronchial epithelium and reduce lung bacterial load in mice with pulmonary infection due to *Pseudomonas aeruginosa* (the main pathogen in CF lung), when administered directly into the trachea. Additionally, we found that Esc peptides have a unique ability to enhance the function of F508del-CFTR, which is a novel finding.

11

<b>Hypothesis and objectives</b>	<i>The project aimed at i) studying the effect of Esc peptides on the ion currents mediated by other mutated forms of CFTR (including missense G551D or G1349D mutations which impair CFTR channel opening); ii) optimizing their efficacy for the dual (antimicrobial and CFTR potentiator) function and iii) evaluating the capability of the optimized peptides to preserve antibacterial activity in CF-mimicking lung environment.</i>
<b>Essential methods</b>	<i>A multidisciplinary approach combining electrophysiological, biochemical, cell biology and computational methods, as well as mouse models for in vivo studies.</i>
<b>Results</b>	<i>We demonstrated that Esc peptides can increase the CFTR-dependent transepithelial conductance in primary bronchial epithelial cells, homozygous/heterozygous for F508del, as well as in Fisher Rat Thyroid cells expressing G551D and G1349D-CFTR, as found for genistein. Remarkably, the presence of a non-coded amino acid in the primary structure of Esc(1-21) was found to expand its spectrum of activity towards Gram-positive bacteria (like <i>Staphylococcus aureus</i>) also relevant in CF, without altering the potentiator effect on CFTR mutants and without giving cytotoxicity. By computational studies, it was also demonstrated that the selected and optimized peptides bind to the nucleotide binding domain 1 (NBD1) of CFTR, presumably stabilizing the open conformation of the channel pore. Notably, the most promising peptides for the dual antimicrobial and CFTR potentiator function were also found to preserve anti-<i>Pseudomonas</i> efficacy under in vitro and in vivo conditions mimicking CF lung for the presence of a sticky and dehydrated mucus.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>We identified peptides with the ability not only to act as antibacterial drugs in CF lung environment but also to rescue the function of CFTR with ions conductance defect. This effect opens the avenue for novel therapeutic strategy to address pulmonary pathology in CF, likely upon delivery of the selected compounds in the conductive airways.</i>

<b>Razionale dello studio</b>	La mutazione più comune in persone con fibrosi cistica (FC) è la perdita di fenilalanina 508 nella proteina canale CFTR presente nella membrana degli epitelii, compresi quelli delle vie aeree. Questa mutazione compromette gravemente la migrazione di CFTR verso la superficie cellulare e altera i meccanismi di apertura del canale. Nonostante gli attuali modulatori di CFTR siano efficaci nel ripristinare l'attività della proteina difettosa, il trattamento delle infezioni polmonari resta una grande sfida, soprattutto negli stadi avanzati della malattia. Recentemente abbiamo scoperto due peptidi antimicrobici (AMP), Esc(1-21) ed Esc(1-21)-1c (denominati peptidi Esc), che sono in grado di promuovere la riparazione dell'epitelio bronchiale danneggiato e di ridurre la carica batterica nel polmone di topi con infezione polmonare da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (principale patogeno nel polmone delle persone con FC), dopo somministrazione intra-tracheale. Inoltre, abbiamo scoperto una proprietà mai descritta degli AMP, ovvero la capacità dei peptidi Esc di agire come potenziatori di F508del.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Il progetto aveva lo scopo di i) studiare l'effetto dei peptidi Esc sulle correnti ioniche mediate da CFTR con altre mutazioni (incluse quelle missense G551D o G1349D); ii) ottimizzare la loro efficacia per la doppia funzione (antimicrobica e potenziatrice di CFTR) e iii) valutare la capacità dei peptidi selezionati di preservare l'attività antibatterica in condizioni simili a quelle del polmone FC.
<b>Metodi</b>	Approccio multidisciplinare con metodi elettrofisiologici, biochimici, di biologia cellulare e computazionali, nonché l'uso di modelli animali.
<b>Risultati</b>	Abbiamo dimostrato che i peptidi Esc sono in grado di aumentare la conduttanza trans-epiteliale dipendente da CFTR in epitelii di cellule bronchiali primarie omozigoti/eterozigoti per la mutazione F508del così come in cellule di tiroide di ratto che esprimono CFTR con mutazione G551D e G1349D con un effetto simile a quello della genisteina. La presenza di un amminoacido non convenzionale nel peptide Esc(1-21) è in grado di ampliare il suo spettro d'azione, anche contro batteri Gram-positivi (come lo <i>Staphylococcus aureus</i> ) pure rilevanti in FC senza alterarne l'effetto potenziatore e senza danneggiare le cellule umane. Attraverso studi computazionali è stato anche dimostrato come i peptidi selezionati e ottimizzati siano in grado di legare il <i>nucleotide binding domain 1</i> (NBD1) di CFTR, stabilizzando la conformazione aperta del canale. Interessante notare come i peptidi più promettenti per la duplice funzione antimicrobica e potenziatrice di CFTR siano in grado di mantenere l'efficacia anti- <i>Pseudomonas</i> (sia <i>in vitro</i> che <i>in vivo</i> ) in condizioni che simulano il polmone di persone con FC per la presenza di un muco appiccicoso e disidratato.
<b>Conclusioni</b>	Abbiamo identificato peptidi con la capacità non solo di agire come antibiotici nel polmone FC, ma anche di recuperare la funzione di CFTR con difetti di conduttanza. Questo effetto apre la strada per lo sviluppo di una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia polmonare della FC, probabilmente in seguito a somministrazione dei composti selezionati nelle vie aeree.

Development of new potentiators active on (ultra) rare mutants of CFTR

Ottimizzazione di nuovi potenziatori attivi su mutazioni (ultra)rare di CFTR



Giovanni Marzaro (second row, in the middle) and his collaborators

12

**Giovanni Marzaro<sup>1,2</sup>, Gergely Lukacs<sup>3</sup>, Tamas Hegedus<sup>4</sup>, Adriana Chilin<sup>2</sup>, Stefano Negri<sup>2</sup>, Guido Veit<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Diagnostic and Public Health, University of Verona, Italy - <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Padua, Italy - <sup>3</sup>Department of Physiology, McGill University, Canada - <sup>4</sup>Biophysical Virology Research Group, Hungarian Research Network, Hungary (FFC#1/2024, new)

### Background and rationale

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations that lead to the functional expression defect of the CFTR ion channel. There is an unmet need to improve the functional correction efficacy of CF mutations that have poor susceptibility to the best available CFTR-modulator Kaftrio. We identified 40 rare mutations that display < 20% of WT-CFTR activity and partially corrected gating defects upon Kaftrio exposure. These mutants require novel therapeutic intervention(s).

### Hypothesis and objectives

The additive effect of preclinical class-II potentiators in combination with VX-445 (class-III) and VX-770 (class-I) potentiators, led to the recognition that gating defective CFTR variants can be further activated by additional small molecules. We posit that poor pharmacophore properties of available class-II potentiators can be significantly improved, which would be beneficial for CFTR variants that exhibit < 20% of WT-CFTR activity upon Kaftrio treatment and partially corrected gating defects. Our objective is to develop poly-specific class-II potentiators that additively activate the gating of several CFTR mutants in combination with VX-770 and VX-445.

### Essential methods

Hit-to-lead optimization to further improve the rescue potency and efficacy of our best class-II potentiator hits will be conducted by medicinal chemistry, in silico docking, and iterative structure-activity relationship determination. Functional studies on several poorly responsive CFTR2 variants will be conducted in immortalized and primary human airway cells. The potentiation mechanism, as well as pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity profile of the best compounds will be established.

### Preliminary results

We have identified correctors that synergize with approved drugs. We have also developed new pre-clinical class-II potentiators that significantly improved the G551D-, N1303K- and S549N-CFTR function in concert with the class-I and -III potentiators and correctors of Kaftrio. The class-II potentiators have favorable pharmacokinetic properties.

### Conclusions

A novel class-II potentiators that additively act with class-I and -III potentiators on CFTR2 mutations with poor responsiveness to approved CFTR-modulators will be developed. Extensive in vitro and in vivo studies have been planned. Our project aims at the development of more effective and tailored therapies for people with CF bearing rare mutations with low responsiveness to available treatments.

### Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni che portano a difetti funzionali nel canale ionico CFTR. È necessario sviluppare nuovi farmaci per le mutazioni che sono poco sensibili al Kaftrio, il miglior farmaco a disposizione per il trattamento della FC. Abbiamo identificato 40 mutazioni rare che hanno mostrato un ripristino dell'attività di CFTR, inferiore del 20% rispetto alla proteina wild type dopo trattamento con Kaftrio.

### Ipotesi e obiettivi

L'effetto additivo di potenziatori di classe II con potenziatori di classe III (VX-445) e di classe I (VX-770), ha portato alla scoperta che mutazioni di *gating* di CFTR possono essere potenziate da nuove classi di piccole molecole. Riteniamo che la scarsa attività dei potenziatori di classe II attualmente disponibili possano essere migliorate in modo significativo, portando a notevoli vantaggi per il trattamento delle varianti di CFTR che presentano < 20% dell'attività di WT-CFTR e solo parziale correzione dopo il trattamento con Kaftrio. Il nostro obiettivo è sviluppare potenziatori di classe II polispecifici che potenzino in modo additivo diversi mutanti di CFTR in combinazione con VX-770 e VX-445.

### Metodi

L'aumento della potenza e dell'efficacia dei nostri potenziatori di classe II verrà condotta mediante cicli iterativi di sintesi, *docking* molecolare e determinazione del rapporto struttura-attività. Gli studi funzionali verranno condotti in cellule immortalizzate e in cellule primarie esprimenti mutanti di CFTR poco responsivi a Kaftrio. Il meccanismo di potenziamento, il profilo di tossicità e il profilo farmacocinetico verranno determinati per le molecole più promettenti.

### Risultati preliminari

Abbiamo sviluppato nuovi correttori che sinergizzano con farmaci noti e individuato nuovi potenziatori di classe II che, in combinazione con Kaftrio, hanno mostrato un significativo aumento dell'attività di mutanti di CFTR (G551D, N1303K e S549N). I composti individuati hanno mostrato una farmacocinetica promettente.

### Conclusioni

Svilupperemo una nuova famiglia di potenziatori di classe II in grado di agire in maniera sinergica con i potenziatori di classe I e III sulle mutazioni rare di CFTR che rispondono solo in maniera parziale alle terapie attualmente approvate. Sono stati pianificati sia studi *in vitro* (farmacodinamica) che *in vivo* (farmacocinetica). Il progetto mira allo sviluppo di terapie più efficaci e personalizzate per le persone con FC poco responsive ai trattamenti in uso.



Promoting correct folding to enhance F508del-CFTR rescue induced by correctors

Promuovere il corretto ripiegamento della proteina CFTR mutata per potenziare l'azione dei correttori



Mauro Salvi (in the middle) with his collaborators

13

**Christian Borgo, Marika Pia Nunzia Coviello, Francesca Noventa, Luca Cesaro, Mauro Salvi**

Department of Biomedical Sciences, University of Padua, Italy

(FFC#3/2024, new)

### Background and rationale

*Kaftrio, a groundbreaking combination therapy involving two correctors (VX-445/VX-661) and one potentiator (VX-770), has revolutionized the treatment for patients with the F508del mutation. It has now become the forefront of current pharmacological treatment for people with CF who have at least one F508del mutation in the CFTR gene and has been extended to several other misfolded mutations and the possibility to extend its use is still under investigation. Nevertheless, the improvement of Kaftrio therapy is both necessary and achievable. This is particularly crucial given the expansion of Kaftrio to a substantial number of class II mutants, whose effectiveness may be suboptimal and in need of enhancement.*

### Hypothesis and objectives

*This study aims to investigate the role of the heat shock proteins (HSPs), in the functional recovery of F508del-CFTR induced by correctors. The HSPs are chaperones which exert an opposite effect on protein biogenesis: facilitate the folding and if they do not succeed, they target the unfolded protein to degradation. Our hypothesis is that when a misfolded protein is targeted for degradation by prolonged association with HSPs, in the presence of correctors that improve protein folding, an active chaperone machinery can facilitate their action.*

### Essential methods

*CFBE41o- cells expressing F508del-CFTR will be treated with HSPs activators in presence or absence of VX-445/VX-661. The functional rescue of the channel will be quantified by western blotting and by the Halide YFP assay. Moreover, channel stability will be assayed by cycloheximide and CFTR expression by qPCR. The most promising compounds alone or in combination will be assayed in primary patient cells homozygous for F508del-CFTR (Ussing chamber). Experiments on primary cells will be conducted in collaboration with FFC Ricerca CFaCore and Primary Culture Service.*

### Preliminary results

*Preliminary findings indicate that four small molecule activators of the chaperone machinery improve the rescue of F508del-CFTR in CFBE41o- cells expressing F508del-CFTR induced by the combination of the correctors VX-445 and VX-661.*

### Conclusions

*This project will clarify the role of heat shock machinery in F508del-CFTR rescue identifying potential synergistic or additive actions with the correctors.*

### Razionale dello studio

Kaftrio, una terapia combinata innovativa che comprende due correttori (VX-445/VX-661) e un potenziatore (VX-770), ha rivoluzionato il trattamento delle persone con fibrosi cistica (FC) con la mutazione F508del. Il Kaftrio è diventato il trattamento farmacologico di punta per le persone con FC che presentano almeno una mutazione F508del nel gene CFTR. L'efficacia di questo trattamento è stata dimostrata anche su mutazioni diverse da F508del e la possibilità di un'ulteriore estensione del suo uso è ancora in fase di studio. Tuttavia, il miglioramento della terapia con Kaftrio è necessario e realizzabile. Ciò è particolarmente cruciale data l'espansione di Kaftrio a un numero sostanziale di mutanti di classe II, la cui efficacia potrebbe essere subottimale.

### Ipotesi e obiettivi

Questo studio si propone di indagare il ruolo delle *heat shock protein* (HSPs) nel recupero funzionale di F508del-CFTR indotto dai correttori. Le HSPs sono *chaperone* che svolgono un duplice ruolo, da un lato favorendo il ripiegamento delle proteine e dall'altro dirigendo le proteine mal ripiegate verso la degradazione. La nostra ipotesi è che l'attivazione delle HSPs, in presenza di correttori che favoriscono un ripiegamento corretto di F508del-CFTR, possa incrementare l'azione dei correttori.

### Metodi

Le cellule CFBE41o- che esprimono F508del-CFTR saranno trattate con attivatori delle HSPs in presenza o in assenza di VX-445/VX-661. Il recupero funzionale del canale sarà quantificato mediante western blotting e saggio YFP. Inoltre, la stabilità del canale sarà valutata mediante saggio con cicloeximide e l'espressione di CFTR mediante qPCR. I composti più promettenti, da soli o in combinazione, saranno testati in cellule primarie di pazienti omozigoti per F508del-CFTR (camera di Ussing). Gli esperimenti su cellule primarie saranno condotti in collaborazione con il CFaCore e il Servizio Colture Primarie di FFC Ricerca.

### Risultati preliminari

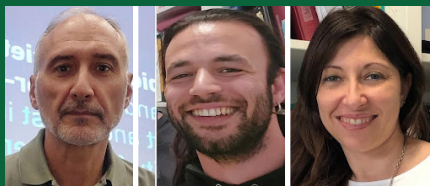
I risultati preliminari indicano che quattro piccole molecole attivatrici delle HSPs migliorano il recupero funzionale di F508del-CFTR nelle cellule bronchiali umane CFBE41o- indotto dalla combinazione dei correttori VX-445 e VX-661.

### Conclusioni

Questo progetto chiarirà il ruolo delle HSPs nel recupero funzionale di F508del-CFTR identificando potenziali effetti additivi o sinergici con i correttori.

Targeting bacterial small RNA to develop non-traditional therapeutic options against *Pseudomonas aeruginosa*

Sviluppo di terapie non tradizionali contro *Pseudomonas aeruginosa* agendo su piccoli RNA batterici



First row, left to right: Giovanni Bertoni, Tarcisio Brignoli, Silvia Ferrara. Second row, left to right: Juliana Mazraani, Ikram Dafir Billah, Saira Arfan, Silvia Paparoni

14

**Giovanni Bertoni<sup>1</sup>, Silvia Ferrara<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biosciences, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>CNR Institute of Biophysics, Milan, Italy

(FFC#5/2024, new)



### Background and rationale

The increase in resistance to antibiotics, together with the delay in discovering new antibacterials, is drastically limiting our ability to fight pathogenic bacteria. The development of molecules with anti-virulence effects and/or capable of resensitizing resistant strains to antibiotics is an emerging approach that can produce targeted antibacterial therapies in cystic fibrosis (CF). From this perspective, bacterial small RNAs represent an unexploited category of therapeutic targets. We showed that the small RNA *ErsA* of *Pseudomonas aeruginosa*, an important pulmonary pathogen in CF, is involved in the regulation of several functions linked to lung pathogenesis and antibiotic resistance. We found that a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain in which *ErsA* is deleted fails to form a mature biofilm and is significantly less virulent than the wild type after infection of both bronchial epithelial cells and a mouse model. Moreover, the deletion of *ErsA* induces sensitization to ceftazidime, cefepime, and meropenem in a multidrug-resistant clinical strain.

### Hypothesis and objectives

It is expected that the development of anti-*ErsA* molecules will lead to multi-functional drugs that have antivirulence and antibiotic adjuvant activity at the same time. To develop anti-*ErsA* molecules, we set out to design and test oligomers, called PNAs, that bind to *ErsA* and prevent its regulatory function. Consequently, they were expected to cause the same phenotypes observed in *ErsA* knockout mutants. This project aims to continue the work done in previous FFC Ricerca-funded projects in which we developed and tested a collection of anti-*ErsA* PNAs. Specifically, this project aims to optimize the most effective anti-*ErsA* PNAs that we have developed to date and then test them in a preclinical mouse model of infection for their ability to resensitize a multidrug-resistant strain of *P. aeruginosa* to meropenem.

### Essential methods

We will develop a pipeline to optimize the anti-*ErsA* PNAs on bacterial cells cultured *in vitro* and test their efficacy in a mouse infection model.

### Preliminary results

We have shown that targeting *ErsA* with PNAs can interfere with its regulatory function. Most importantly, we provided evidence on the ability of anti-*ErsA* PNAs to resensitize to meropenem a multi-drug resistant clinical strain of *P. aeruginosa*.

### Conclusions

Overall, we expect to provide innovative molecules for further use as anti-*Pseudomonas* drugs as monotherapy or in combination with antibiotic therapies currently used in cystic fibrosis.

### Razionale dello studio

L'aumento della resistenza agli antibiotici, insieme al ritardo nella scoperta di nuovi antibatterici, sta limitando drasticamente la nostra capacità di combattere i batteri patogeni. Lo sviluppo di molecole con effetti antivirulenza e/o in grado di risensibilizzare le varianti resistenti agli antibiotici è un approccio emergente che può fornire terapie antibatteriche mirate in fibrosi cistica. In questa prospettiva, i piccoli RNA batterici rappresentano una categoria non sfruttata di bersagli terapeutici. Abbiamo dimostrato che il piccolo RNA *ErsA* di *Pseudomonas aeruginosa*, un importante patogeno polmonare della fibrosi cistica, è coinvolto nella regolazione di diverse funzioni legate alla patogenesi polmonare e alla resistenza agli antibiotici. Abbiamo mostrato che una variante mutante di *P. aeruginosa* in cui *ErsA* è stato deletato non riesce a formare un biofilm maturo ed è significativamente meno virulenta del tipo selvatico in seguito all'infezione di cellule epiteliali bronchiali e di un modello animale. Inoltre, la delezione di *ErsA* induce sensibilizzazione a ceftazidime, cefepime e meropenem in un ceppo clinico multiresistente.

### Ipotesi e obiettivi

Si prevede quindi che lo sviluppo di molecole anti-*ErsA* porterà a farmaci multifunzionali che abbiano contemporaneamente attività antivirulenza e antibiotica adiuvante. Per sviluppare molecole anti-*ErsA*, ci siamo proposti di progettare e testare oligomeri, chiamati PNA, che si legano a *ErsA* e ne impediscono la funzione regolatoria. Di conseguenza, ci si aspettava che causassero gli stessi fenotipi osservati nei mutanti *ErsA*. Questo progetto mira a proseguire il lavoro svolto in precedenti progetti finanziati da FFC Ricerca, in cui abbiamo sviluppato e testato una collezione di PNA anti-*ErsA*. Nello specifico, questo progetto mira a ottimizzare i PNA anti-*ErsA* più efficaci che abbiamo sviluppato finora e a testarli in un modello preclinico di infezione nel topo per verificarne la capacità di risensibilizzare un ceppo di *P. aeruginosa* multiresistente al meropenem.

### Metodi

Svilupperemo una procedura per ottimizzare i PNA anti-*ErsA* su cellule batteriche coltivate *in vitro* e ne testeremo l'efficacia in un modello di infezione nel topo.

### Risultati preliminari

Abbiamo dimostrato che il targeting di *ErsA* con i PNA può interferire con la sua funzione regolatoria. Soprattutto, abbiamo dimostrato la capacità dei PNA anti-*ErsA* di risensibilizzare al meropenem un ceppo clinico multiresistente di *P. aeruginosa*.

### Conclusioni

Nel complesso, ci aspettiamo di fornire molecole innovative da usare come farmaci anti-*Pseudomonas* in monoterapia o in combinazione con le terapie antibiotiche attualmente usate in fibrosi cistica.



## Targeting quorum sensing to fight *Pseudomonas aeruginosa* infections

Interrompere la comunicazione tra batteri, o *quorum sensing*, per contrastare le infezioni di *Pseudomonas aeruginosa*



First row, left to right: Sandra Gemma, Gabriele Carullo, Andrea Cappelli, Mirko Pineschi. Second row, left to right: Giovanni Di Bonaventura, Arianna Pompilio, Annalisa Chiavaroli, Claudio Ferrante

**Sandra Gemma<sup>1</sup>, Arianna Pompilio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Chemistry and Pharmacy, University of Siena, Italy - <sup>2</sup>Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science, University G. D'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti, Italy

(FFC#7/2024, new)

### Background and rationale

Chronic respiratory infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) are recognized as one of the predominant causes of morbidity and mortality in people with cystic fibrosis (*CF*). *Pa* propensity to grow in biofilms and produce several virulence factors makes it able to resist antibiotics and immune responses. *Pa* employs quorum sensing (*QS*), to regulate virulence and biofilm formation. The *pqs* system, a key *QS* network in *Pa*, controls virulence mechanisms, making it a target for antivirulence compounds.

### Hypothesis and objectives

This project aims to discover novel quinazoline-based antivirulence compounds potentially targeting *PqsR*, a pivotal regulator in *Pa QS*. *PqsR* is central in governing virulence in *P. aeruginosa* physiology and is the most represented *QS* regulator found in *CF* clinical isolates. The project seeks to identify clinically relevant compounds effective against *CF*-related infections.

### Essential methods

Methods used for addressing the expected goals can be divided into: i) medicinal chemistry: computer-aided drug design, synthesis of libraries of *PqsR* modulators, *in silico* prediction and experimental validation of drug-like properties, structure-activity relationship studies, scale-up synthesis, formulation for *in vivo* studies; ii) microbiology: assays for determination of biofilm formation, production of virulence factors (pyocyanin, pyoverdine, elastase, rhamnolipids etc), antibacterial activity (combination studies), cytotoxicity, anti-virulence efficacy in *Galleria mellonella* model; iii) *in vivo* efficacy studies.

### Preliminary results

We already discovered and characterized novel quinazoline-based compounds that impact biofilm formation and virulence factor production in *Pa* strains under *CF*-like conditions without cytotoxic effects. Overall, our studies indicate the promising potential of the hit compounds described here as antivirulence agents.

### Conclusions

The project aims to identify lead compounds with optimal properties for further preclinical and clinical development. The synthesis and characterization of novel antivirulence compounds targeting *PqsR* could offer promising therapeutic options for people with *CF*.

### Razionale dello studio

Le infezioni respiratorie croniche causate da *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) sono riconosciute come una delle principali cause di morbidità e mortalità nelle persone con fibrosi cistica (*FC*). La propensione di *Pa* a crescere in biofilm e a produrre diversi fattori di virulenza rende conto della resistenza agli antibiotici e alla risposta immunitaria. *Pa* usa il *quorum sensing* (*QS*) per regolare la virulenza e la formazione di biofilm. Il sistema *pqs*, che controlla i meccanismi di virulenza, rappresenta un bersaglio promettente per lo sviluppo di composti antivirulenza.

### Ipotesi e obiettivi

Questo progetto è finalizzato alla individuazione di nuovi composti antivirulenza basati sul nucleo chinazolinico, potenzialmente attivi contro *PqsR*, un regolatore fondamentale nel *QS* di *Pa*. *PqsR* ha un ruolo centrale nel controllo della virulenza in *Pa* ed è il regolatore del *QS* più rappresentato negli isolati clinici di persone con *FC*. Il progetto mira a identificare composti clinicamente rilevanti efficaci nei confronti delle infezioni correlate alla *FC*.

### Metodi

I metodi usati per raggiungere gli obiettivi attesi possono essere suddivisi in: i) chimica farmaceutica: progettazione di farmaci computer-assistita, sintesi di librerie di modulatori di *PqsR*, previsione *in silico* e validazione sperimentale delle proprietà farmaco-simili, studi sulla relazione struttura-attività, sintesi su larga scala, formulazioni per studi *in vivo*; ii) microbiologia: saggi di formazione del biofilm, valutazione produzione di fattori di virulenza (piocianina, pioverdina, elastasi, rhamnolipidi ecc.), attività antibatterica (studi di sinergia), citotossicità, efficacia antivirulenza nel modello di infezione in *Galleria mellonella*; iii) studi di efficacia *in vivo*.

### Risultati preliminari

Abbiamo già scoperto e caratterizzato nuovi composti basati sul nucleo chinazolinico in grado di ridurre la formazione di biofilm e la produzione di fattori di virulenza in varianti di *Pa* in condizioni simili alla *FC*, senza effetti citotossici. Nel complesso, i nostri studi indicano un potenziale promettente per i composti identificati come agenti antivirulenza.

### Conclusioni

Il progetto mira a identificare composti guida con proprietà ottimali per ulteriori sviluppi pre-clinici e clinici. La sintesi e la caratterizzazione di nuovi composti antivirulenza con target *PqsR* potrebbero offrire opzioni terapeutiche promettenti per le persone con *FC*.



<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Spain - <sup>2</sup>Emerging Bacterial Pathogens Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>3</sup>Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia - <sup>4</sup>Department of Biology and Biotechnology Lazzaro Spallanzani, University of Pavia, Italy - <sup>5</sup>Research and Development Agency of Aragón (ARAID) Foundation, Spain (FFC#9/2024, new)

**Background and rationale**

VOMG is a new synthetic small water-soluble molecule targeting cell division, highly effective against several cystic fibrosis pathogens such as *Mycobacterium abscessus* (Mab). VOMG was developed thanks to previous projects funded by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (FFC#19/2018, FFC#14/2020, FFC#18/2021). Recently, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators such as Kaftrio have been commercialized. Kaftrio treats different aspects of the CFTR protein, improving the clinical symptoms of people with cystic fibrosis (pwCF).

Over the course of the FFC#18/2021 project, a strong synergistic interaction of VOMG in combination with Kaftrio was identified against Mab and other bacterial pathogens. Preliminary data suggest that this interaction was due to an increased permeability in the cell wall of the bacteria (Italian patent of industrial invention). The combination of VOMG and Kaftrio could constitute a novel dual-activity combination therapy for pwCF: CFTR modulator and enhanced sterilizing antimicrobial activity.

**Hypothesis and objectives**

The objectives of this proposal are: i) to characterize the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) properties of VOMG against Mab, both alone and in combination with Kaftrio; ii) to understand the contribution of Kaftrio to novel antimicrobial therapies against Mab infections in pwCF.

**Essential methods**

*In vitro* PKPD studies of VOMG will be performed using the Hollow Fiber System, a dynamic pre-clinical PKPD model. In addition, *in vivo* studies of the combination VOMG with Kaftrio will be performed in preclinical mouse models of chronic Mab infection.

Furthermore, the interaction profile of Kaftrio with other antimicrobials against Mab will be characterized through *in vitro* screening assays. Selected combinations will be verified by time kill assays against an expanded collection of clinical isolates.

**Preliminary results**

The combination of VOMG with Kaftrio will be further explored in both *in vitro* and *in vivo* models over the next two years. In addition, the interaction of Kaftrio with other antimicrobials will be evaluated against Mab.

**Conclusions**

Characterization of the contribution of Kaftrio to the antimicrobial activity of VOMG and other antimicrobials will advance the development of novel therapeutic strategies for the treatment of Mab infections in pwCF.

**Razionale dello studio**

VOMG è una nuova piccola molecola sintetica idrosolubile che ha come bersaglio la divisione cellulare, altamente efficace contro diversi patogeni rilevanti in fibrosi cistica come *Mycobacterium abscessus* (Mab). VOMG è stata sviluppata grazie a precedenti progetti finanziati da FFC Ricerca (FFC#19/2018, FFC#14/2020, FFC#18/2021). Recentemente sono stati commercializzati modulatori di CFTR come il Kaftrio, che agisce migliorando i sintomi clinici delle persone con fibrosi cistica (FC).

Nel corso del progetto FFC#18/2021, è stata identificata una forte interazione sinergica di VOMG con Kaftrio contro Mab e altri patogeni. I dati preliminari suggeriscono che questa interazione sia dovuta a un aumento della permeabilità della parete cellulare dei batteri (composto brevettato). La combinazione di VOMG e Kaftrio potrebbe costituire una nuova terapia combinata a doppia attività per le persone con FC: da un lato come modulatore di CFTR e dall'altro come antimicrobico.

**Ipotesi e obiettivi**

Gli obiettivi di questo progetto sono: i) caratterizzare le proprietà farmacocinetiche/farmacodinamiche (PKPD) di VOMG contro Mab, sia da solo che in combinazione con Kaftrio; ii) comprendere il contributo di Kaftrio alle nuove terapie antimicrobiche contro le infezioni da Mab nelle persone con FC.

**Metodi**

Gli studi di PKPD *in vitro* di VOMG saranno eseguiti usando il sistema a fibre cave, un modello di PKPD preclinico dinamico. Inoltre, saranno eseguiti studi *in vivo* della combinazione VOMG e Kaftrio in modelli animali preclinici di infezione cronica da Mab.

Inoltre, verrà caratterizzato il profilo di interazione di Kaftrio e altri antimicrobici contro Mab, attraverso saggi di screening *in vitro*. Le combinazioni selezionate saranno verificate con saggi di *time kill* contro un'ampia raccolta di isolati clinici.

**Risultati preliminari**

Il progetto attuale esplorerà ulteriormente la combinazione di VOMG e Kaftrio in modelli *in vitro* e *in vivo*. Inoltre, verrà valutata l'interazione di Kaftrio con altri antimicrobici contro Mab.

**Conclusioni**

La caratterizzazione del contributo di Kaftrio all'attività antimicrobica di VOMG e di altri antimicrobici farà progredire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle infezioni da Mab nelle persone con FC.

**Unraveling proresolving effects, mechanisms, and interactions of CFTR modulators on lung inflammation and infection**

**Comprendere il ruolo dei modulatori di CFTR sulla risoluzione dell'infiammazione e delle infezioni nelle persone con fibrosi cistica**



In the first pic, Antonio Recchuti with his collaborators. In the second pic, Pietro Ripani with his collaborators

17

**Antonio Recchuti**

Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science, University G. D'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti, Italy (FFC#13/2024, new)



**Background and rationale**

*The broad mission of this project is to elucidate how CFTR modulators act on the resolution of inflammation and infections in people with cystic fibrosis (CF). This is crucial since the clinical impact of these drugs on mechanisms regulating inflammation and resolution remains unclear and varies among patients, highlighting significant gaps in our understanding.*

**Hypothesis and objectives**

*The excessive and misdirected inflammatory response in people with CF can stem from basic CFTR defects and be amplified by insufficient activation of specialized pro-resolving mediators (SPM), such as resolvins (Rv) D1 and D2.*

*The overarching hypothesis here is that CFTR modulators enhance resolution by rectifying the synthesis SPM, thereby re-educating inflammation from a deleterious to a protective response. Hence, this project aims to determine the effects of CFTR modulators on SPM biosynthesis and cellular mechanisms of resolution of inflammation and infection in individuals with CF. Moreover, it will investigate whether these effects are associated with drug concentrations in plasma and airway fluids.*

**Essential methods**

*A cross-sectional study will be conducted involving volunteers with confirmed CF who are either on elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI, Kaftrio) therapy (Test group) or are ETI-naïve (Control group). Nasal swabs will be collected for single-cell RNA sequencing (scRNASeq) to analyze gene expression changes and expression of SPM biosynthetic enzymes. Blood and nasal lavage will be collected to quantify SPM and ETI concentrations via LC-MS/MS. Lung function will be assessed using spirometry, and patients will complete quality of life and respiratory symptom questionnaires.*

**Preliminary results**

*SPM concentrations are increased in the plasma of people with CF who have been on ETI therapy for 6 months and in primary macrophages treated with ETI in vitro. RvD1 and RvD2 dampen migration and activation of human and animal CF leukocytes.*

**Conclusions**

*Completing this study will provide insights into the effects of CFTR modulators on the resolution of lung inflammation and their links with SPM and drug concentrations. This wealth of knowledge will inform optimized treatment strategies to improve clinical outcomes for individuals with CF, which is now changing towards a new, unexplored immune milieu.*

**Razionale dello studio**

L'obiettivo di questo studio è chiarire come i modulatori della proteina CFTR agiscano sulla risoluzione dell'infiammazione e delle infezioni nelle persone con fibrosi cistica (FC). Questo è cruciale poiché l'effetto clinico di questi farmaci sui meccanismi che regolano l'infiammazione e la risoluzione rimane poco chiaro e variabile tra i pazienti, evidenziando significative lacune nelle nostre conoscenze.

**Ipotesi e obiettivi**

La risposta infiammatoria eccessiva e mal indirizzata nelle persone con FC può derivare da difetti di base del CFTR e essere amplificata da un'insufficiente attivazione di mediatori specializzati prorisolutivi (SPM), come resolvina (Rv) D1 e D2. L'ipotesi generale è che i modulatori CFTR migliorino la risoluzione correggendo la sintesi degli SPM, rieducando così l'infiammazione da una risposta deleteria a una protettiva. Questo progetto, quindi, mira a determinare gli effetti dei modulatori CFTR sulla biosintesi degli SPM e sui meccanismi cellulari di risoluzione dell'infiammazione e dell'infezione nelle persone con FC. Verrà indagato, inoltre, se questi effetti sono associati alle concentrazioni di elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) raggiunte nel plasma e nei fluidi delle vie aeree.

**Metodi**

Verrà condotto uno studio trasversale che coinvolgerà volontari con FC che sono in terapia con ETI (gruppo di prova) o che non hanno mai assunto ETI (gruppo di controllo). Verranno raccolti tamponi nasali per il sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNASeq) per analizzare i cambiamenti nell'espressione genica e l'espressione degli enzimi biosintetici degli SPM. Campioni di sangue e lavaggio nasale saranno raccolti per quantificare le concentrazioni di SPM e ETI tramite LC-MS/MS. La funzione polmonare sarà valutata tramite spirometria e i pazienti completeranno questionari sulla qualità della vita e sui sintomi respiratori.

**Risultati preliminari**

I dati da esperimenti in corso dimostrano che le concentrazioni di SPM sono aumentate nel plasma delle persone con FC che sono stati in terapia con ETI per 6 mesi e nei macrofagi primari trattati con ETI *in vitro*. RvD1 e RvD2 riducono la migrazione e l'attivazione dei leucociti CF umani e animali.

**Conclusioni**

Questo studio fornirà dati sugli effetti dei modulatori CFTR sulla risoluzione dell'infiammazione polmonare e sui loro legami con gli SPM e le concentrazioni di farmaci. Queste informazioni permetteranno strategie di trattamento ottimizzate per migliorare i risultati clinici per le persone con FC, il cui profilo infiammatorio sta ora cambiando verso un terreno nuovo e inesplorato.



Analysis of the evolution of virulence factors and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis

Analisi dell'evoluzione dei fattori di virulenza e della resistenza antimicrobica di *Pseudomonas aeruginosa* in persone con fibrosi cistica



Left to right: Vanessa Fini, Serena Raimondi, Gianluca Vrenna, Martina Rossitto, Vanessa Tuccio Guarna Assanti, Valeria Fox

18

**Martina Rossitto<sup>1</sup>, Marco Artini<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pediatric Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy -

<sup>2</sup>Department of Public Health and Infectious Diseases, University of Rome Tor Vergata, Italy

(FFC#15/2024, new)

### Background and rationale

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) causes chronic lung infections in people with cystic fibrosis (CF). During its adaptation to the CF lung, *Pa* undergoes changes allowing antibiotic resistance and immune system evasion. How these modifications relate to patient clinical course over time, drug therapies administered, and existing bacterial co-colonization remains unclear. In addition, the impact of modulator therapies on CF lung microbiology remains to be elucidated.

### Hypothesis and objectives

This project aims to study the adaptation of *Pa* over the years of lung colonization; in fact, thoroughly understanding this process will allow tailoring therapeutic approaches to the patient and predicting the course of the disease based on the characteristics of the colonizing strain. In addition, understanding how *Pa* clones respond to modulators may guide the reduction of anti-*Pseudomonas* therapies in an individualized manner for each patient.

### Essential methods

To this end, we will perform WGS of about 700 *Pa* isolates, collected and stored for up to 20 years, from 59 people with CF, highlighting *Pa* resistome and virulome changes over time. We will then compare resistome and phenotypic resistance. By mimicking as closely as possible the CF lung environment, we will also study the ability of selected *Pa* strains to produce biofilms, invade CF respiratory tissue cells, and produce substances involved in lung damage. The data obtained, correlated with the clinical course of the patients over time and the drug therapies given, will allow us to understand the clinical impact of some bacterial adaptations.

### Preliminary results

Our preliminary data on 315 *Pa* strains from 24 people with CF suggest colonization by certain clones or clone's association may have a negative impact on patient's prognosis and that evolution of resistance is driven by chromosomal mutations. Among the 24 people investigated, 60% had at least one hypermutator *Pa* isolate due to mutations in DNA mismatch repair genes (*mutL*, *mutM*, *mutS*, *mutT*, *uvrD*), representing 18% of the multidrug-resistant isolates studied. Effect of different modulators was preliminary seen in 12 patients and ranged from acquisition of new clones, appearance of hypermutator phenotypes, loss of virulence genes, loss of non-mucoid phenotype and persistence of mucoid one.

### Conclusions

Extending this data will make it possible to achieve personalized therapy, tailored to the characteristics of the bacterial strain colonizing the patient, and to gain a deeper understanding on the effect of modulators on bacteria.

### Razionale dello studio

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) causa infezioni polmonari croniche nelle persone con fibrosi cistica (FC). Durante il suo adattamento al polmone FC, *Pa* subisce cambiamenti che gli consentono di resistere agli antibiotici e di eludere il sistema immunitario. Non è ancora chiaro come queste modifiche siano correlate al decorso clinico del paziente, alle terapie farmacologiche somministrate e alla co-colonizzazione batterica presente. Inoltre, l'impatto dei modulatori sulla microbiologia del polmone FC deve ancora essere chiarito.

### Ipotesi e obiettivi

Questo progetto si propone di studiare l'adattamento di *Pa* nel corso degli anni di colonizzazione polmonare; la comprensione di questo processo consentirà di adattare gli approcci terapeutici al paziente e di prevedere il decorso della malattia in base alle caratteristiche del clone colonizzante. Inoltre, capire come rispondono determinati cloni di *Pa* ai modulatori, permetterà di personalizzare le terapie anti-*Pseudomonas* per ogni paziente.

### Metodi

A tal fine, saranno sequenziati circa 700 isolati di *Pa*, raccolti e conservati a partire dal 2004, provenienti da 59 persone con FC, evidenziandone i cambiamenti del resistoma e del viruloma nel tempo. Mimando il più possibile l'ambiente polmonare FC, studieremo inoltre la capacità di ceppi selezionati di *Pa* di produrre biofilm, invadere le cellule del tessuto polmonare FC e causare danno polmonare. Confronteremo inoltre il resistoma con le resistenze fenotipiche. I dati ottenuti, correlati al decorso clinico dei pazienti nel tempo e alle terapie farmacologiche somministrate, ci permetteranno di comprendere l'impatto clinico di alcuni adattamenti batterici.

### Risultati preliminari

Dati preliminari, ottenuti su 315 *Pa* provenienti da 24 persone con FC, suggeriscono che la colonizzazione da parte di alcuni cloni, o la loro associazione, può avere un impatto prognostico negativo e che l'evoluzione della resistenza è guidata da mutazioni cromosomiche. Inoltre, nel 60% dei pazienti è stato individuato almeno un isolato di *Pa* nello stato di *hypermutator* a seguito di mutazioni nei geni del sistema di riparazione del DNA. L'impatto dei modulatori è stato preliminarmente valutato in 12 pazienti, mostrando effetti variabili, quali l'acquisizione di nuovi cloni, la comparsa di fenotipi *hypermutator*, la perdita o la persistenza di fenotipi e fattori di virulenza.

### Conclusioni

L'ampliamento di questi dati permetterà di andare sempre più verso una terapia personalizzata e di comprendere più in dettaglio l'effetto dei modulatori sui batteri.



Developing a new respiratory 3D model as an innovative strategy to study the inflammation pathology in cystic fibrosis

Messa a punto di un modello 3D di tessuto respiratorio per studiare l'infiammazione in fibrosi cistica



Roberto Plebani (first picture) with his collaborators, Anna Stejskalová (on the left) and Giovanni di Bonaventura (on the right)

19

### Roberto Plebani

Department of Medical, Oral e Biotechnological Sciences, University G. d'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti, Italy  
(GMSG#1/2023, ongoing)

#### Background and rationale

*Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease characterized by chronic inflammation. We previously documented that the organ-on-a-chip technology is suitable for studying in vitro the inflammatory response in CF. In this project, we developed an advanced 3D culture model denominated airway-on-a-chip 2.0, which represents an improved version of our previous model by integrating differentiated epithelium, endothelium, and stroma, all derived from people with CF.*

#### Hypothesis and objectives

*Previous research has shown that endothelial cells (EC) in CF are dysfunctional, exhibiting altered barrier function and increased production of inflammatory cytokines. Based on these findings, we hypothesize that an airway-on-a-chip model entirely composed of CF cells, including ECs, would provide more information on CF inflammation, particularly regarding polymorphonuclear leukocyte (PMN) recruitment. Our goal during the first year of the project was to develop a CF triple-culture (epithelium, endothelium, and stroma) model on-a-chip to study inflammation and PMN recruitment.*

#### Essential methods

*Co-culture of CF epithelial, endothelial, and stromal cells was optimized initially using transwell systems and then integrated into the chip model. The cultures were extensively characterized through confocal microscopy and media were collected for cytokine analysis. The new model was then used for PMN perfusion studies to evaluate their recruitment.*

#### Preliminary results

*We successfully modeled the 2.0 version of the airway-on-a-chip, demonstrating that it is possible to co-culture the three cell types. Results with the new model showed increased PMN recruitment, highlighting the role of CF ECs. These results were supported by increased pro-inflammatory cytokine production by CF ECs when compared to the wild type controls. Immune cell incubation with ECs also showed enhanced PMN, but not peripheral blood mononuclear cell adhesion.*

#### Conclusions

*These findings indicate that ECs significantly contribute to the inflammatory process in CF and that the airway-on-a-chip 2.0 has the potential to become a valuable tool for studying inflammation and for testing anti-inflammatory therapies in CF, including those targeting the endothelium, thus potentially revealing new clinical applications.*

#### Razionale dello studio

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica caratterizzata da infiammazione cronica. In precedenti studi, abbiamo dimostrato che la tecnologia dell'*organ-on-a-chip* permette di studiare *in vitro* la risposta infiammatoria nella FC. In questo progetto, abbiamo sviluppato un modello di coltura 3D avanzato, denominato *airway-on-a-chip* 2.0, che rappresenta una versione migliorata del nostro modello precedente, integrando epitelio differenziato, endotelio e stroma, tutti derivati da cellule di persone con FC.

#### Ipotesi e obiettivi

Ricerche precedenti hanno mostrato che le cellule endoteliali (CE) nella FC sono disfunzionali, con alterazioni nella funzione di barriera e aumentata produzione di citochine infiammatorie. Sulla base di questi dati, ipotizziamo che un modello *airway-on-a-chip* interamente composto da cellule FC, incluse le CE, possa offrire preziose informazioni sull'infiammazione nella FC, in particolare riguardo il reclutamento dei leucociti polimorfonucleati (PMN). L'obiettivo di questo primo anno di progetto è stato sviluppare un modello di tripla coltura FC (epitelio, endotelio e stroma) per studiare l'infiammazione e il reclutamento di PMN.

#### Metodi

La co-cultura di cellule epiteliali, endoteliali e stromali FC è stata ottimizzata inizialmente usando sistemi transwell e successivamente traslata su chip. Le colture sono state ampiamente caratterizzate tramite microscopia confocale e analisi delle citochine. Il nuovo modello è stato poi usato per studi di perfusione di PMN al fine di valutarne il reclutamento.

#### Risultati preliminari

Abbiamo sviluppato con successo la versione 2.0 dell'*airway-on-a-chip*, dimostrando la possibilità di co-cultivare i tre tipi di cellule. Nel nuovo modello, i risultati hanno mostrato un aumento del reclutamento di PMN nei chip FC, evidenziandone il ruolo delle CE. Questi risultati sono stati confermati da una maggiore produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle CE rispetto ai controlli wild type. L'incubazione con cellule immunitarie ha mostrato maggiore adesione di PMN, ma non di leucociti mononucleati.

#### Conclusioni

Questi risultati indicano che le CE contribuiscono significativamente all'infiammazione nella FC e che l'*airway-on-a-chip* 2.0 potrebbe essere sfruttato per studiare l'infiammazione nella FC e testare terapie antinfiammatorie, incluse quelle mirate all'endotelio, con potenziali applicazioni cliniche.

**Ex vivo pig lung as a new model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* infection and phage therapy application**

Espianti di polmone di maiale come nuovo modello per studiare le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e l'uso della fagoterapia



Marco Cafora (on the left) with Federica Briani, Anna Pistocchi and Francesca Forti

20

**Marco Cafora<sup>1</sup>, Francesca Forti<sup>2</sup>, Freya Harrison<sup>3</sup>, Federica Briani<sup>2</sup>, Anna Pistocchi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Department of Biosciences, University of Milan, Italy - <sup>3</sup>School of Life Science, University of Warwick (UK)

(GMRF#1/2023, ongoing)

**Background and rationale**

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) colonization leads to intractable biofilm infections of the lower airways in people with cystic fibrosis (pwCF). However, to date there is a lack of standardized models that can mimic *in vivo* mature biofilm. Indeed, most of the *in vitro* models are developed on abiotic surfaces, with poor predictive potential.

**Hypothesis and objectives**

This three-year project is part of ongoing research aimed at making phage therapy a viable treatment option for *Pa* lung infections in pwCF. The susceptibility of biofilm to bacteriophages represents a still open question in this field. In the perspective of implementing phage therapy to counteract this type of antibiotic-refractory infection, there is the urgent need to develop models that can recapitulate the *in vivo* environment of human CF airways, leading to the formation of bona fide biofilm.

**Essential methods**

We set up the *ex vivo* pig lung (EVPL) CF model, an established system that mimics the physicochemical environment of the human CF airways. In particular, swine bronchial tissue is incubated with an artificial sputum medium mimicking the composition of the CF airway fluid, and infected with a collection of *Pa* strains (laboratory and clinical), allowing the growth of an extensive and thick *in vivo*-like biofilm. The anti-biofilm potential of different phage preparations is investigated through the quantification of biofilm biomass and qualitative analyses with fluorescence microscopy.

**Preliminary results**

In previous projects, we isolated and characterized new phages specific for *Pa*, able to counteract acute *Pa* lethal infections in different preclinical models. Phage treatment was able to almost completely eradicate the biofilm formed by both laboratory (PAO1 and LESB58), and clinical strains in the EVPL model, showing synergistic effects with commonly used antibiotics and antimicrobials. Furthermore, phage treatment dramatically altered biofilm architecture and strongly inhibit biofilm matrix (i.e. Exopolysaccharide production).

**Conclusions**

The present study aims to demonstrate the effectiveness of the EVPL CF model in evaluating the efficacy of phages against *Pa* biofilm, to address an unsolved challenge of phage therapy. The topic holds significant importance for PwCF, given the formidable resistance and persistence of *Pa*. Moreover, implementation of a cheap, easy-of-use CF model has the potential to accelerate the introduction of phage therapy into clinics.

**Razionale dello studio**

La colonizzazione da *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) porta all'insorgenza di infezioni intrattabili da biofilm delle vie aeree inferiori nelle persone con fibrosi cistica (FC). Tuttavia, a oggi manca la disponibilità di modelli standardizzati che possano mimare un biofilm maturo *in vivo*. Infatti, la maggior parte dei modelli *in vitro* è sviluppata su superfici abiotiche.

**Ipotesi e obiettivi**

Questo progetto triennale è parte di una più ampia ricerca in corso volta a rendere la terapia fagica una valida opzione per il trattamento delle infezioni polmonari da *Pa* nelle persone con FC. La suscettibilità del biofilm ai batteriofagi rappresenta a oggi una questione ancora da approfondire. Nella prospettiva di implementare la terapia fagica per contrastare questo tipo di infezione refrattaria agli antibiotici, è urgente sviluppare modelli che possano riprodurre l'ambiente *in vivo* delle vie aeree umane affette da FC.

**Metodi**

Abbiamo implementato il modello FC di espianto di polmone di maiale (EVPL), un sistema che riproduce l'ambiente chimico-fisico delle vie aeree umane affette da FC. Nel dettaglio, il tessuto bronchiale suino viene incubato con un terreno che simula la composizione delle secrezioni delle vie aeree FC e infettato con *Pa* (varianti di laboratorio e cliniche), consentendo la crescita di un biofilm esteso e spesso. Il potenziale anti-biofilm di diverse preparazioni fagiche viene indagato attraverso la quantificazione della biomassa del biofilm e analisi qualitative con microscopia a fluorescenza.

**Risultati preliminari**

In precedenza, abbiamo isolato e caratterizzato nuovi fagi specifici per *Pa*, capaci di contrastare infezioni acute da *Pa* in modelli preclinici. Il trattamento con fagi è stato in grado di eradicare quasi completamente il biofilm formato sia dai ceppi di laboratorio (PAO1 e LESB58), sia dai ceppi clinici nel modello EVPL, mostrando effetti sinergici con antibiotici comunemente usati. Inoltre, il trattamento con i fagi altera drasticamente l'architettura del biofilm e inibisce fortemente la produzione di esopolisaccaridi della matrice.

**Conclusioni**

Questo studio mira a dimostrare il potenziale del modello FC di EVPL nella valutazione dell'efficacia dei fagi contro il biofilm di *Pa*. L'argomento è di grande importanza in FC, data l'enorme resistenza e persistenza di *Pa*. Inoltre, l'implementazione di un modello FC economico e facile da usare ha il potenziale per accelerare l'introduzione della terapia fagica per l'uso clinico.

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

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



Carlos M. Farinha (third from the right) with his collaborators

21

**Carlos M. Farinha<sup>1</sup>, Valeria Tomati<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>BioISI Biosystems and Integrative Sciences Institute, University of Lisboa, Portugal - <sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy

(FFC#2/2023, ongoing)

### Background and rationale

Old and new data have made it increasingly clear that CFTR is at a crossing between the cytoskeleton and signaling pathways, especially cAMP signaling. Regulation of CFTR trafficking requires integrity of correct cytoskeletal organization, because the cytoskeleton is responsible for the scaffolding that stabilizes CFTR at the PM and brings several interacting proteins to CFTR's proximity, among which cAMP sensors, such as protein kinase A and EPAC1, have a prominent role.

### Hypothesis and objectives

As we aim at characterizing the crosstalk between the cytoskeleton and cAMP signaling in the regulation of CFTR traffic and at using such mechanisms to improve CFTR PM stability and to boost endoplasmic reticulum (ER) rescue of trafficking mutants, we focused here on the role of the cAMP sensor EPAC1, the capping protein CAPZA2 and the inverted formin INF2, and on their possible role in the regulation of CFTR trafficking.

### Essential methods

We used primary cultures of nasal epithelial cells isolated from individuals with CF, CF bronchial epithelial cells expressing wild type or mutant CFTR and analyzed them using Western blot, cell surface biotinylation, and halide-sensitive YFP functional assay. We also used differential centrifugation to isolate the microsomal fraction in CFBE cells.

### Preliminary results

Results show that INF2 knockdown (KD) improves rescue by Kaftrio independently of EPAC1 activation. Moreover, EPAC1 KD and CAPZA2 KD decrease the functional of Kaftrio-rescued F508del-CFTR, in agreement with previous characterization as positive CFTR regulators. 16HBE cells do not recapitulate the results observed in CFBE cells under INF2 KD, probably due to a reduced expression of this protein. INF2 expression has significant variability in nasal cells from CF carriers and controls, whereas CAPZA2 is apparently similar.

### Conclusions

The findings of the first year show that regulation of CFTR by EPAC1, INF2 and CAPZA2 is complex, confirming the relevance of exploring their role in the crosstalk between cAMP signaling pathways and the cytoskeleton to affect CFTR modulation, and possibly CF handling.

### Razionale dello studio

È sempre più chiaro che la proteina CFTR si trova a un crocevia tra il citoscheletro e le vie di segnalazione cellulare, in particolare la segnalazione del cAMP.

La regolazione del traffico di CFTR richiede l'integrità della corretta organizzazione citoscheletrica, poiché il citoscheletro è responsabile dell'impalcatura che stabilizza CFTR sulla membrana plasmatica. Il citoscheletro porta in prossimità di CFTR diverse proteine interagenti, tra le quali i sensori del cAMP, come la proteina chinasi A ed EPAC1, hanno un ruolo di primo piano.

### Ipotesi e obiettivi

Miriamo a caratterizzare la relazione tra il citoscheletro e la segnalazione del cAMP nella regolazione del traffico CFTR e a usare tali meccanismi per migliorare la stabilità di CFTR nella membrana plasmatica, per potenziare il salvataggio nel reticolo endoplasmatico dei mutanti di traffico. Per fare ciò, ci siamo concentrati sul ruolo del sensore di cAMP EPAC1, della proteina di capping CAPZA2 e della formina invertita 2 (INF2), e sul loro possibile ruolo nella regolazione del traffico di CFTR.

### Metodi

Abbiamo usato colture primarie di cellule epiteliali nasali isolate da individui con FC, cellule epiteliali bronchiali FC che esprimono CFTR di tipo selvatico o mutante e le abbiamo analizzate usando Western blot, biotinilazione della superficie cellulare e saggio funzionale YFP sensibile agli alogenuri. Abbiamo anche usato la centrifugazione differenziale per isolare la frazione microsomiale nelle cellule CFBE.

### Risultati preliminari

Il knockdown di INF2 migliora il salvataggio da parte di Kaftrio indipendentemente dall'attivazione di EPAC1. Inoltre, i knockdown di EPAC1 e di CAPZA2 diminuiscono la funzionalità di F508del-CFTR recuperato da Kaftrio, in accordo con la precedente caratterizzazione come regolatori CFTR positivi.

I risultati osservati nelle cellule CFBE con knockdown di INF2 non sono riproducibili in cellule 16HBE, probabilmente a causa di una ridotta espressione della proteina. L'espressione di INF2 ha una variabilità significativa nelle cellule nasali di CF, portatori e controlli, mentre CAPZA2 sembra essere simile.

### Conclusioni

I risultati del primo anno mostrano che la regolazione di CFTR da parte di EPAC1, INF2 e CAPZA2 è complessa, confermando l'importanza di esplorare il loro ruolo nel dialogo tra i percorsi di segnalazione cAMP e il citoscheletro per influenzare la modulazione del CFTR e possibilmente la gestione della FC.





Left to right: Alessandra Bragonzi, Federica Ungaro, Valeria Daccò

**Gloria Delmonte<sup>2</sup>, Cristina Cigana<sup>1</sup>, Laura Veschetti<sup>2</sup>, Amanda Facoetti<sup>2</sup>, Fabrizio Gianferro<sup>1</sup>, Lisa Cariani<sup>3</sup>, Valeria Daccò<sup>3</sup>, Federica Ungaro<sup>2</sup>, Alessandra Bragonzi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Infection and Cystic Fibrosis Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>2</sup>Laboratory of experimental gastroenterology IRCCS San Raffaele, Milan, Italy - <sup>3</sup>Cystic Fibrosis Center, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Italy (FFC#5/2023, ongoing)

**Background and rationale**

*Cystic fibrosis (CF) research mainly targets the lung, limiting understanding of disease pathogenesis in its complexity. This narrow focus does not adequately address the onset and persistence of chronic pulmonary infections in people with CF, even those on CFTR-modulator treatment. The knowledge gap may stem from a lack of studies on distal organs beyond the lungs. Moreover, microbiological diagnosis struggles to reliably predict infection burden.*

**Hypothesis and objectives**

*Emerging data suggest a connection between gut pathology and respiratory outcomes, but the mechanisms of gut-lung cross-talk in CF is unexplored. Driven by this hypothesis, the project aims to establish a gut-lung axis, demonstrating that the microbiological and immunological status of the gut affects lung biology and function.*

**Essential methods**

*This project uses the Collaborative Cross CF mouse model (CC037-deltaF508) and establishes a new model of gastrointestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection. Microbiological and functional analyses are used to study gut disease and barrier integrity during microbial infection and translocation to the lungs. Genomic and immunological analyses characterize the host response. A cohort of people with CF is being recruited to analyze the microbiology of lung and stool samples, to identify potential correlations.*

**Preliminary results**

*CC037-deltaF508 mice exhibited early inflammatory responses in the lungs and blood, with increased immune cells and biomarkers compared to wild type mice. Single-nucleus RNA-seq revealed upregulated inflammatory pathways while mucus production genes were unchanged. The lungs showed an enhanced bacterial defense, with enteric bacteria shared from the gut. Immunological changes in the gut, especially in the ileum, and a loss of gut barrier integrity were observed in CC037-deltaF508 mice, correlating with higher bacterial loads in the gut, stool, and extra-intestinal organs. Upon *P. aeruginosa* gut infection, bacteria translocated to the lungs and liver in CC037-deltaF508 mice but not in wt, suggesting gut impairment may affect gut-lung crosstalk. Data from people with CF are under evaluation.*

**Conclusions**

*So far, we have established that airways and systemic inflammatory response occur early, even in the absence of mucus production. This event is driven by a leaky gut, which compromises barrier integrity, allowing the sharing of enteric pathogens with the lungs and activating the defense response to bacteria. This opens opportunities for developing new diagnostic and therapeutic tools beyond lung-related treatments.*

**Razionale dello studio**

La ricerca sulla fibrosi cistica (FC) si è concentrata sul polmone, l'organo che influisce maggiormente sulla morbilità e qualità della vita delle persone con FC. Tuttavia, non è chiaro come si sviluppino infiammazione e infezione polmonare, che si manifestano in modo imprevedibile e, una volta cronicizzate, sembrano rispondere poco alle terapie con modulatori CFTR. Inoltre, la diagnosi microbiologica è resa più difficile dalla riduzione dell'escreato causata dai modulatori.

**Ipotesi e obiettivi**

Dati emergenti suggeriscono un legame tra microbiologia e immunologia intestinale e danno polmonare, sebbene i meccanismi di interazione intestino-polmone nella FC siano ancora sconosciuti. L'obiettivo è stabilire un asse intestino-polmoni, dimostrando che lo stato microbiologico e immunologico dell'intestino influisce sulla funzione polmonare.

**Metodi**

Per gli studi abbiamo usato un modello animale di FC e stabilito un'infezione gastrointestinale da *Pseudomonas aeruginosa*. Analisi microbiologiche e funzionali vengono usate per studiare l'integrità della barriera intestinale e la traslocazione microbica ai polmoni. Le analisi genomiche e immunologiche caratterizzano la risposta dell'ospite. Persone con FC sono state reclutate per la caratterizzazione di ceppi di *P. aeruginosa* da campioni polmonari e fecali, valutando possibili correlazioni.

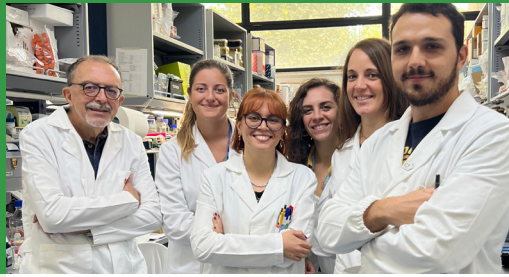
**Risultati preliminari**

Il modello animale FC mostra una risposta infiammatoria respiratoria e sistemica precoce. L'analisi genomica evidenzia una risposta immunitaria attiva contro i patogeni, mentre l'analisi microbiologica rivela la presenza di batteri intestinali nei polmoni. Cambiamenti immunologici e perdita di integrità della barriera intestinale sono stati osservati nell'ileo, correlati a un aumento del carico batterico nell'intestino, feci e organi extra-intestinali. L'infezione intestinale da *P. aeruginosa* ha mostrato traslocazione microbica ai polmoni e al fegato nei topi FC, ma non nei non-FC, suggerendo che il danno intestinale influenzi l'interazione intestino-polmoni. I dati sulle persone con FC sono in fase di valutazione.

**Conclusioni**

Abbiamo stabilito che la risposta infiammatoria delle vie aeree e sistemica si attiva precocemente e non dipende dalla produzione di muco. Questo fenomeno è guidato da un intestino permeabile, che compromette la barriera e permette la condivisione di patogeni enterici con i polmoni, innescando una risposta difensiva. Questi dati aprono nuove opportunità per lo sviluppo di strumenti diagnostici e terapeutici focalizzati a organi extra-polmonari.





**Background and rationale**

*Inflammation is a main feature of cystic fibrosis (CF) lung disease. The loss of CFTR function impairs mucociliary clearance, thus paving the way to bacterial colonization and development of a persistent inflammatory state. Correctors and potentiators efficiently rescue mutant CFTR function but bacterial infection remains. Infection/inflammation is exacerbated in patients with undruggable mutations who cannot benefit from CFTR modulators.*

**Hypothesis and objectives**

*We hypothesized that inflammation, by altering ion transport properties, further disrupts mucociliary clearance. Our objective was to assess how inflammatory stimuli affect epithelial ion transport systems, with a special focus on ENaC, SLC26A4, and ATP12A, whose role in sodium, bicarbonate, and proton transport may have detrimental effects on airway surface properties.*

**Essential methods**

*Differentiated bronchial epithelia generated on porous membranes were studied with multiple functional and molecular methods: i) short-circuit current recordings; ii) pH-sensitive fluorescent probes; iii) fluorescence recovery after photobleaching (FRAP); iv) bulk and single-cell RNAseq.*

**Results**

*Epithelia treated with IL-17/TNF- $\alpha$ , a stimulus associated with Th17 immune response, showed strong upregulation of genes involved in ion transport and anti-bacterial activity. At the functional level, we found an increase in ENaC-dependent sodium absorption and ATP12A-dependent proton secretion. IL-17/TNF- $\alpha$  treatment also induced, in both CF and non-CF epithelia, a high viscosity state of the apical surface, probably due to enhanced electrolyte/water absorption. Importantly, the high viscosity state was converted to a fluid state, only in non-CF epithelia, by activation of CFTR with a beta-adrenergic stimulus. In CF epithelia, recovery from the hyperviscous state could be achieved by treatment with CF correctors (epithelia with F508del mutation) or with inhibitors of SLC26A4.*

**Conclusions**

*Our study has revealed a pathogenic mechanism that appears to worsen the consequences of the basic defect in CF. The lack of CFTR function appears to trap CF airway epithelia in a high viscosity state that perpetuates the impairment of mucociliary transport favoring infection and inflammation. Pharmacological modulation of alternative targets such as SLC26A4 or ATP12A could restore apical surface fluidity. This approach could be particularly useful for people with CF who carry undruggable mutations.*

**Razionale dello studio**

Il difetto di base nella fibrosi cistica (FC) è la perdita di funzione della proteina CFTR, che causa disidratazione della superficie delle vie aeree. Questa condizione favorisce l'infezione batterica. Nonostante l'efficacia dei modulatori farmacologici di CFTR, correttori e potenziatori, molte persone con FC mostrano persistenza delle infezioni batteriche, che rappresentano quindi uno stimolo continuo di infiammazione. Tale situazione è ancora più marcata nei pazienti che portano mutazioni insensibili a correttori e potenziatori.

**Ipotesi e obiettivi**

Avevamo ipotizzato che l'infiammazione abbia effetti negativi sulle proprietà della superficie delle vie aeree. Pertanto il nostro obiettivo è stato lo studio dei meccanismi attraverso i quali l'infiammazione altera i processi epiteliali con la conseguente identificazione di bersagli utili per un trattamento farmacologico.

**Metodi**

Abbiamo usato cellule epiteliali bronchiali di persone con FC e di soggetti di controllo per la generazione *in vitro* di epitelii altamente differenziati, in grado di riprodurre le proprietà del tessuto *in vivo*. Su questi epitelii abbiamo effettuato esperimenti per misurare l'attività di CFTR e di altre proteine coinvolte nel trasporto ionico, nonché per valutare le proprietà della superficie degli epitelii.

**Risultati**

Gli esperimenti hanno confermato la capacità di stimoli infiammatori di modificare in maniera sostanziale gli epitelii, sia a livello molecolare che funzionale. In particolare, stimoli associati a infezioni batteriche provocano un aumento di attività delle proteine ATP12A, SLC26A4, ed ENaC che rendono la superficie degli epitelii molto più densa e disidratata. L'attivazione di CFTR con uno stimolo fisiologico permette agli epitelii ottenuti da soggetti di controllo, ma non da persone con FC, di ripristinare lo stato di fluidità. Tuttavia, abbiamo dimostrato che il recupero dallo stato di disidratazione negli epitelii FC può essere ottenuto inibendo SLC26A4.

**Conclusioni**

I nostri risultati suggeriscono che l'infiammazione sia alla base di un circolo vizioso che peggiora le conseguenze della perdita di funzione di CFTR, generando uno stato disidratato e iperviscoso nelle vie aeree delle persone con FC. Questa situazione può essere risolta attraverso la modulazione farmacologica di bersagli alternativi, per esempio SLC26A4, quindi aggirando l'ostacolo costituito dalla proteina CFTR mutata.

Investigation of Kaftrio secondary effects on sphingolipid synthesis

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



On the right Andrea Armirotti, next to Dinu Ciobanu and Nara Liessi

24

**Andrea Armirotti<sup>1</sup>, Nara Liessi<sup>1</sup>, Dinu Ciobanu<sup>1</sup>, Rosaria Bassi<sup>2</sup>, Valeria Tomati<sup>2</sup>, Valeria Capurro<sup>2</sup>, Nicoletta Pedemonte<sup>2</sup>, Nicoletta Loberto<sup>3</sup>, Dorina Dobi<sup>3</sup>, Massimo Aureli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - <sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy - <sup>3</sup>Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Italy (**FFC#1/2023, concluded**)

### Background and rationale

In 2023, we incubated BE cells from both CF and non-CF subjects with Kaftrio for 48 hours and we observed a strong increase in the amount of dihydroceramides (dhCer). We thus reported that the triple combination elexacaftor, tezacaftor, ivacaftor (ETI) has an off-target effect, not related to CFTR and its rescue and not previously reported: ETI modulates the de-novo synthetic pathway of sphingolipids, by acting on the enzyme that converts dihydroceramides (dhCer) into ceramides (Cer), thus controlling the homeostasis of dihydrosphingolipids in the cell. This effect is independent of the CFTR genotype.

### Hypothesis and objectives

We hypothesized that ETI is either a direct inhibitor of DEGS or that it might impact on its levels of expression. We investigated this hypothesis, to understand the mechanisms lying behind our observation. We also aimed at identifying which of the three ETI components is responsible for the effect and at which concentration.

### Essential methods

We exposed BE and hepatocytes to ETI for up to 15 days and we monitored the levels of dhCer using a LC-MS/MS assay. By using conventional in-vitro biochemical techniques, we have also established a functional assay for DEGS activity. We also used a mouse model to translate our finding to an in-vivo scenario.

### Results

We first confirmed that dhCer accumulation continues for as long as cells are exposed to ETI. By using a relatively simple in-vitro assay, we then proved that this accumulation is triggered by a direct inhibition of the DEGS enzyme and that tezacaftor is responsible for the effect in a dose-dependent way. We then proved that the same effect, albeit relatively low in magnitude, occurs in in-vivo settings, by demonstrating that dhCer accumulate in the brain of mice repeatedly exposed to ETI. Finally, we characterized ETI effect on DEGS in human hepatocytes. We confirmed that tezacaftor induces dhCer accumulation but does not induce cytotoxicity. Our findings also pinpointed that ivacaftor exerts a cytostatic effect on human hepatocytes.

### Conclusions

We have clarified the mechanisms behind our previous observations and we have pinpointed a previously unknown off-target effect of tezacaftor. We believe that this body of knowledge will help the design of improved, more efficient, CFTR modulators. We have recently shared our findings with the worldwide CF community through a publication in the *Journal of Cystic Fibrosis*.

### Razionale dello studio

Nel 2023, abbiamo incubato cellule bronchiali (BE) di soggetti con e senza FC con Kaftrio per 48 ore e abbiamo osservato un forte aumento di diidroceramidi (dhCer), che sono dei grassi naturali. La tripla combinazione elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) ha un effetto secondario, non correlato a CFTR e al suo recupero e mai descritto prima: ETI altera la produzione degli sfingolipidi, una importante classe di grassi presenti nelle cellule e lo fa agendo su uno specifico enzima, chiamato DEGS. Questo effetto è indipendente dal genotipo CFTR.

### Ipotesi e obiettivi

Abbiamo ipotizzato che ETI sia un inibitore diretto di DEGS o che possa avere un impatto sulla sua concentrazione nelle cellule. Abbiamo indagato questa ipotesi, per comprendere i meccanismi alla base della nostra osservazione. Ci siamo anche posti l'obiettivo di identificare quale dei tre componenti ETI è responsabile dell'effetto e a quale concentrazione.

### Metodi

Abbiamo esposto le BE e cellule di fegato a ETI fino a 15 giorni e abbiamo monitorato i livelli di dhCer. Usando tecniche biochimiche convenzionali *in vitro*, abbiamo anche stabilito un test funzionale per misurare l'attività di DEGS. Abbiamo anche usato un modello di topo per verificare che quanto osservato *in vitro* avvenisse anche *in vivo*.

### Risultati

Abbiamo prima confermato che l'accumulo di dhCer continua finché le cellule sono esposte a ETI. Usando un test *in vitro* relativamente semplice, abbiamo quindi dimostrato che questo accumulo è causato da un'inibizione diretta dell'enzima DEGS e che il tezacaftor è l'unico responsabile dell'effetto. Abbiamo quindi dimostrato che lo stesso effetto, sebbene relativamente modesto, è confermato *in vivo*, dimostrando che le dhCer si accumulano nel cervello dei topi esposti a ETI. Infine, abbiamo caratterizzato l'effetto ETI su DEGS in cellule di fegato. Abbiamo confermato che tezacaftor induce l'accumulo di dhCer ma non induce tossicità. I nostri risultati hanno anche evidenziato che ivacaftor, invece, esercita un effetto citostatico sugli epatociti umani.

### Conclusioni

Abbiamo chiarito i meccanismi alla base delle nostre precedenti osservazioni e abbiamo individuato un effetto secondario precedentemente sconosciuto di tezacaftor. Riteniamo che questi dati aiuteranno la progettazione di modulatori CFTR migliori e più efficienti. Abbiamo recentemente condiviso i nostri risultati con la comunità mondiale FC attraverso una pubblicazione sul *Journal of Cystic Fibrosis*.



**Renata Bocciardi<sup>1,2</sup>, Cristina Pastorino<sup>2</sup>, Valeria Capurro<sup>2</sup>, Mariateresa Lena<sup>1</sup>, Ludovica Menta<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Neurology, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINO GMI), University of Genoa, Italy - <sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy

(FFC#3/2023, ongoing)

**Background and rationale**

Cystic fibrosis (CF) is one of the most frequent genetic diseases due to loss of function variants of the CFTR gene. CFTR modulators are pharmacological agents developed to rescue the basic defects caused by the different functional classes of variants. The N1303K represents the second most common variant in Italian people with CF (pwCF) and shows both trafficking and gating alterations, with heterogeneous response to modulators approved to rescue such defects.

**Hypothesis and objectives**

This project is aimed at investigating the basis of the variable response of the N1303K variant to approved modulators in human nasal epithelial cells (hNEC) from pwCF. Among the factors responsible for such heterogeneity, the expression level of CFTR mRNA, the presence of unconventional splicing events or complex alleles due additional variants affecting both cDNA and regulatory regions of the CFTR gene may play a role and are under investigation.

**Essential methods**

Quantitative and qualitative evaluation of the CFTR gene expression in N1303K-carrying epithelia from pwCF and controls is ongoing by applying qPCR and end-point RT-PCR combined to sequence analysis. An RNAseq study is also ongoing for a subgroup of selected samples.

**Preliminary results**

The functional analyses of the CFTR activity in hNEC from the cohort of CF, N1303K-carrying samples demonstrated that the pharmacological rescue is quantitatively different among epithelia that can be stratified in different groups of drug response. Concerning the molecular characterization, we started with a group of CF and control hNEC samples, and we quantified the overall abundance of CFTR mRNA in parallel with the cDNA sequence analysis. Interestingly, we identified a CF sample with a high basal level of CFTR activity, responsive to approved modulators, with a high expression of the CFTR mRNA. The molecular characterization of this sample is ongoing to elucidate the basis of such differential expression.

**Conclusions**

We are working to provide a quantitative and qualitative evaluation of the CFTR mRNAs in N1303K hNEC with different sensitivity to CFTR modulators in view to open the path toward the understanding of the molecular bases of such variability. As a final aim, our study is intended to provide indications for the selection and development of pharmacological agents that may represent a reliable treatment for pwCF carrying N1303K variant still awaiting an effective therapy.

**Razionale dello studio**

La fibrosi cistica (FC) è una delle malattie genetiche più frequenti dovuta a varianti del gene CFTR. I modulatori di CFTR sono agenti farmacologici sviluppati per recuperare il difetto di base causato dalle differenti classi funzionali di mutazioni. N1303K rappresenta la seconda variante più comune nella popolazione FC italiana, causa difetti di maturazione e attività di CFTR, e presenta una risposta variabile al trattamento con modulatori approvati per questo tipo di difetti.

**Ipotesi e obiettivi**

Questo progetto ha lo scopo di studiare le basi della variabilità di risposta ai modulatori approvati della variante N1303K in cellule epiteliali nasali (hNEC) di persone con FC. Tra i fattori responsabili di questa eterogeneità, i livelli di espressione del messaggero di CFTR, la presenza di splicing non-convenzionali o di alleli complessi dovuti a varianti aggiuntive nel cDNA o nelle regioni regolatorie, possono giocare un ruolo importante e sono l'oggetto di questo studio.

**Metodi**

Analisi quantitativa e qualitativa dell'mRNA di CFTR negli epiteli che esprimono la variante N1303K mediante qPCR e RT-PCR "end-point" abbinata ad analisi di sequenza. Lo studio del profilo di espressione mediante RNAseq è inoltre in corso per un gruppo selezionato di campioni.

**Risultati preliminari**

L'analisi funzionale dell'attività di CFTR nelle hNEC che esprimono la N1303K ha dimostrato che il recupero farmacologico è quantitativamente diverso nei diversi epiteli e questo permette la stratificazione in diversi gruppi di risposta. Per la caratterizzazione molecolare, abbiamo iniziato con un gruppo di epiteli FC e di controllo quantificando l'mRNA totale di CFTR in parallelo a un'analisi di sequenza del cDNA. Questo ci ha permesso di identificare un campione FC con un'alta attività basale, responsivo al trattamento con i modulatori e con un'aumentata espressione di CFTR. La caratterizzazione molecolare di questo campione è in corso per chiarire le basi dell'espressione differenziale osservata.

**Conclusioni**

Stiamo lavorando per ottenere un profilo qualitativo e quantitativo dell'espressione di CFTR negli epiteli N1303K con diversa sensibilità ai modulatori, e aprire la strada alla comprensione delle basi molecolari di questa variabilità. In ultimo, questo studio è inteso a fornire indicazioni per la selezione e lo sviluppo di agenti farmacologici che possano rappresentare un trattamento affidabile per le persone con FC ancora in attesa di una terapia efficace.





**Cristina Cigana<sup>1</sup>, Daniela Girelli<sup>2</sup>, Ersilia Fiscarelli<sup>3</sup>**

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

**Background  
and rationale**

*Kaftrio has brought significant clinical benefits to individuals with cystic fibrosis (CF) eligible for treatment. However, variations in treatment response suggest the existence of mechanisms independent of those directly related to CFTR.*

**Hypothesis  
and objectives**

*We hypothesized that Kaftrio affects *Pseudomonas aeruginosa* infection by targeting bacterial off-targets. Our goal was to identify bacterial genetic and phenotypic changes associated with Kaftrio treatment, which may affect antibiotic resistance and/or host response, thereby affecting therapy effectiveness.*

**Essential  
methods**

*Longitudinal clonally-related isolates of *P. aeruginosa*, collected from 12 pwCF before and after Kaftrio treatment, were analyzed for phenotypes and susceptibility to antibiotics by minimum inhibitory concentration assay. Their impact on inflammation was evaluated using bronchial epithelial wt- and F508del-CFTR cells by ELISA. DNA and RNA sequencing of longitudinal clonal isolates evaluated whether Kaftrio induces mutations and/or alters bacterial virulence. Data were then correlated with clinical outcomes.*

**Results**

*Pyocyanin levels correlated with respiratory function, though variability was observed among concurrent clonal isolates. PwCF-specific differences in antibiotic susceptibility, inflammatory activity, and biofilm (a bacterial aggregation form) production associated with Kaftrio treatment were observed. DNA and RNA analyses revealed strain-dependent adaptation, with no overlap of mutated genes and only a small overlap of modulated transcripts across strains. Nonetheless, key pathways (metabolism, virulence, antibiotic resistance) were consistently affected. Of interest, we identified two hypermutable strains (i.e., they accumulate mutations at a greater rate than expected). Comparing *in vitro* and *in vivo* Kaftrio exposure showed shared variants and similarly modulated transcripts, suggesting a direct effect of Kaftrio on *P. aeruginosa* genome and transcriptome.*

**Conclusions**

*Our results indicate pwCF-specific differences in *P. aeruginosa* isolates collected during Kaftrio treatment, supporting the concept that it may impact bacterial functions. Expanding pwCF enrollment and extending isolate collection could further shed light on Kaftrio's mode of action and lead to careful monitoring and the use of targeted antibiotic therapies.*

**Razionale  
dello studio**

Il Kaftrio ha portato notevoli benefici clinici alle persone con fibrosi cistica (FC) per le quali è prescrivibile. Tuttavia, le variazioni osservate nella risposta al trattamento suggeriscono l'esistenza di meccanismi indipendenti dal CFTR.

**Ipotesi  
e obiettivi**

Abbiamo ipotizzato che Kaftrio modifichi l'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* agendo direttamente sui batteri, influenzando così l'efficacia del farmaco. L'obiettivo è stato valutare se Kaftrio incida sulla suscettibilità agli antibiotici e virulenza di *P. aeruginosa*.

**Metodi**

Varianti clonali di *P. aeruginosa* isolati da persone con FC, prima e dopo il trattamento con Kaftrio, sono stati analizzati per fenotipi chiave (per esempio la secrezione di composti dannosi come la piocianina), e per l'attività pro-infiammatoria su cellule epiteliali bronchiali sia con CFTR normale che con la mutazione F508del. Inoltre, è stato sequenziato il materiale genetico dei diversi tipi di batteri. I dati sono stati poi correlati con la risposta clinica.

**Risultati**

È emersa una correlazione tra i livelli di piocianina e la funzionalità respiratoria durante il trattamento con Kaftrio. Sono state riscontrate differenze individuali nella suscettibilità agli antibiotici, nell'impatto sulla risposta infiammatoria e nella produzione di biofilm (una forma di aggregazione batterica) associate al trattamento con Kaftrio. Le analisi del DNA e RNA hanno rivelato un adattamento dipendente dal ceppo, senza sovrapposizione di geni mutati e con una minima sovrapposizione di trascritti modulati. Tuttavia, le stesse vie metaboliche sono risultate coinvolte in tutte le varianti (metabolismo batterico, virulenza, resistenza agli antibiotici). Di particolare interesse, abbiamo identificato due varianti ipermutabili (che accumulano mutazioni più rapidamente dell'atteso). Il confronto tra l'esposizione a Kaftrio nel paziente e *in vitro* ha mostrato varianti condivise e trascritti modulati in modo simile, suggerendo un effetto diretto di Kaftrio sul genoma e sul trascrittoma di *P. aeruginosa*.

**Conclusioni**

I nostri risultati indicano differenze specifiche nelle varianti di *P. aeruginosa* raccolte prima e durante il trattamento con Kaftrio, avvalorando l'ipotesi che potrebbe influenzare le funzioni batteriche. L'ampliamento del numero di pazienti e l'estensione del periodo di raccolta delle varianti potrebbero chiarire ulteriormente il meccanismo d'azione di Kaftrio, permettendo un attento monitoraggio e l'uso di terapie antibiotiche mirate.



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

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



Left to right: Massimo Aureli, Marco Cafora, Nicoletta Loberto, Federica Briani, Anna Pistocchi, Francesca Forti. In the top squares, Massimo Locati, Laura Belleri, Sabrina Carbone, Rosaria Bassi, Dorina Dobi, Jonah Nesson

27

**Marco Cafora<sup>1</sup>, Dorina Dobi<sup>1</sup>, Jonah Nesson<sup>1</sup>, Francesca Forti<sup>2</sup>, Laura Belleri<sup>1</sup>, Nicoletta Loberto<sup>1</sup>, Rosaria Bassi<sup>1</sup>, Sabrina Carbone<sup>1</sup>, Massimo Locati<sup>1,3</sup>, Massimo Aureli<sup>1</sup>, Federica Briani<sup>2</sup>, Anna Pistocchi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Department of Biosciences, University of Milan, Italy - <sup>3</sup>IRCCS Humanitas Clinical and Research Center, Milan, Italy (FFC#12/2022, concluded)

### Background and rationale

*Cystic fibrosis has long posed significant challenges for those affected, reducing life expectancy and diminishing the quality of life. Recently, the approval of the Kaftrio drug has marked a milestone in the management of this disease. However, this treatment has no impact on the increased susceptibility to bacterial infections, a critical issue in the era of antibiotic-resistance.*

### Hypothesis and objectives

*Fortunately, the introduction of phage therapy, the use of viruses capable of selectively targeting and killing bacteria, is nearing realization. In the ongoing exploration of phages as therapeutic agents, a crucial consideration is their interaction with the host cells, especially the immune system. In a previous study, we established the anti-inflammatory impact of four selected phages using CFTR loss-of-function (LoF) zebrafish embryos as an experimental model. In this study, we dissected the interaction of DEV phage with macrophages, both wild-type and chemically CFTR inhibited, and epithelial bronchial cells carrying biallelic F508del-CFTR mutation (CuFi-1). These cells are crucial in the context of cystic fibrosis, where phages can be applied through inhalation.*

### Essential methods

*DEV lysates were prepared by infecting liquid exponential cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, purified and labelled. DEV was added in vitro to human macrophages obtained from circulating monocytes isolated from healthy donor buffy coats or to CuFi-1 cell line (ATCC: CRL-4013TM). In vivo, DEV was added to zebrafish embryos. Innate immune system activation was assessed through immunofluorescence or gene expression analyses.*

### Results

*DEV administration to both human cells decreased the expression of pro-inflammatory cytokines. When in contact with CuFi-1 cells, DEV was internalized and probably rapidly degraded through the lysosomal compartment. In zebrafish, DEV interaction with peripheral tissue-resident macrophages resulted in reduced neutrophil recruitment toward the inflammation site.*

### Conclusions

*This information sheds light on a previously undocumented aspect of phage therapy and underscores its potential not only as a bactericidal agent but also as a modulator of the immune response inducing anti-inflammatory effects. This could be particularly noteworthy within the context of excessive inflammation observed in the airways of individuals with cystic fibrosis.*

### Razionale dello studio

La recente approvazione del farmaco Kaftrio ha segnato una pietra miliare nella gestione della fibrosi cistica. Tuttavia, questo trattamento sembra non avere impatto sull'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche, un problema critico nell'era dei batteri resistenti agli antibiotici.

### Ipotesi e obiettivi

L'introduzione della terapia fagica, cioè l'uso di virus capaci di uccidere i batteri, è fortunatamente vicina alla realizzazione. Tuttavia, un aspetto importante ancora da analizzare riguarda l'interazione dei fagi con le cellule dell'ospite. Abbiamo già dimostrato l'effetto anti-infiammatorio di fagi in grado di attaccare *Pseudomonas aeruginosa*, usando come modello sperimentale larve di zebrafish con perdita di funzione (LoF) del gene CFTR. In questo studio, abbiamo esaminato le interazioni tra il fago DEV e i macrofagi umani, sia normali sia inibiti chimicamente per l'attività del canale CFTR. In parallelo abbiamo analizzato l'interazione tra DEV e cellule epiteliali bronchiali con mutazione biallelica F508del-CFTR (CuFi-1). Questi rappresentano due tipi cellulari importanti nel contesto della fibrosi cistica dove i fagi possono essere applicati tramite inalazione.

### Metodi

DEV è stato preparato infettando colture liquide in fase esponenziale di *Pseudomonas aeruginosa*, purificato, marcato e aggiunto a macrofagi umani o alla linea cellulare CuFi-1. Inoltre, i fagi sono stati somministrati in acqua a larve di zebrafish normali o LoF-CFTR per studiare l'interazione con il sistema immunitario innato. Le tecniche usate sono immunofluorescenza e analisi di espressione genica tramite RT-qPCR.

### Risultati

La somministrazione di DEV alle cellule umane ha ridotto l'espressione di citochine pro-infiammatorie. Inoltre abbiamo evidenziato che, a contatto con le cellule CuFi-1, DEV viene internalizzato e indirizzato al compartimento lisosomiale. In zebrafish, l'interazione di DEV con i macrofagi residenti nei tessuti periferici ha comportato una ridotta migrazione dei neutrofili verso il sito di infiammazione.

### Conclusioni

Queste informazioni fanno luce su un aspetto precedentemente non documentato della terapia fagica e ne evidenziano il potenziale non solo come agente battericida, ma anche come modulatore della risposta immunitaria, inducendo effetti anti-infiammatori. Ciò potrebbe essere particolarmente rilevante nel contesto dell'eccessiva infiammazione osservata nelle vie aeree delle persone con fibrosi cistica.

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

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



Left to right: Francesca Forti, Federica Briani, Jimena Nieto Noblecia, Federica Falchi, Shila Shehu

28

**Shila Shehu<sup>1</sup>, Allegra Laricchia<sup>1</sup>, David S. Horner<sup>1</sup>, Federica A. Falchi<sup>1</sup>, Francesca Forti<sup>1</sup>, Anna Pistocchi<sup>2</sup>, Marco Cafora<sup>2</sup>, Lisa Cariani<sup>3</sup>, Federica Briani<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biosciences, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - <sup>3</sup>Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy (FFC#16/2023, ongoing)

### Background and rationale

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

### Hypothesis and objectives

The specific aims of this project are: i) to develop a collection of phages able to kill *Pa* CF isolates, which are frequently multi-phage resistant; ii) to assess whether *Pa* infections in people treated with Kaftrio could be cured by the same phages active against isolates from untreated people or require specific phages.

### Essential methods

To reach the above aims, we are i) profiling phage susceptibility of *Pa* strains isolated before and at different times after the initiation of Kaftrio therapy; ii) characterizing new natural phages to assess their suitability for phage therapy; iii) modifying the host range of natural phages through random approaches like UV mutagenesis and *in vitro* evolution; and iv) characterizing new phage cocktails *in vitro* and *in vivo*, in non-mammal models of *Pa* infection.

### Preliminary results

Preliminary results obtained in the first year are: i) no correlation was found between the months of treatment with Kaftrio and the susceptibility to phages of 28 new isolates from people with CF. In the next months, we plan to analyse new strains isolated after longer treatment with the drug; ii) five phages potentially suitable for phage therapy have been identified through genomic and phenotypic characterization; iii) both UV mutagenesis of DEV phage and *in vitro* evolution of a two-phage cocktail confirmed to be effective in broadening phage host range towards CF clinical isolates. We are currently applying these approaches to other phages of our collection.

### Conclusions

Based on the preliminary results we have obtained so far, we are confident that we will achieve the project's goals: understanding the potential correlation between Kaftrio treatment and phage susceptibility, and generating a collection of phages specifically tailored to target *Pa* isolates from people with CF. This will bring us a step closer to the clinical application of phage therapy.

### Razionale dello studio

Questo progetto biennale fa parte di una linea di ricerca che ha l'obiettivo di rendere la fagoterapia un'opzione praticabile per curare l'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) nelle persone con fibrosi cistica (FC). Poiché i fagi sono estremamente specifici per i loro ospiti batterici, la fagoterapia richiede un approccio personalizzato, adattato alla suscettibilità del ceppo batterico infettante a specifici fagi.

### Ipotesi e obiettivi

Gli obiettivi di questo progetto sono: i) sviluppare una collezione di fagi in grado di uccidere isolati di *Pa* da persone con FC, isolati che sono spesso multiresistenti ai fagi; ii) valutare se le infezioni da *Pa* nelle persone trattate con Kaftrio possano essere curate con gli stessi fagi attivi contro isolati di persone non trattate o se siano necessari fagi specifici.

### Metodi

Per raggiungere questi obiettivi, stiamo: i) profilando la suscettibilità ai fagi di ceppi di *Pa* isolati prima e in diversi momenti dopo l'inizio della terapia con Kaftrio; ii) caratterizzando nuovi fagi naturali per valutare la loro idoneità alla fagoterapia; iii) modificando lo spettro d'ospite di fagi naturali attraverso approcci casuali come mutagenesi UV ed evoluzione *in vitro*; e iv) caratterizzando nuovi cocktail di fagi *in vitro* e *in vivo*, in modelli non mammiferi di infezione da *Pa*.

### Risultati preliminari

I risultati preliminari ottenuti nel primo anno sono: i) non abbiamo trovato alcuna correlazione tra i mesi di trattamento con Kaftrio e la suscettibilità ai fagi di 28 nuovi isolati da persone con FC. Nei prossimi mesi, analizzeremo nuovi ceppi isolati dopo un trattamento più lungo con il farmaco; ii) sono stati identificati cinque fagi potenzialmente idonei alla fagoterapia attraverso caratterizzazione genomica e fenotipica; iii) sia la mutagenesi UV del fago DEV che l'evoluzione *in vitro* di un cocktail a due fagi si sono dimostrate efficaci nell'ampliare lo spettro di ospite dei fagi verso isolati clinici di FC. Stiamo applicando questi approcci ad altri fagi della nostra collezione.

### Conclusioni

Sulla base dei risultati preliminari ottenuti finora, siamo fiduciosi di poter raggiungere gli obiettivi del progetto: comprendere la potenziale correlazione tra il trattamento con Kaftrio e la suscettibilità ai fagi, e generare una collezione di fagi specificamente progettati per colpire isolati di *Pa* da persone con FC. Questo ci avvicinerà all'applicazione clinica della fagoterapia.



**Ilaria Muzziolini<sup>1,2</sup>, Maria Concetta Marturano<sup>3</sup>, Anna Griego<sup>1,2</sup>, Beatrice Antinori<sup>1,2</sup>, Giorgia Moschetti<sup>1,2</sup>, Deborah Recchia<sup>2</sup>, Edoardo Scarpa<sup>1,2</sup>, Giulia De Giacomi<sup>3</sup>, Loris Rizzello<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Infection Dynamics Laboratory, University of Milan, Department of Pharmaceutical Science, Milan, Italy -

<sup>2</sup>Infection Dynamics Laboratory, National Institute of Molecular Genetics (INGM), Milan, Italy -

<sup>3</sup>Mycobacteriology Laboratory, University of Pavia, Department of Biotechnology Lazzaro Spallanzani, Pavia, Italy

(FFC#11/2023, concluded)

### Background and rationale

Lung infections are the leading cause of reduced life expectancy and mortality in patients with cystic fibrosis (CF). Among these, chronic bacterial colonization by opportunistic pathogens, such as the nosocomial *Mycobacterium abscessus* (Mab), are dramatically increasing over time. Currently, there are no specific drugs to effectively treat Mab infections, and existing treatment regimens often lack sufficient efficacy and bactericidal activity. The limited success of these regimens can be attributed to multiple factors, including the intrinsic antibiotic resistance (AMR) of Mab and its ability to adapt to hostile conditions within the host, enabling it to persist and evade antibiotics killing.

### Hypothesis and objectives

Given these challenges, there is an urgent need for innovative, targeted approaches to combat Mab infections while avoiding the arising of further resistance. The hereby research project aims to completely rethink chemotherapy design by taking inspiration from natural mechanisms – specifically, the strategy used by bacteriophages to infect and kill bacteria. We propose to exploit bacteriophage-derived protein, known as endolysins, to develop a novel, bacteria-selective therapy that can target and kill Mab without promoting antibiotic resistance.

### Essential methods

To this end, we identified a putative endolysin in the genome of the mycobacteriophage ZoeJ, designated LysBZoeJ. We successfully recombinantly produced and purified LysBZoeJ and developed an ad hoc plate reader assay to evaluate its potential bactericidal effects on Mab.

### Results

Our *in vitro* studies demonstrated that LysBZoeJ retains its enzymatic activity and significantly reduces Mab viability, performing comparably to clarithromycin, an antibiotic currently used in clinical settings to treat Mab infection.

### Conclusions

This project represents a promising avenue for the development of a novel therapeutic strategy against Mab, one of the most challenging pathogens affecting people with CF. Importantly, this approach has the potential to mitigate the rise of antimicrobial resistance by leveraging a naturally occurring bactericidal mechanism.

### Razionale dello studio

Le infezioni polmonari rappresentano la principale causa di ridotta aspettativa di vita e mortalità nelle persone con fibrosi cistica (FC). Tra queste, la colonizzazione batterica cronica da parte di patogeni opportunisti, come *Mycobacterium abscessus* (Mab), rappresenta una minaccia crescente e significativa. Attualmente, non esistono farmaci specifici per trattare efficacemente le infezioni da Mab e i regimi terapeutici esistenti spesso mancano di efficacia e attività battericida. Il limitato successo di questi trattamenti è attribuibile a vari fattori, tra cui la resistenza intrinseca agli antibiotici di Mab e la sua capacità di adattarsi alle condizioni ostili dell'ospite, permettendogli di persistere e sfuggire all'azione antibiotica.

### Ipotesi e obiettivi

Data la complessità nel trattare le infezioni da Mab, è necessario sviluppare approcci innovativi e mirati per combattere queste infezioni, evitando al contempo lo sviluppo di ulteriori resistenze. Questo progetto di ricerca ha l'obiettivo di ripensare la progettazione degli antibiotici, ispirandosi ai meccanismi naturali usati dai batteriofagi per infettare e uccidere i batteri. Per cui, questo progetto propone di sfruttare proteine derivanti dai batteriofagi, conosciute come endolisine, per sviluppare una nuova terapia selettiva in grado di riconoscere e uccidere Mab senza promuovere la resistenza agli antibiotici.

### Metodi

A tal fine, abbiamo identificato una potenziale endolisina nel genoma del batteriofago ZoeJ, denominata LysBZoeJ. Attraverso tecniche di produzione di proteine ricombinanti, siamo riusciti a produrre e purificare LysBZoeJ e abbiamo, infine, sviluppato un test su piastra per valutare i suoi potenziali effetti batterici su Mab.

### Risultati

I nostri studi *in vitro* hanno dimostrato che LysBZoeJ mantiene la sua attività enzimatica e riduce significativamente la vitalità di Mab, con risultati comparabili a quelli della claritromicina, un antibiotico attualmente usato in clinica per trattare le infezioni da Mab.

### Conclusioni

In conclusione, questo progetto propone una nuova promettente alternativa terapeutica contro Mab, uno dei patogeni più difficili da trattare nelle persone con FC. Un aspetto fondamentale di questo approccio è il suo potenziale nel mitigare l'aumento della resistenza antimicrobica, sfruttando un meccanismo battericida naturale.



Investigating the safety of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) exposure during pregnancy and early development

Studio sulla sicurezza di Kaftrio in gravidanza e in giovane età



Left to right: Mattia Camera, Caterina Montani, Lucilla Nobbio, Giovanna Capodivento, Irene Di Patrizi

30

**Lucilla Nobbio<sup>1</sup>, Giovanna Capodivento<sup>1</sup>, Caterina Montani<sup>1</sup>, Andrea Armirotti<sup>2</sup>, Rosalia Bertorelli<sup>2</sup>, Fabio Benfenati<sup>2</sup>, Mattia Camera<sup>3</sup>, Davide Visigalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy - <sup>2</sup>Analytical Chemistry Facility, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - <sup>3</sup>Department of Neurology, Rehabilitation, Ophthalmology, Genetics, Maternal and Child Health (DINOGMI), University of Genoa, Italy (FFC#2/2024, new)

### Background and rationale

*DEGS (delta-4 sphingolipid desaturase) is the enzyme that converts dihydroceramides (dHCer) into ceramides (Cer) in the de-novo synthetic pathway of sphingolipids. Severe DEGS malfunctioning and subsequent dHCer accumulation is known to cause impairment in the development of peripheral (PNS) and central nervous systems (CNS), mostly due to a derangement in myelin formation and maintenance.*

### Hypothesis and objectives

*We have evidence of an inhibitory effect of the triple combination drug Kaftrio (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor, ETI) on DEGS. Therefore, we hypothesize that the use of Kaftrio during pregnancy and in the early phases of human development might be potentially at risk to cause alterations of the physiological myelination process.*

### Essential methods

*To rule out our concerns, we propose an animal study mimicking, in mice, the exposure to Kaftrio occurring during human pregnancy, birth and throughout the early stages of development. We will administer Kaftrio in food to pregnant mothers, before and throughout the pregnancy and for the first three months after the mice's birth. During this timeframe, that covers the whole development from in utero to adult individuals, we will perform molecular, in vivo, and ex vivo investigations. Moreover, we will also track a specific marker of DEGS1-related hypomyelination and other markers related to PNS myelin impairment. Finally, since individuals with malfunctioning DEGS frequently develop epilepsy, we will also specifically assess this aspect for Kaftrio exposure.*

### Preliminary results

*We already demonstrated that the molecule responsible for the inhibitory effect on DEGS is tezacaftor and that a slight dHCer accumulation occurs in the brain of mice administered with ETI for 5 days.*

### Conclusions

*Thanks to Kaftrio, women with cystic fibrosis can now afford maternity and several of them do not interrupt Kaftrio treatment during pregnancy. Given the evidence we have collected on DEGS inhibition and the publicly available data on tezacaftor, it is important to rule out any potential safety liabilities related to the use of Kaftrio during pregnancy and in the early development stages of individuals with cystic fibrosis.*

### Razionale dello studio

DEGS (delta-4 desaturasi degli sfingolipidi) è l'enzima che converte le diidroceramidi (dHCer) in ceramidi (Cer) nella via sintetica de-novo degli sfingolipidi. È noto che il malfunzionamento di DEGS e il conseguente accumulo di dHCer causano disturbi nello sviluppo del sistema nervoso periferico (SNP) e centrale (SNC), principalmente a causa di uno squilibrio nella formazione e nel mantenimento della mielina.

### Ipotesi e obiettivi

Recentemente, abbiamo raccolto prove di un effetto inibitorio della tripla combinazione di farmaci Kaftrio (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor) su DEGS. Pertanto, ipotizziamo che l'uso di Kaftrio durante la gravidanza e nelle prime fasi dello sviluppo umano potrebbe causare alterazioni del fisiologico processo di mielinizzazione e quindi tradursi in effetti negativi sulla salute delle giovani persone con fibrosi cistica. Obiettivo del nostro progetto è pertanto monitorare gli effetti di un'esposizione prolungata a Kaftrio sulla maturazione e la funzionalità del sistema nervoso.

### Metodi

Per approfondire questo aspetto, proponiamo uno studio *in vivo* su un modello animale che riproduca l'esposizione al Kaftrio che si verifica durante la gravidanza, la nascita e le prime fasi dello sviluppo nell'uomo. In particolare, somministreremo ai topi il Kaftrio attraverso il cibo, prima e durante la gravidanza e per i primi tre mesi dopo la nascita dei topi. Durante questo periodo, che copre l'intero sviluppo, dalla gestazione in utero all'individuo adulto, eseguiremo indagini molecolari, *in vivo* ed *ex vivo*. Inoltre, tratteremo anche un marcatore specifico di ipomielinizzazione correlato a DEGS1 e altri marcatori legati alla compromissione della mielina del SNP. Infine, poiché gli individui con DEGS malfunzionante sviluppano frequentemente epilessia, valuteremo specificamente anche questo aspetto in seguito all'esposizione a Kaftrio.

### Risultati preliminari Conclusioni

Abbiamo dimostrato che la molecola responsabile dell'effetto inibitorio su DEGS è tezacaftor e che l'inibizione, seppur debole, avviene anche *in vivo* in topi a cui è stato somministrato ETI per 5 giorni.

Grazie ai dati che abbiamo raccolto sull'inibizione di DEGS e quelli pubblicamente disponibili su tezacaftor, è importante escludere qualsiasi potenziale responsabilità in termini di sicurezza correlata all'uso dell'ETI durante la gravidanza e nelle prime fasi di sviluppo delle persone con fibrosi cistica.



A personalized repurposing approach based on anti-inflammatory/antioxidant treatment to increase the efficacy of CFTR modulators

Un approccio di terapia personalizzata con antinfiammatori e antiossidanti per aumentare l'efficacia dei modulatori di CFTR



Left to right: Onofrio Laselva, Valeria Capurro, Enza Montemitro

31

**Onofrio Laselva<sup>1</sup>, Valeria Capurro<sup>2</sup>, Enza Montemitro<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Italy - <sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy - <sup>3</sup>Pediatric Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy

(FFC#4/2024, new)

### Background and rationale

People with cystic fibrosis (pwCF) are prone to contracting bacterial lung infections by *Pseudomonas aeruginosa*, known to be the major pathogen in the CF lung, leading to increased inflammatory response, significantly contributing to morbidity and mortality.

### Hypothesis and objectives

The patient-to-patient variation in Kaftrio response might be attributed to several mechanisms including the different inflammatory response and the related oxidative stress across patients. Therefore, in vitro studies of patient-specific response to anti-inflammatory/antioxidant compounds under infection could help elucidate the role of chronic inflammation and oxidative stress in drug resistance in order to develop personalized combination therapies.

### Essential methods

We will perform dose-response evaluation of anti-inflammatory/antioxidant compounds in pre-clinical and clinical stages in CFBE cells by the analysis of the inflammatory/oxidative status detected by specific markers. Then, we will investigate gene expression and protein release of pro-inflammatory cytokines (by RT-qPCR and ELISA assays) and the antioxidant activity of these drugs by measuring the intracellular ROS levels (by ROS-sensitive fluorescent probe) in HNE under infection condition. Moreover, we will determine if anti-inflammatory/antioxidant drugs treatment will improve CFTR rescue in HNE under infection/inflammation by immunoblotting, Ussing Chamber and Fluorescence Membrane Potential assay.

### Preliminary results

Our preliminary studies show that the anti-inflammatory Dimethyl fumarate (DMF) exhibits antioxidant/anti-inflammatory properties in CF Bronchial Epithelial (CFBE) and CF Human Nasal Epithelial (HNE) cells. Moreover, we found that Kaftrio-mediated rescue of F508del-CFTR is reduced by LPS and restored by DMF in both CFBE and HNE cells. Interestingly, we found that DMF reduced the inflammatory response and intracellular ROS levels in HBE cells harboring rare mutations.

### Conclusions

In vitro screening of patient-specific responses to CFTR modulators under infection/inflammation conditions could prove to be a valuable tool for personalized combination therapy approaches with the appropriate anti-inflammatory and antioxidant to improve the efficacy of CFTR modulators in pwCF.

### Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica (FC) sono soggetti a frequenti infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa* che inducono uno stato infiammatorio cronico e stress ossidativo nel polmone del paziente.

### Ipotesi e obiettivi

Nell'ultima decade, la ricerca si è focalizzata maggiormente sullo sviluppo di modulatori della CFTR che hanno la capacità di ripristinare l'attività funzionale della proteina. Nonostante Kaftrio abbia migliorato notevolmente la qualità della vita nelle persone con FC, studi clinici hanno mostrato risposte variabili tra pazienti. Questa variabilità potrebbe essere dovuta all'infiammazione polmonare indotta dall'infezione ricorrente da *P. aeruginosa* che si riscontra comunemente nelle persone con FC. Le terapie antinfiammatorie/antiossidanti sono, quindi, di particolare interesse per rallentare la progressione del danno polmonare e migliorare la qualità della vita delle persone con FC.

### Metodi

Per prima cosa isoleremo *P. aeruginosa* dai campioni di espettorato e raccoglieremo cellule epiteliali nasali mediante una tecnica di brushing nasale da persone con FC sia con mutazione F508del sia con mutazioni rare. Verificheremo l'attività antinfiammatoria misurando l'espressione genica e il rilascio delle citochine pro-infiammatorie (mediante RT-qPCR ed ELISA) e l'attività antiossidante misurando i livelli intracellulari dei ROS (mediante sonde specifiche) dei farmaci nelle cellule primarie nasali infettate dallo *P. aeruginosa* isolato dallo stesso donatore. Inoltre, determineremo se l'effetto antinfiammatorio/antiossidante dei farmaci migliori l'efficacia dei modulatori della CFTR sia mediante western blotting che saggi funzionali (Camera di Ussing e FMN assay).

### Risultati preliminari

I nostri risultati preliminari hanno dimostrato che l'antinfiammatorio Dimethyl Fumarato (DMF) presenta un'attività antinfiammatoria/antiossidante sia nelle cellule bronchiali immortalizzate sia nelle cellule primarie nasali di pazienti. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'efficacia del Kaftrio nel ripristinare la F508del-CFTR si riduce in presenza dell'LPS ma risulta essere ripristinato in presenza del DMF. Dati preliminari dimostrano che DMF riduce sia la risposta infiammatoria che lo stress ossidativo anche nelle cellule primarie bronchiali di persone con FC con mutazioni rare.

### Conclusioni

Poiché l'infezione/infiammazione sembra ridurre l'efficacia dei modulatori della CFTR, ci auguriamo che l'uso degli antinfiammatori/antiossidanti aumenti l'efficacia delle terapie farmacologiche nelle vie aeree delle persone con FC.

Development of phage therapy for treating *Mycobacterium abscessus* lung infections in people with cystic fibrosis

Avanzamenti della terapia fagica per il trattamento di infezioni batteriche polmonari da *Mycobacterium abscessus* in persone con fibrosi cistica



From the top, right to left: Luca Magnani, Andrea Bonacorsi, Laura Rindi, Mariagrazia Di Luca, Caterina Ferretti, Noemi Poma, Sjoerd Entius, Elisa Fausti, Claudia Campobasso, Greta Amendola, Alessandro Fusco, Giacomo Tornabene, Sara Bolognini

32

**Mariagrazia Di Luca<sup>1</sup>, Laura Rindi<sup>2</sup>, Andrea Moscatelli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Pisa, Italy - <sup>2</sup>Department of Translational Research on New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Italy - <sup>3</sup>Intensive Care Unit, IRCCS Istituto G. Gaslini, Genoa, Italy

(FFC#6/2024, new)

**Background and rationale**

*Mycobacterium abscessus* (Mab) infections present significant treatment challenges, particularly among immunocompromised and cystic fibrosis people. Conventional antibiotic therapies often fail due to antibiotic resistance, as well as the ability of this bacterium to live within human cells like macrophages, highlighting the need for alternative treatment strategies. In this context, mycobacteriophages are emerging as promising candidates since they can specifically target and lyse antibiotic-resistant Mab.

**Hypothesis and objectives**

The aim of this work was to isolate and characterize novel mycobacteriophages targeting Mab, including antibiotic-resistant strains, as well as to investigate their activity in an *ex vivo* macrophage infection model.

**Essential methods**

Methods in this study included bioinformatics analyses, microscopy (transmission electron and confocal microscopy), double-layer agar assay and *ex vivo* infection models.

**Preliminary results**

Four novel mycobacteriophages were isolated from environmental samples using the non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* mc2155 as host. Genomic analysis confirmed the lack of genes involved in virulence and antibiotic resistance. All the phages were characterized by a siphoviral morphology when analyzed at the transmission electron microscope, a narrow host range when tested against a panel of Mab clinical isolates and efficient bacterial killing within 30 minutes with the release of 100 – 250 new phage virions per bacterial cell. Furthermore, phages exhibited stability across a wide range of pH values (4-6), including those found in the acidic environment of phagosomes. Given the intracellular lifestyle of Mab, the activity of one selected phage within the endocytic pathway was assessed using a human THP-1 macrophage infection model, showing a significant reduction in bacterial viability 24 hours post-infection. In addition, preliminary confocal microscopy results demonstrated phage uptake by macrophages, with ongoing investigations assessing the co-localization of phage and bacteria within the cells.

**Conclusions**

These findings highlight the potential of these phages for further research and possible clinical application. Consequently, our group aims to expand the laboratory phage library to cover as many mycobacterial strains as possible, engineering phages, investigate phage combinations with antibiotics currently used in clinical settings and introduce *ex vivo* pulmonary cell infection models.

**Razionale dello studio**

Le infezioni causate da *Mycobacterium abscessus* (Mab) sono generalmente difficili da trattare, specialmente in persone con infezioni polmonari e fibrosi cistica. Le terapie antibiotiche convenzionali spesso falliscono a causa della resistenza agli antibiotici, oltre alla capacità di questo batterio di vivere all'interno delle cellule umane, evidenziando la necessità di strategie di trattamento alternative. In questo contesto, i micobatteriofagi stanno emergendo come candidati promettenti.

**Ipotesi e obiettivi**

L'obiettivo di questo lavoro è di isolare e caratterizzare nuovi micobatteriofagi attivi contro Mab, compresi ceppi clinici resistenti agli antibiotici, e indagare la loro attività in un modello di infezione di macrofagi *ex vivo*.

**Metodi**

I principali metodi usati in questo studio includono analisi bioinformatiche, microscopia (elettronica a trasmissione e confocale), il saggio di placca ed esperimenti di infezione *ex vivo*.

**Risultati preliminari**

Sono stati isolati quattro nuovi micobatteriofagi da campioni ambientali usando come ospite il ceppo non patogeno *Mycobacterium smegmatis* mc2155. L'analisi genomica ha confermato l'assenza di geni coinvolti nella virulenza e nella resistenza agli antibiotici. Tutti i fagi sono caratterizzati da una morfologia siphovirus, uno spettro d'ospite ristretto quando testati su un pannello di isolati clinici di Mab e un'efficace lisi batterica entro 30 minuti, con il rilascio di 100 - 250 nuove particelle fagiche per cellula batterica. Inoltre, i fagi sono stabili in un ampio intervallo di valori di pH, compresi quelli presenti nell'ambiente acido dei fagosomi (pH 4-6). Data la possibile vita intracellulare di Mab, l'attività di un fago selezionato è stata valutata usando un modello di infezione dei macrofagi umani THP-1, causando una riduzione significativa della vitalità batterica 24 ore post-infezione. Inoltre, i risultati preliminari di microscopia confocale dimostrano l'uptake del fago da parte dei macrofagi ed è attualmente in corso la valutazione della co-localizzazione fago-batterio all'interno delle cellule.

**Conclusioni**

I risultati evidenziano il potenziale di questi fagi per possibili applicazioni cliniche. A tal fine, il nostro gruppo punta ad ampliare la collezione di fagi disponibile nel laboratorio con l'obiettivo di coprire il maggior numero possibile di varianti di Mab, ingegnerizzare i fagi, indagare la combinazione di fagi con gli antibiotici attualmente usati in clinica e introdurre modelli di infezione *ex vivo* con linee cellulari polmonari.

A combined therapy against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* co-infections in cystic fibrosis

Una terapia combinata contro le co-infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* in fibrosi cistica



Left to right: Anna Esposito, Annalisa Guaragna, Antonella Migliaccio, Eliana De Gregorio, Maria Stabile

33

### Annalisa Guaragna<sup>1</sup>, Eliana De Gregorio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy - <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

(FFC#8/2024, new)

#### Background and rationale

*P. aeruginosa* (Pa)-*S. aureus* (Sa) co-infections are frequently found together in the respiratory tract of people with cystic fibrosis (pwCF) and their interaction has been clearly linked to a more rapid lung function decline. Therefore, the management of polymicrobial infections by developing novel antibacterial agents is a real challenge in CF drug discovery.

#### Hypothesis and objectives

Our aim is to evaluate the *in vitro* and *in vivo* action of two molecules, L-IM15 and L-IM16, selected as lead compounds, on models of methicillin resistant Sa and multidrug resistant Pa co-infections to mimic the most similar pwCF clinic conditions. It is also our intention to assess the outcome of the combined administration of L-IM15 and L-IM16, on both mono- and co-infection models in search for an additive or synergistic anti-infective effect. Their antimicrobial action will be compared with those of conventional antibiotics. As L-IM15 and 16 are eligible, an aerosol administration will be also considered.

#### Essential methods

The compounds will be prepared in small (for *in vitro* studies) and multi-gram scale (for *in vivo* exps) by an eco-friendly synthetic route. Proteomic studies and other microbiological assays will be exploited to evaluate the antimicrobial activity and to deeper elucidate the mechanism of action. *In vivo* efficacy of L-IM15 and 16 separately or in coadministration will be tested in murine models of Sa-Pa co-infections.

#### Preliminary results

Our previously FFC Ricerca funded studies revealed the *in vivo* antibacterial activity of these two glycomimetics (molecules whose structure mimic that of sugars) in mouse models of acute and chronic Pa infections. *In vitro* assays suggested that they could act with a different mode of action, i.e. as an antivirulence/anti-adhesion agent (L-IM15) and as a classical antimicrobial one (L-IM16). In addition, L-IM16 was also able to inhibit the growth and biofilm formation of Sa and of a plethora of CF relevant pathogens.

#### Conclusions

The innovative and chemically different structure of these compounds from common antibiotics along with the virulence-blocker features of one of the two could be of relevance in the search for alternative therapeutic treatments, especially to overcome the problem of resistance which is increasingly pressing in states of infection and decisive in co-infections where a concurrent treatment directed at both bacteria may improve CF clinical outcomes. This therapeutic alternative against chronic infections could be beneficial to all people with CF regardless of their type of mutation.

#### Razionale dello studio

Le co-infezioni da *P. aeruginosa* (Pa) e *S. aureus* (Sa) sono spesso presenti nel tratto respiratorio di persone con fibrosi cistica (FC) e spesso collegate a un declino più rapido della funzione polmonare. Pertanto, il controllo delle infezioni polimicrobiche con lo sviluppo di nuovi agenti antibatterici è una delle sfide in FC.

#### Ipotesi e obiettivi

Il nostro obiettivo è la valutazione *in vitro* e *in vivo* di due molecole, L-IM15 e L-IM16, selezionate da precedenti studi, su modelli di co-infezioni da Sa meticillina-resistente e da Pa multiresistente in modo da imitare le condizioni cliniche più simili a quelle delle persone con FC. Verrà valutato l'effetto della somministrazione combinata di L-IM15 e L-IM16 su modelli di mono- e di co-infezione, alla ricerca di un effetto antibatterico additivo o sinergico. L'azione antimicrobica sarà confrontata con quella degli antibiotici convenzionali. La struttura di L-IM15 e 16 li rende idonei per considerarne anche la loro somministrazione via aerosol.

#### Metodi

I composti saranno preparati in scala di laboratorio (per studi *in vitro*) e più ampia (per quelli *in vivo*) mediante una via sintetica eco-compatibile. Studi di proteomica per rilevare i cambiamenti nei livelli proteici insieme ai saggi di attività antibatterica saranno utili per chiarire più a fondo il meccanismo d'azione. L'efficacia *in vivo* di L-IM15 e 16 separatamente o in co-somministrazione sarà testata in modelli murini di co-infezioni Sa-Pa.

#### Risultati preliminari

Precedenti studi finanziati da FFC Ricerca hanno evidenziato l'attività antibatterica *in vivo* di questi due glicomimetici (la cui struttura mima quella degli zuccheri) in modelli murini di infezioni acute e croniche da Pa. I test *in vitro* hanno suggerito una loro diversa modalità d'azione, cioè come agente antivirulenza/anti-adesione, L-IM15 e come antimicrobico classico, L-IM16. Inoltre, L-IM16 è stato anche in grado di inibire la crescita e la formazione di biofilm di Sa e di molti di patogeni frequenti in FC.

#### Conclusioni

La struttura innovativa dei composti, diversa da quella dei comuni antibiotici, insieme alle proprietà anti-virulenza di uno dei due, potrebbe essere utile nella ricerca di terapie alternative e per il superamento del fenomeno della resistenza, sempre più pressante nelle infezioni e nelle co-infezioni nelle quali un attacco diretto a entrambi i batteri potrebbe migliorare gli esiti clinici della FC. Questa alternativa terapeutica contro le infezioni croniche potrebbe essere utile a tutte le persone con FC, indipendentemente dal tipo di mutazione.





**Stefano Sabatini<sup>1</sup>, Laura Rindi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Italy - <sup>2</sup>Department of Translational Research on New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Italy

(FFC#10/2024, new)

**Background and rationale**

*Mycobacterium abscessus* (Mab) is a rapidly growing nontuberculous mycobacterium associated with several diseases in humans, of which lung disease is the most common as in people with cystic fibrosis (CF). The treatment of this pathogen represents a challenge due to the multidrug-resistant nature of this species.

**Hypothesis and objectives**

The project aims to contrast Mab spread by a two-pronged strategy involving phenotypic medicinal chemistry approaches. In the first strategy we would exploit our in-house library of antibacterial compounds in search of Hits endowed with anti-Mab activity. The second one will take advantage of High Throughput Screenings (HTSs) already reported in literature, selecting Hit compounds not yet developed by other medicinal chemistry groups. The identification of Hit compounds that hopefully will be optimized in potent and safe anti-Mab Lead compounds and then preclinical candidates, might contribute to the development of therapies for the treatment of complicated infections caused by Mab.

**Essential methods**

Once anti-Mab Hit compounds will be emerged from the screening against Mab ATCC19977, an iterative cycle of chemical modification/biological evaluation will start with the aim of improve anti-Mab activity, cytotoxicity and ADME-Tox profile to obtain validated Hit compounds ready for studies on clinical isolates (MIC, antibiofilm activity and intracellular activity on THP-1 infected cells).

**Preliminary results**

From a preliminary screening of only 10 molecules belonging to our in-house library, two quinolone compounds (M20 and MH4) showed a promising activity (MIC about 12.5 µg/mL) when tested against four Mab clinical isolates previously collected and characterized by UNIPI. Moreover, 3 out of 17 "putative" anti-Mab Hit compounds, have been tested against Mab clinical isolates and ATCC19977 and among three niclosamide derivatives a compound emerged as an interesting Hit (MIC about 3.125 µg/mL on Mab ATCC19977).

**Conclusions**

Given the current poor outcome in CF people with Mab infection more effective antimicrobials are needed. The antibiofilm and intracellular activity we would obtain with the anti-Mab Lead compounds can improve the killing efficacy and reduce the time of treatment with future benefits for Mab infected CF people.

**Razionale dello studio**

*Mycobacterium abscessus* (Mab) è un micobatterio non tubercolare a rapida crescita associato a diverse malattie negli esseri umani, tra cui la più comune è la malattia polmonare, come nelle persone con fibrosi cistica. Il trattamento di questo patogeno rappresenta una sfida a causa della farmaco-resistenza multipla di questa specie.

**Ipotesi e obiettivi**

Il progetto mira a contrastare la diffusione di Mab tramite un duplice approccio fenotipico di chimica farmaceutica. Nella prima strategia sfrutteremo la nostra libreria di composti antibatterici alla ricerca di *Hit compounds* dotati di attività anti-Mab. La seconda trarrà vantaggio da studi di *High Throughput Screenings* (HTS) già riportati in letteratura, selezionando *hit compounds* non ancora sviluppati da altri gruppi di chimica farmaceutica. L'identificazione di *hit compounds* che saranno ottimizzati in *lead compounds* con potente attività anti-Mab e più sicuri (e quindi candidati preclinici), potrebbe contribuire allo sviluppo di terapie per il trattamento di infezioni complicate causate da Mab.

**Metodi**

Una volta che gli *Hit compounds* con potente attività anti-Mab saranno emersi dallo screening su Mab ATCC19977, inizierà un ciclo iterativo di modificazione chimica/valutazione biologica con l'obiettivo di migliorare l'attività anti-Mab, la citotossicità e il profilo ADME-Tox per ottenere composti pronti per studi su isolati clinici (MIC, attività anti-biofilm e attività intracellulare su cellule THP-1 infettate).

**Risultati preliminari**

Da uno screening preliminare di sole 10 molecole appartenenti alla nostra libreria di antibatterici, due composti chinolonici (M20 e MH4) hanno mostrato una promettente attività (MIC 12,5 µg/mL) quando testati contro quattro isolati clinici di Mab precedentemente raccolti e caratterizzati da UNIPI. Inoltre, 3 su 17 composti riportati come aventi attività anti-Mab, sono stati testati contro isolati clinici di Mab e ATCC19977 e tra tre derivati della niclosamide un composto è emerso come un *Hit* interessante (MIC circa 3,125 µg/mL su Mab ATCC19977).

**Conclusioni**

Considerata l'attuale scarsa efficacia dei trattamenti nelle persone con FC con infezione da Mab è necessario individuare nuove strategie terapeutiche. L'attività anti-biofilm e intracellulare che vorremmo ottenere con i *lead compounds* anti-Mab potrebbe migliorare l'efficacia e ridurre il tempo di trattamento con benefici futuri per le persone con FC infettate da Mab.



**Alberto Battezzati<sup>1</sup>, Federico Alghisi<sup>2</sup>, Stefano Costa<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>CF Center, Ospedale Bambino Gesù, Roma - <sup>3</sup>U.O.S.D. Pediatric Gastroenterology and Cystic Fibrosis, AOU Messina, Italy

(FFC#14/2024, new)

**Background and rationale**

CFTR modulators improve lung function in CF, but extrapulmonary complications like CFRD persist. We studied insulin secretion defects and glucose tolerance in 600 people with CF (2013-2023), mainly before modulator availability, to assess their long-term impact.

**Hypothesis and objectives**

This study investigates if pre-existing insulin secretory defects predict dysglycemia, respiratory function decline, malnutrition, cardiometabolic risks, and mortality in CF. We will also assess if modulators mitigate these effects.

**Essential methods**

This retrospective study analyzes data from our 2013-2023 cohort. We will extract clinical outcome data and CFTR modulator therapy information from patient records and correlate these with previously collected glucose tolerance and insulin secretion data.

**Preliminary results**

We found a dynamic pattern of insulin secretion around puberty and a decline in  $\beta$ -cell sensitivity to glucose. Worse  $\beta$ -cell function correlated with early lung disease and malnutrition. Prepubertal insulin secretion predicted adult height and CFRD. Modulators showed limited impact on glucose tolerance.

**Conclusions**

This study will reveal the long-term impact of insulin secretory defects on key CF outcomes and assess the real-world effectiveness of modulators in mitigating these effects. This knowledge will improve CFRD management and inform personalized treatment strategies. Data sharing will promote further research in this area.

**Razionale dello studio**

I modulatori CFTR migliorano la funzione polmonare nella fibrosi cistica (FC), ma le complicanze extrapolmonari come il CFRD (Cystic Fibrosis Related Diabetes, diabete correlato alla fibrosi cistica) persistono. Abbiamo studiato i difetti di secrezione insulinica e la tolleranza al glucosio in 600 persone con FC (2013-2023), principalmente prima della disponibilità dei modulatori, per valutarne l'impatto a lungo termine.

**Ipotesi e obiettivi**

Questo studio indaga se i difetti di secrezione insulinica preesistenti predicano la disglucemia, il declino della funzione respiratoria, la malnutrizione, i rischi cardiometabolici e la mortalità nella FC. Valuteremo anche se i modulatori mitigano questi effetti.

**Metodi**

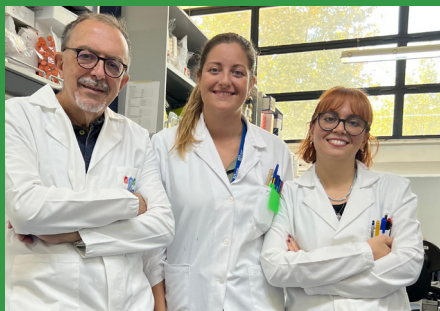
Questo studio retrospettivo analizza i dati della nostra coorte 2013-2023. Estrarrà i dati sugli esiti clinici e le informazioni sulla terapia con modulatori CFTR dalle cartelle cliniche dei pazienti e li metterà in correlazione con i dati sulla tolleranza al glucosio e sulla secrezione insulinica precedentemente raccolti.

**Risultati preliminari**

Abbiamo trovato un andamento dinamico della secrezione insulinica intorno alla pubertà e un declino della sensibilità delle cellule beta al glucosio. Una peggiore funzione delle cellule beta era correlata a una malattia polmonare precoce e alla malnutrizione. La secrezione insulinica prepuberale prevedeva l'altezza da adulto e la CFRD. I modulatori hanno mostrato un impatto limitato sulla tolleranza al glucosio.

**Conclusioni**

Questo studio rivelerà l'impatto a lungo termine dei difetti di secrezione insulinica sui principali esiti della FC e valuterà l'efficacia nel mondo reale dei modulatori nel mitigare questi effetti. Questa conoscenza migliorerà la gestione del CFRD e contribuirà a definire strategie di trattamento personalizzate. La condivisione dei dati promuoverà ulteriori ricerche in questo settore.



**Daniela Guidone<sup>1</sup>, Martina De Santis<sup>1</sup>, Maria Stabile<sup>2</sup>, Eliana De Gregorio<sup>2</sup>, Luis J.V. Galiotta<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Naples, Italy - <sup>3</sup>Department of Translational Medical Sciences (DISMET), University of Naples Federico II, Naples, Italy (GMRF#1/2024, new)

**Background and rationale**

*The airway epithelium represents a defense barrier against pathogens. Defective bacterial eradication with recurrent infection and inflammation is a common hallmark of many chronic respiratory diseases, including cystic fibrosis (CF). In our previous study we found that treatment of human bronchial epithelia (HBE) with IL-17A/TNF- $\alpha$  has a high impact on cell transcriptome, with upregulation of genes involved in antimicrobial response, neutrophil recruitment and transepithelial ion transport. A result of these changes is a hyperviscosity of the airway surface, that is reversed by  $\beta$ -adrenergic stimulation. The switch from the hyperviscous to fluid state is dependent on CFTR since it is not observed in CF epithelia.*

**Hypothesis and objectives**

*We hypothesize that the hyperviscous state could be instrumental to immobilize bacteria and promote their killing, therefore our aim is to evaluate how the airway surface properties impact on bacteria viability and motility.*

**Essential methods**

*We deposited 1000 cfu of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 and RP73 strains) on a selected spot of the apical surface of HBE. After 3 h incubation, HBE were pressed on agar plates. To search for potential antimicrobial molecules, we analyzed the apical fluids of HBE by mass spectrometry (MS).*

**Preliminary results**

*Under control conditions, bacteria formed colonies that were distributed all over the epithelial surface. Instead, in HBE treated with IL-17/TNF- $\alpha$ , bacteria remained confined to the site in which they were originally deposited. MS analysis of fluid collected from the apical surface of HBE treated with cytokines revealed the increase of many defense molecules and chemoattractants for immune cells (IL-19, CSF3, CXCL17, CCL20). Surprisingly, we also found a specific set of membrane proteins including ATP12A, SLC26A4, DUOX2, SLC5A1, but not CFTR or ENaC. By electron microscopy, we found evidence of extracellular vesicles (EVs) in the supernatant of HBE. FACS experiments revealed an increased abundance of EVs upon treatment with IL-17A/TNF- $\alpha$  and the presence of CD63, CD9 and CD81 markers.*

**Conclusions**

*We hypothesize that EVs may be involved in antimicrobial activity or in communication of regulatory stimuli to epithelial and immune cells. Our results reveal a program, induced by IL-17A plus TNF- $\alpha$ , that has the potential to limit the ability of bacteria to attack and invade airway epithelia.*

**Razionale dello studio**

L'epitelio delle vie aeree è una barriera contro gli agenti patogeni. Una ridotta capacità di eliminare i batteri, con infezioni e infiammazioni ricorrenti, è un segno comune di molte malattie respiratorie croniche, inclusa la fibrosi cistica (FC). Nel nostro studio precedente abbiamo scoperto che il trattamento degli epitelii bronchiali umani (HBE) con IL-17A/TNF- $\alpha$  aumenta l'espressione di geni coinvolti nella risposta antimicrobica, nel reclutamento dei neutrofili e nel trasporto ionico transepitheliale. Un risultato di questi cambiamenti è un'iperviscosità della superficie, che ritorna fluida con stimolazione beta-adrenergica. Il passaggio dallo stato iperviscoso a quello fluido dipende da CFTR poiché non è osservato negli epitelii FC.

**Ipotesi e obiettivi**

Ipotizziamo che lo stato iperviscoso sia utile per immobilizzare i batteri e promuoverne l'uccisione. Pertanto il nostro obiettivo è valutare come le proprietà della superficie delle vie aeree influenzano sulla vitalità e motilità dei batteri.

**Metodi**

Abbiamo depositato 1000 cfu di *Pseudomonas aeruginosa* (ceppi PAO1 e RP73) su un punto specifico della superficie degli epitelii. Dopo 3 ore di incubazione, abbiamo messo a contatto gli epitelii con piastre agar per il trasferimento dei batteri. Per individuare molecole antimicrobiche, abbiamo analizzato i fluidi apicali di HBE attraverso la spettrometria di massa (MS).

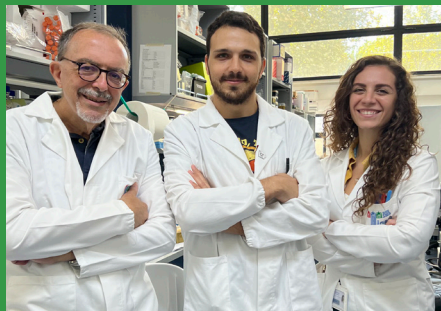
**Risultati preliminari**

In condizioni di controllo, i batteri formano colonie distribuite su tutta la superficie epiteliale. Invece, negli HBE trattati con IL-17/TNF- $\alpha$ , i batteri rimangono fermi nel sito in cui erano stati depositati. La MS del fluido apicale ha rivelato l'aumento di molte molecole di difesa e chemoattrattori per le cellule immunitarie (IL-19, CSF3, CXCL17, CCL20). Sorprendentemente, abbiamo anche trovato specifiche proteine di membrana tra cui ATP12A, SLC26A4, DUOX2, SLC5A1, ma non CFTR o ENaC. Mediante microscopia elettronica, abbiamo individuato delle vescicole extracellulari (EV) nel surnatante di HBE. Gli esperimenti di FACS hanno rivelato una maggiore abbondanza di EV dopo il trattamento con IL-17A/TNF- $\alpha$  e la presenza di CD63, CD9 e CD81.

**Conclusioni**

Pensiamo che le EV possano essere coinvolte nell'attività antimicrobica o nella comunicazione di stimoli alle cellule epiteliali e immunitarie. I nostri risultati rivelano un programma, indotto da IL-17/TNF- $\alpha$ , che potrebbe limitare la capacità dei batteri di attaccare e invadere le vie aeree.





**Michele Genovese<sup>1</sup>, Anna Borrelli<sup>1</sup>, Luis J.V. Galletta<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>2</sup>Department of Translational Medical Sciences (DISMET), University of Naples Federico II, Naples, Italy  
(GMSG#1/2024, new)

**Background  
and rationale**

*Loss-of-function of the CFTR chloride channel impairs mucociliary clearance (MCC), causing cystic fibrosis (CF) lung disease. Alternative targets, such as the calcium-activated TMEM16A chloride channel, are considered for the treatment of people carrying undruggable CFTR mutations. However, the best approach to target TMEM16A in CF, whether with potentiators or inhibitors, is a matter of debate. Another alternative target is the TRPV4 calcium channel. TRPV4 is a potential sensor of mechanical and chemical stimuli, involved in the response to pathogens and linked to CFTR activity.*

**Hypothesis  
and objectives**

*Our hypothesis is that TMEM16A and TRPV4 could be alternative therapeutic targets in CF. Our goal is to clarify their role in the airways to modulate them in the most appropriate way. For TMEM16A, we will use the CRISPR/Cas9 strategy to knockout the gene in airway epithelial cells and evaluate the consequences on MCC and airway surface properties. Regarding TRPV4, we will investigate the mechanisms linking this channel to CFTR and to calcium-activated dual oxidases that produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a bactericidal agent. These experiments may clarify the possible alterations occurring in CF, suggesting molecular targets to control infection and inflammation.*

**Essential  
methods**

*We will use differentiated human bronchial epithelia (HBE) in which TMEM16A and TRPV4 function will be altered with genetic and/or pharmacological approaches. We will then carry out a panel of experiments to evaluate intracellular calcium mobilization, airway surface liquid properties, mucin secretion, epithelial composition/morphology, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.*

**Preliminary  
results**

*TMEM16A-defective epithelia, generated by nucleofection of basal stem cells, showed a near total ablation of calcium-dependent chloride secretion without alteration of calcium signaling. Pharmacological activation of TRPV4 stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release. Bacterial supernatants elicited a significant calcium increase possibly through TRPV4.*

**Conclusions**

*Preliminary results show that we are able to ablate TMEM16A function in differentiated epithelia which will allow us to assess its physiological role. In addition to the CFTR function, TRPV4 also appears to regulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release. It will be important now to determine how pharmacological modulation of TMEM16A and TRPV4 leads to improvements in airway surface hydration and innate defense mechanisms of the airway epithelium.*

**Razionale  
dello studio**

La perdita di funzione del canale del cloruro CFTR compromette la clearance mucociliare (MCC), causando i problemi respiratori nella fibrosi cistica (FC). Per le persone con FC con mutazioni di CFTR non trattabili con farmaci, vengono considerati bersagli alternativi, in primis il canale del cloruro TMEM16A, il cui ruolo nella FC è però controverso. Il canale del calcio TRPV4 è un altro potenziale bersaglio alternativo, in quanto sensore di stimoli meccanici e chimici, coinvolto nella risposta ai patogeni e collegato all'attività di CFTR.

**Ipotesi  
e obiettivi**

La nostra ipotesi è che TMEM16A e TRPV4 siano bersagli terapeutici alternativi nella FC. Il nostro obiettivo è chiarire il loro ruolo nelle vie aeree, per modularli nel modo più appropriato. Per quanto riguarda TMEM16A, ne aboliremo la funzione e valuteremo le conseguenze su diverse funzioni dell'epitelio. Per TRPV4, valuteremo i meccanismi molecolari che collegano tale proteina alla funzione di CFTR e all'attività delle proteine DUOX che sono preposte alla produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che ha funzione battericida. I risultati potranno chiarire le possibili alterazioni che si verificano nella FC, suggerendo bersagli molecolari per controllare infezioni e infiammazione.

**Metodi**

Useremo epitelii bronchiali umani in cui avremo alterato la funzione di TMEM16A e TRPV4 con strategie genetiche o farmacologiche. Su tali epitelii condurremo una serie di esperimenti volti a misurare: mobilizzazione del calcio, proprietà chimico/fisiche della superficie epiteliale, rilascio di mucine, morfologia epiteliale e produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Risultati  
preliminari**

Gli epitelii privi di TMEM16A, generati mediante nucleofezione di cellule staminali basali, hanno mostrato una quasi totale assenza di secrezione di cloruro calcio-dipendente, senza però alterazione della mobilizzazione di calcio. La stimolazione farmacologica di TRPV4 ha indotto la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inoltre, il trattamento con surnatanti batterici ha causato l'aumento di calcio intracellulare, probabilmente via TRPV4.

**Conclusioni**

I risultati preliminari dimostrano che siamo in grado di abolire la funzione di TMEM16A in epitelii differenziati, permettendoci di valutare il ruolo di tale canale nell'epitelio. In aggiunta alla regolazione di CFTR, TRPV4 sembra anche regolare il rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. È importante ora chiarire in che modo la modulazione farmacologica di TMEM16A e TRPV4 possa migliorare la funzione di barriera antibatterica dell'epitelio.

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

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



Domenico Mattoscio (in the middle) with his collaborators

38

### Domenico Mattoscio

Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science, University G. D'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti, Italy

(FFC#11/2022, concluded; FFC#12/2024, new)

#### Background and rationale

Non-resolving pulmonary inflammation has a detrimental effect on the lives of people with cystic fibrosis (CF). Therefore, our understanding of the mechanisms underlying non-resolving inflammation in CF is still incomplete.

In addition to their hemostatic function, platelets (PLT) play a key role in inflammation and its resolution. Previous studies have shown that altered, hyperreactive PLT activities support lung inflammation while dampening beneficial pro-resolution mechanisms. Innovative strategies to limit PLT-based pathology may be useful to counter-regulate CF inflammation and lung injury.

#### Hypothesis and objectives

Therefore, the guiding hypothesis of the proposed research is that reduction of PLT-driven lung inflammation could be valuable in CF. In this project, we will determine how exposure of PLT to selected pro-resolving mediators (SPMs) exerts beneficial effects against CF lung inflammation.

#### Essential methods

PLT and leukocytes purified from the blood of CF volunteers were treated with resolvins and monitored for their ability to promote resolution of inflammation. Preclinical *in vivo* studies in mouse models of pulmonary CF infection were carried out to determine whether PLT modulation is effective in preclinical models of the disease.

#### Results

Among the SPMs, RvD3 and RvE1 have specific actions that selectively attenuate PLT activation in people with CF. Both RvD3 and RvE1 selectively reduced the release of thromboxane B2 (TxB2, a marker of PLT activation) by CF PLT. Proteomic analysis of purified human CF PLT revealed an enrichment of proteins involved in the regulation of the innate immune response. Consistent with this, RvD3 induced PLT to stimulate clearance of *P. aeruginosa* and enhanced bacterial uptake by CF neutrophils. *In vivo*, RvD3 reduced PLT activation during acute pneumonia in CF mice. RvD3 also attenuated bacterial load in a TxB2-dependent manner, reduced the production of immune-recruiting cytokines, and restored the altered balance between pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators. Depletion of PLTs *in vivo* reversed these effects, suggesting that PLTs are the key targets of the pro-resolving effects mediated by RvD3.

#### Conclusions

The results of our project define the potency and efficacy of resolvins as an antiplatelet strategy to reduce inflammation-based pathology in cystic fibrosis. These studies suggest the use of RvD3 as a putative candidate molecule to limit PLT activation and inflammation in CF.

#### Appendix (FFC#12/2024)

The central hypothesis of this research is that PLT dampen CDS actions to fuel CF inflammation. Targeting PLT-CDS crosstalk may be beneficial.

To this end, this study will address the following objectives: i) determine how PLT affect CDS; ii) evaluate the impact of PLT-CDS crosstalk on airway inflammation; iii) test strategies to promote CDS reactivation and resolution of inflammation.

#### Razionale dello studio

La mancata risoluzione dell'infiammazione polmonare ha effetti dannosi sulla vita delle persone con fibrosi cistica (FC). La nostra conoscenza dei meccanismi alla base dell'infiammazione nella FC è quindi ancora incompleta.

Oltre alla loro funzione emostatica, le piastrine (PLT) svolgono un ruolo chiave anche nell'infiammazione e nella sua risoluzione. Le PLT, disfunzionali e iper-attivate in FC, contribuiscono all'infiammazione polmonare e rallentano i meccanismi benefici della sua risoluzione.

#### Ipotesi e obiettivi

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

#### Metodi

PLT e leucociti purificati dal sangue di pazienti affetti da FC sono stati trattati con resolvine e monitorate per la loro capacità di favorire la risoluzione dell'infiammazione.

Inoltre, studi preclinici *in vivo* su modelli animali di infezione polmonare sono stati usati per determinare se la modulazione delle PLT sia efficace anche in modelli sperimentali della malattia.

## Risultati

Tra i diversi SPM, RvD3 e RvE1 riducono selettivamente il rilascio di trombossano B2 (TxB2, un marcatore di attivazione PLT) da parte di PLT FC. L'analisi proteomica di PLT purificate da persone con FC ha evidenziato un arricchimento di proteine coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria innata. Infatti, la RvD3 attiva le PLT nello stimolare l'eliminazione di *Pseudomonas aeruginosa* da parte dei neutrofilo FC attraverso una stimolazione dell'uptake batterico. *In vivo*, la RvD3 riduce l'attivazione delle PLT in modelli murini di FC con infezione polmonare da *P. aeruginosa*. Inoltre, la RvD3 diminuisce la carica batterica totale tramite riduzione del TxB2, spegne la produzione di chemochine e recupera il corretto bilanciamento tra livelli di mediatori lipidici pro-infiammatori e pro-risolutivi. Questi effetti vengono persi in seguito a deplezione piastrinica *in vivo*, indicando quindi come le piastrine siano il target dell'azione pro-risolutiva della RvD3.

## Conclusioni

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

## Appendice (FFC#12/2024)

L'ipotesi centrale della ricerca è che le PLT, iperattivate e disfunzionali in FC, possano spegnere le azioni protettive dei linfociti T CD8 e alimentare così l'infiammazione cronica in FC. Lo studio del crosstalk tra PLT-CD8 potrebbe quindi evidenziare nuovi bersagli farmacologici per ridurre il carico infiammatorio nelle vie aeree in FC.

I ricercatori si propongono quindi di: i) determinare come le PLT influenzano i CD8; ii) valutare l'impatto del crosstalk PLT-CD8 sull'infiammazione delle vie aeree; iii) testare strategie per promuovere la riattivazione dei CD8 e la risoluzione dell'infiammazione.

*Melanocortins to control  
cystic fibrosis airway  
inflammation*  
Melanocortine per  
controllare l'infiammazione  
nella fibrosi cistica



Mario Romano (on the right) and Roberto Plebani (on the left)

39

### Mario Romano

Department of Medical, Oral, and Biotechnology Science, University G. D'Annunzio Chieti-Pescara, Chieti, Italy

(FFC#15/2023, ongoing)

## Background and rationale

*Inflammation still represents a significant pathogenic element in people with cystic fibrosis (CF). Pro-resolution pharmacology seems to represent an effective innovative strategy to combat CF inflammation. Melanocortins are peptide hormones that activate specific receptors (MC1-5), suppressing the release of pro-inflammatory cytokines and promoting resolution of inflammation. Synthetic melanocortins with potent pro-resolution activity are being tested in clinical trial.*

## Hypothesis and objectives

*Based on our preliminary data, we hypothesize that melanocortins may be effective in controlling CF inflammation. The main objectives of this program are: i) to develop a preclinical model of human CF airways to verify the pro-resolution antimicrobial efficacy of synthetic melanocortins; ii) to integrate the multiple evidence provided by the chip to establish a new paradigm of pharmacological testing in CF.*

## Essential methods

*Pulmonary morphonuclear leukocytes (PMN) from people with CF were labeled with CellTracker Green and perfused into CF airway-on-a-chip modules, treated or not with BMS-47539, a selective MCR1 agonist. At the end of the perfusion, the following were assessed: PMN recruitment and activation status, mucus production, epithelial and endothelial monolayer integrity, cytokine and chemokine release, endothelial and epithelial transcriptome.*

## Preliminary results

*We have successfully developed the first fully CF airway-on-a-chip model, consisting of primary human CF bronchial epithelial cells and endothelial cells, isolated from lungs explanted from people with CF. Treatment of these chips with BMS-470539 (10  $\mu$ M) significantly reduced CF PMN recruitment and mucus production.*

## Conclusions

*The results obtained so far seem to confirm that melanocortins may have beneficial effects on the pulmonary inflammatory response, including mucus production. Ongoing evaluations of cytokine and chemokine release and of the transcriptomic profile of epithelium and endothelium will provide further elements to understand the efficacy and mechanisms of action of melanocortins in CF. Furthermore, studies in chips infected with bacteria, planned for the second year of this project, will be particularly relevant for the therapeutic development of these molecules in people with CF.*

## Razionale dello studio

Nonostante l'introduzione dei modulatori CFTR, l'infiammazione rappresenta ancora un elemento patogenetico significativo nelle persone con fibrosi cistica (FC). La modesta efficacia delle attuali terapie antinfiammatorie, richiede la messa a punto di strategie innovative per combattere l'infiammazione della FC, e a questo proposito sta emergendo la farmacologia pro-risoluzione. Le melanocortine sono ormoni peptidici che attivano recettori specifici (MC1-5), sopprimendo il rilascio di citochine proinfiammatorie e promuovendo la risoluzione dell'infiammazione. Melanocortine sintetiche con potente attività pro-risoluzione sono in fase di sperimentazione in studi clinici.



### Ipotesi e obiettivi

Ipotizziamo che la terapia a base di melanocortine possa offrire un approccio innovativo alla gestione dell'infiammazione della FC.

Gli obiettivi principali di questo programma sono: i) usare un dispositivo (chip) che riproduce la struttura delle vie aeree, come modello preclinico di FC per verificare l'efficacia antimicrobica pro-risoluzione di melanocortine sintetiche; ii) integrare le molteplici evidenze fornite dal chip per stabilire un nuovo paradigma di sperimentazione farmacologica nella FC.

### Metodi

Leucociti polimorfonucleati (PMN), isolati dal sangue periferico di persone con FC, sono stati marcati con Green CellTracker, trattati o meno con BMS-470539, agonista selettivo sintetico di MCR1, e quindi perfusi a 500  $\mu$ L/ora for 2 ore in moduli di *airway-on-a-chip* FC, trattati o meno con BMS-47539 dal versante epiteliale per simulare un trattamento locale o da quello endoteliale per mimare un trattamento sistemico. Al termine della perfusione sono stati valutati: reclutamento dei PMN e loro stato di attivazione, produzione di muco, integrità del monostrato epiteliale ed endoteliale, rilascio di citochine e chemochine, trascrittoma di endotelio ed epitelio.

### Risultati preliminari

Abbiamo messo a punto con successo il primo modello di *airway-on-a-chip* completamente FC costituito da cellule epiteliali bronchiali primarie umane FC, differenziate in epitelio pseudostratificato in interfaccia aria-liquido, e cellule endoteliali polmonari, isolate da polmoni espantati a persone con FC. Il trattamento di questi chip con BMS-470539 (10  $\mu$ M) ha significativamente ridotto il reclutamento di PMN isolati da pazienti con FC e la produzione di muco da parte delle cellule goblet, soprattutto dopo la somministrazione del composto sul versante epiteliale. Non abbiamo osservato particolari variazioni dello stato di attivazione dei PMN (espressione di CD63), né dell'integrità del monostrato epiteliale o endoteliale.

### Conclusioni

I risultati finora ottenuti sembrano confermare che le melanocortine possano avere effetti benefici su diverse componenti della risposta infiammatoria polmonare, inclusa la produzione di muco. Le valutazioni in corso del rilascio di citochine e chemochine e del profilo trascrittomico di epitelio ed endotelio forniranno ulteriori elementi per comprendere efficacia e meccanismi di azione delle melanocortine in ambito FC. Inoltre, gli studi in chip infettati con batteri, in programma per il secondo anno di questo progetto, saranno particolarmente rilevanti per lo sviluppo terapeutico di queste molecole in persone con FC.

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

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



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

40

**Gianmarco Conte<sup>1</sup>, Mirko Ronzio<sup>1</sup>, Diletta Dolfini<sup>1</sup>, Javier Cibella<sup>2</sup>, Eugenia Ricciardelli<sup>2</sup>, Simone Puccio<sup>2</sup>, Andrea Gramegna<sup>3</sup>, Daniela Guidone<sup>4</sup>, Helle K. Johansen<sup>5</sup>, Luis J.V. Galiotta<sup>4</sup>, Clelia Peano<sup>2</sup>, Moira Paroni<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Bioscience, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>Institute of genetics and Biomedical Research, National Research Council (IRGB-CNR), Milan, Italy - <sup>3</sup>Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>4</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy - <sup>5</sup>Department of Clinical Microbiology – Rigshospitalet of Denmark (FFC#14/2023, ongoing)

### Background and rationale

*The persistent activation of the mucosal immune system, due to the absence or reduced CFTR function together with recurrent bacterial infections, significantly contributes to the tissue damage and pulmonary failure in people with cystic fibrosis (CF). So far, current anti-inflammatory therapies fail to selectively target the activation of pathogenic immune system components.*

### Hypothesis and objectives

*Pseudomonas aeruginosa (Pa) persistence within dendritic cells (DCs) promotes a continuous release of very high amounts of polarizing proinflammatory cytokines, and directly triggers the skewing of pathogenic Th1/17 cells (pTh1/17) from conventional Th17 (cTh17) precursors. Consequently, an overly activation of pTh1/17 cells leads to a huge rise of IFN $\gamma$ /IL-17 co-secretion in CF lung, further contributing to chronic inflammation and lung injury. The yet unknown molecular mechanism by which Pa-infected DCs activate the pathogenic arms of the mucosal immune system is the main goal of this project.*

### Essential methods

*Based on the evidence that lung-infiltrating pTh1/17 cells, selectively enriched in Pa chronically infected CF lungs, exhibit a distinct transcriptomic profile compared to protective cTh17 and Th1 cells, we investigated whether Pa-infected DCs induce specific gene upregulation in cTh17 cells during their transdifferentiation into pTh1/17 cells. Next, we set the conditions to modulate selected immunological targets in cTh17 cells and to validate their role in promoting tissue damage in an in vitro air-liquid interface co-culture model. Finally, through a dual-RNAseq approach on peripheral and lung-infiltrating Pa-infected DCs we will identify altered host and bacterial genes/pathways as potential new targets to prevent pTh1/17 cell generation upstream.*

<b>Preliminary results</b>	<i>Our results indicate that while Pa may acquire the ability to persist within DCs during adaptation to the CF lungs, promoting the chronic release of polarizing proinflammatory cytokines, non-adapted clinical variants trigger the generation of pTh1/17 cells from protective cTh17 precursors even at the early stage of the disease. Of note, we observed a selective expression of key specific receptors/transcription factors in IFN<math>\gamma</math>/IL-17 co-producing Pa-activated Th17 cells, indicating that Pa drives the upregulation of specific genes during the skewing of protective cTh17 into pTh1/17 cells. Finally, we set the conditions in the in vitro air-liquid interface 3D co-culture model, where activated pTh1/17 cells directly promoted epithelial cell damage in contrast to autologous cTh17 cells, to validate the identified immunological targets.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>By deciphering the interplay between Pa-infected DCs and pulmonary activated pTh1/17 cells at the transcriptomic level, we will identify novel targets for next-generation immunotherapies for overall inflammation in CF. Identification of new immune checkpoints and druggable targets will pave the way for novel and efficient pharmaceutical strategies to prevent CF inflammation, increasing both life quality and expectancy.</i>
<b>Razionale dello studio</b>	La persistente attivazione del sistema immunitario mucosale, a causa dell'assenza o ridotta funzionalità del canale CFTR insieme alle infezioni batteriche ricorrenti, contribuisce direttamente al danno tissutale e all'insufficienza polmonare nelle persone con fibrosi cistica (FC). A oggi, le attuali terapie antinfiammatorie non riescono a sopprimere selettivamente l'attivazione delle componenti patogeniche del sistema immunitario mucosale.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	La persistenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) all'interno delle cellule dendritiche (DC) promuove un rilascio continuo di elevate quantità di citochine polarizzanti pro-infiammatorie e innesca direttamente la differenziazione di cellule Th1/17 patogeniche (pTh1/17) dalle cellule convenzionali Th17 (cTh17). Di conseguenza, l'eccessiva attivazione delle pTh1/17 porta a un notevole aumento della co-secrezione di IFN $\gamma$ /IL-17 nei polmoni delle persone con FC, contribuendo ulteriormente all'infiammazione cronica e al danno polmonare. Il meccanismo molecolare attraverso il quale le DC infettate da Pa attivano le pTh1/17 a livello mucosale è ancora sconosciuto ed è l'obiettivo principale di questo progetto.
<b>Metodi</b>	Sulla base dell'osservazione che le pTh1/17 polmonari, selettivamente arricchite nelle persone con FC con infezioni croniche da Pa, mostrano un profilo trascrittomico distinto rispetto alle cellule cTh17 e Th1 protettive, abbiamo indagato se le DC infettate da Pa inducessero l'upregolazione di geni specifici nelle cellule cTh17 durante la loro transdifferenziazione in cellule pTh1/17. Successivamente, abbiamo stabilito le condizioni per modulare <i>in vitro</i> i bersagli immunologici selezionati nelle cellule cTh17 e validare il loro ruolo nel promuovere il danno tissutale in un modello di co-cultura <i>in vitro</i> di cellule epiteliali primarie in interfaccia aria-liquido. Infine, attraverso un approccio di dual-RNAseq su DC periferiche e infiltranti il polmone infettate da Pa, identificheremo geni e vie alterate dell'ospite e del batterio come nuovi bersagli per prevenire a monte la generazione delle cellule pTh1/17.
<b>Risultati preliminari</b>	I nostri risultati mostrano che, mentre Pa acquisisce la capacità di persistere all'interno delle DC durante l'adattamento all'ambiente polmonare FC, promuovendo nel tempo un rilascio cronico di citochine polarizzanti pro-infiammatorie, anche le varianti cliniche non adattate promuovono la generazione di cellule pTh1/17 da precursori cTh17 protettivi già nelle fasi iniziali della malattia. Inoltre, abbiamo osservato un'espressione selettiva di specifici recettori e fattori di trascrizione nelle cellule cTh17 che co-producono IFN- $\gamma$ /IL-17 in seguito ad attivazione con Pa, indicando quindi che Pa induce l'upregolazione selettiva di specifici geni nelle cTh17 protettive durante il loro trans-differenziamento in pTh1/17. Infine, abbiamo settato le condizioni nel modello di co-cultura epiteliale 3D, in cui le cellule pTh1/17 attivate promuovono direttamente il danno alle cellule epiteliali al contrario delle loro omologhe cTh17 protettive, per validare i bersagli immunologici identificati.
<b>Conclusioni</b>	Grazie alla caratterizzazione funzionale e molecolare dell'interazione tra le DC infettate da Pa e le cellule pTh1/17 polmonari attivate, identificheremo nuovi bersagli che potranno essere usati per lo sviluppo di nuove immunoterapie. L'individuazione di nuovi checkpoint immunitari e bersagli farmacologicamente attaccabili aprirà la strada a strategie farmacologiche innovative ed efficienti per prevenire l'infiammazione nella FC, migliorando sia la qualità che l'aspettativa di vita dei pazienti.

Towards the development of GY971a as anti-inflammatory drug in cystic fibrosis

Verso lo sviluppo di GY971a come farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica



Ilaria Lampronti (2<sup>nd</sup> from the left) with her collaborators

41

### Ilaria Lampronti

Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Italy

(FFC#10/2022, concluded; FFC#11/2024, new)

#### Background and rationale

Starting from different new TMA (4,6, 4'-Trimethylangelicin) synthetic derivatives, we were able to identify GY971a, a molecule with interesting biological activity that was the object of the investigation, to develop it as a possible anti-inflammatory drug for cystic fibrosis (CF).

#### Hypothesis and objectives

We aimed to validate GY971a as an anti-inflammatory agent by assessing its efficacy in CF bronchial cell lines, in human differentiated bronchial epithelia (HBE) obtained through teamwork with the FFC Ricerca Primary Culture Service, and in animal models of pulmonary inflammation, in collaboration with the FFC Ricerca CFaCore.

#### Essential methods

The studies of GY971a were conducted *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. Innovative synthetic strategies were utilized to obtain a large amount of GY971a (GY971 mesylate salt). Primary HBE cells were first employed to set up the method, testing different approaches and inflammatory stimuli such as *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1), its secretoma, TNF- $\alpha$  and IL-17. Subsequently, broncho-epithelial cells derived from nine people with CF (pwCF) were used to investigate the anti-inflammatory properties of GY971a, to compare its activity with Ibuprofen, exploring co-treatments with antibiotics, and Kaftrio and assessing potential cytotoxic effects. *In vivo* experiments were conducted to exclude hepatotoxicity before advancing research on animal models of chronic inflammation.

#### Results

Bronchial epithelia, derived from F508del/F508del pwCF, were differentiated and analyzed by applying various treatments to gather sufficient data and ensure the efficacy of GY971a. The selected stimuli were *P. aeruginosa* (PAO-1) and TNF- $\alpha$ , which produced more consistent data. Therefore, the obtained data confirms the anti-inflammatory effect of GY971a, which was assayed in epithelia derived from nine patients, although its efficacy was variable among the primary cultures obtained from different pwCF. Any antiproliferative activity or pro-apoptotic effect was found after treatment with varying concentrations of GY971a. Moreover, preliminary studies were conducted to compare GY971 and Ibuprofen, demonstrating that Ibuprofen does not significantly reduce gene expression of cytokines involved in CF inflammation. We finally verified that our derivative does not influence the Trikafta activity in co-treatment experiments. The results are encouraging: GY971a decreased the expression of IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  also in *ex vivo* experiments.

#### Conclusions

The results confirm that GY971a exhibits anti-inflammatory activity also in HBE primary cells derived from different pwCF, without interfering with the action of the new modulatory drugs (Trikafta), and without cytotoxic or hepatotoxic effects.

#### Appendix (FFC#11/2024)

In the new project, we will further investigate the impact of GY971 on inflammation using experimental models that have been preliminarily tested. The potential off-target effects will be assessed using *in silico* analysis, *in vitro* studies, *ex vivo* experiments with bronchial and nasal cells, and *in vivo* testing in mouse models and Zebrafish. Different formulations of nanoparticles and/or macrocyclic oligosaccharides will be developed for pulmonary delivery.

#### Razionale dello studio

Partendo dalla progettazione di nuovi analoghi sintetici della TMA (4,6,4'-Trimetilangelicina), siamo riusciti a identificare GY971a, molecola con interessante attività biologica che è stata oggetto di ricerca per arrivare allo sviluppo di un nuovo potenziale farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica (FC).

#### Ipotesi e obiettivi

Il nostro obiettivo era validare il nuovo derivato GY971a come agente antinfiammatorio, studiando la sua attività in linee cellulari fibrocistiche, in colture primarie di cellule bronco-epiteliali umane (HBE) ottenute grazie alla collaborazione con il Servizio Colture Primarie di FFC Ricerca, e in modelli animali FC e di infiammazione polmonare grazie alla collaborazione con il CFaCore di FFC Ricerca.

#### Metodi

Gli studi su GY971a sono stati condotti *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Per ottenere grandi quantità di GY971a, che è il sale mesilato di GY97, sono state usate strategie innovative di sintesi. Colture primarie di epitelii bronchiali sono state usate prima per settare il metodo, testando diversi approcci e stimoli infiammatori, come per esempio *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1), il suo secretoma, TNF- $\alpha$  e IL-17. Successivamente, le cellule bronco-epiteliali derivate da nove persone con FC sono state sfruttate per studiare le proprietà antinfiammatorie di GY971a, per comparare la sua attività con quella di Ibuprofene, per esplorare co-trattamenti con antibiotici e Kaftrio e per valutare eventuali effetti citotossici. Sono stati condotti anche esperimenti *in vivo* per escludere epatotossicità prima di procedere con la ricerca su modelli animali di infiammazione polmonare cronica.



## Risultati

Epiteli bronchiali, derivati da persone con FC F508del/F508del, sono stati differenziati e analizzati applicando vari trattamenti per raccogliere dati sufficienti e garantire l'efficacia di GY971a. Sono stati usati gli stimoli infiammatori *P. aeruginosa* (PAO-1) e TNF- $\alpha$  che hanno prodotto dati più riproducibili. Quindi, i dati ottenuti hanno confermato l'evidente effetto antinfiammatorio di GY971a, che è stato saggiato su cellule bronchiali provenienti da nove persone con FC, nonostante sia stata osservata una variabilità tra le colture primarie ottenute da pazienti diversi. Non sono stati osservati né effetti anti-proliferativi né pro-apoptotici, dopo trattamento con diverse concentrazioni di GY971a. Inoltre, sono stati condotti studi preliminari per comparare GY971 e ibuprofene, dimostrando che l'ibuprofene non sembra ridurre significativamente l'espressione genica di citochine/chemochine coinvolte nell'infiammazione in FC. Infine, abbiamo verificato che il nostro derivato non influenza l'attività di Kaftrio in esperimenti di terapia combinata. I risultati sono incoraggianti: GY971a diminuisce l'espressione di IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  anche in esperimenti *ex vivo*.

## Conclusioni

I risultati confermano che GY971a mostra attività antinfiammatoria anche in colture bronchiali primarie derivate da diverse persone con FC, senza interferire con l'azione dei nuovi farmaci modulatori di CFTR (Kaftrio) e senza effetti citotossici o epatotossici.

## Appendice (FFC#11/2024)

Nel nuovo progetto, studieremo ulteriormente l'impatto di GY971 sull'infiammazione usando modelli sperimentali che sono già stati testati in via preliminare. Verranno valutati possibili effetti *off-target*, usando analisi *in silico*, studi *in vitro*, esperimenti *ex vivo* con cellule sia bronchiali che nasali, e test *in vivo* con modelli di topo e di zebrafish. Verranno studiate e sviluppate diverse formulazioni farmaceutiche di nanoparticelle e/o oligosaccaridi macrociclici per somministrare la molecola via aerosol.

## SESSION 9

# New strategies against *Pseudomonas* and *Aspergillus*

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

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



Barbara Citterio (top left picture, 2<sup>nd</sup> from the left) and her collaborators

42

**Gianmarco Mangiaterra<sup>1</sup>, Giorgia Piccioni<sup>1</sup>, Massimiliano Lucidi<sup>2</sup>, Giulia Capecechi<sup>2</sup>, Carla Vignaroli<sup>3</sup>, Natalia Cirilli<sup>4</sup>, Alessandra Bragonzi<sup>5</sup>, Barbara Citterio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, Urbino, Italy - <sup>2</sup>Department of Science, Microbiology Unit, University of RomaTre, Rome, Italy - <sup>3</sup>Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy - <sup>4</sup>University Hospital of Marche, Cystic Fibrosis Centre, Ancona, Italy - <sup>5</sup>Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy (FFC#7/2023, ongoing)

## Background and rationale

*Biofilm formation and the development of bacterial persisters, even the viable but non-culturable (VBNC) cells, hamper the eradication of the cystic fibrosis (CF) lung infections caused by Pseudomonas aeruginosa. The novel antibiotic cefiderocol (CFD), exploiting the bacterial iron uptake systems to enter the cell and achieve a high bactericidal effect, is currently considered as a therapeutic option even for CF pulmonary exacerbations. However, its activity on P. aeruginosa persistent and VBNC cells is still unknown.*

## Hypothesis and objectives

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

## Essential methods

*P. aeruginosa resistance and persistence to CFD were tested against planktonic and sessile cultures of both reference and clinical strains. In vitro biofilms of P. aeruginosa PAO-1 have been challenged with bactericidal CFD concentrations and the amounts of culturable persistent and VBNC cells, detected by qPCR, have been determined. The results have been confirmed by confocal microscopy performed on flow-cell biofilms. The evaluation of the CFD treatment of an animal model of P. aeruginosa lung infection is currently ongoing.*

## Preliminary results

*CFD-exposed P. aeruginosa cultures and biofilms carried a high number ( $\geq 10^5$  CFU/ml) of tolerant cells, although the percentage of VBNC cells was lower compared to that induced by tobramycin (86% vs 99.80% of total viable cells, respectively). Confocal microscopy confirmed these data by evidencing the development of filamentous forms in CFD-treated persistent biofilms. Among 100 P. aeruginosa clinical isolates, only two strains (from non-CF people) were CFD-resistant.*

**Conclusions** *A high tolerance to CFD was observed in P. aeruginosa in vitro biofilms, although CFD induced a smaller VBNC subpopulation when compared to other drugs. In next experiments the bacterial response to subinhibitory concentrations of CFD will be evaluated, simulating the conditions occurring in people with CF in between therapeutic cycles. The animal model of infection will be used to validate the CFD suitability for the clinical treatment of lung infections, possibly even in combination with other antibiotics.*

**Razionale dello studio** Lo sviluppo di biofilm e di forme batteriche persistenti, comprese le cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) complicano l'eradicazione dell'infezione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica (FC). Il nuovo farmaco cefiderocol (CFD), dotato di azione battericida grazie alla sua capacità di penetrare nella cellula batterica sfruttando i sistemi di acquisizione del ferro, è in fase di valutazione come opzione terapeutica in FC. Tuttavia, la sua efficacia contro le cellule persistenti non è stata testata.

**Ipotesi e obiettivi** Per caratterizzare l'azione anti-persisters del CFD, il presente progetto mira a: i) valutare la resistenza di colture e biofilm di *P. aeruginosa* al CFD; ii) verificare l'induzione di cellule persistenti e VBNC in biofilm di *P. aeruginosa* esposti al CFD; iii) validare i risultati ottenuti *in vitro* in un modello preclinico di infezione cronica.

**Metodi** La resistenza e la persistenza di *P. aeruginosa* al CFD sono state testate in colture planctoniche e biofilm di varianti di laboratorio e isolati clinici. La presenza di persisters e di cellule VBNC è stata valutata in biofilm *in vitro* di *P. aeruginosa* PAO-1, esposti a concentrazioni battericide di CFD tramite conte colturali e in qPCR e confermata tramite saggi di microscopia confocale. La valutazione dell'efficacia del trattamento con CFD nel modello di infezione murina è in fase di sviluppo.

**Risultati preliminari** Colture e biofilm di *P. aeruginosa* hanno mostrato minor resistenza al CFD ma un gran numero ( $\geq 10^5$  CFU/ml) di cellule tolleranti, rispetto ad altri antibiotici; al contrario, la percentuale di cellule VBNC era minore rispetto a quella osservata con tobramicina (86% vs 99,80% delle cellule vitali totali, rispettivamente). Tali dati sono stati confermati da saggi di microscopia confocale, che hanno evidenziato lo sviluppo di forme filamentose nei biofilm persistenti al CFD. Tra 100 ceppi clinici testati, solo 2 isolati da persone non-FC sono risultati CFD-resistenti.

**Conclusioni** Il trattamento con CFD ha indotto tolleranza in *P. aeruginosa*, ma una ridotta quota di cellule VBNC. Lo sviluppo del progetto prevede lo studio della risposta batterica a concentrazioni sub-inibenti del farmaco, mimando le condizioni dell'ambiente polmonare tra i vari cicli terapeutici. Il modello di infezione animale permetterà di validare l'uso del CFD per il trattamento clinico delle infezioni in FC, possibilmente in combinazione con altri antibiotici.

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

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



Left to right: Marta Mellini, Livia Leoni, Giordano Rampioni, Francesco Imperi, Claudia Ridolfi

43

**Giordano Rampioni**

Department of Science, University RomaTre, Rome, Italy

(FFC#10/2023, concluded)

**Background and rationale**

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

**Hypothesis and objectives**

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

**Essential methods**

*An engineered P. aeruginosa-based biosensor strain has been constructed allowing the identification of drugs specifically inhibiting growth or signaling systems controlling biofilm formation (c-di-GMP) and/or virulence (quorum sensing) in SCFM. This biosensor strain has been used to screen a library of > 3,000 FDA-approved and pharmacopeial drugs. Screening has been performed in parallel in SCFM and in a standard growth medium (Cation-adjusted Mueller Hinton Broth, MBH-II). Based on their activity in the primary and secondary screenings, the activity of selected hits has been preliminarily characterized in the reference strain PAO-1 and in a small panel of P. aeruginosa CF isolates.*

<b>Results</b>	<i>Promising drugs have been identified that specifically affect <i>P. aeruginosa</i> growth in SCFM but not in MHB-II, as well as potential quorum sensing or c-di-GMP inhibitors with high activity in SCFM. Some of these drugs are active against both laboratory-adapted <i>P. aeruginosa</i> strains and CF isolates.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>This pilot project allowed identifying drugs with favorable pharmacological properties endowed with antimicrobial or antivirulence activity in SCFM. Hence, the results of this project lay the foundation for the development of new therapeutic treatments beneficial for people with CF with <i>P. aeruginosa</i> lung infection.</i>

**Razionale dello studio**

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

**Ipotesi e obiettivi**

Molecole in grado di inibire le *pathway* molecolari necessari per la crescita, la formazione di biofilm e/o l'espressione di fattori di virulenza in un mezzo di crescita che mima l'espettorato FC, come il terreno SCFM, hanno il potenziale di ridurre la patogenicità di *P. aeruginosa* nel polmone FC. L'obiettivo di questo progetto è stato quello di identificare tali inibitori attraverso lo screening nel terreno SCFM di una libreria di farmaci già approvati per l'uso nell'essere umano.

**Metodi**

È stato costruito e validato un ceppo biosensore in grado di identificare molecole capaci di inibire la crescita o i sistemi di segnalazione che in *P. aeruginosa* regolano la formazione di biofilm (c-di-GMP) e l'espressione di fattori di virulenza (*quorum sensing*). Questo biosensore è stato usato per *screenare* una libreria di oltre 3000 farmaci. Lo *screening* è stato condotto in parallelo in SCFM e in un terreno di crescita standard (Cation-adjusted Mueller Hinton Broth). In base alla loro attività negli *screening* primario e secondario, molecole selezionate sono state caratterizzate in via preliminare nel ceppo di laboratorio PAO-1 e in alcuni isolati FC di *P. aeruginosa*.

**Risultati**

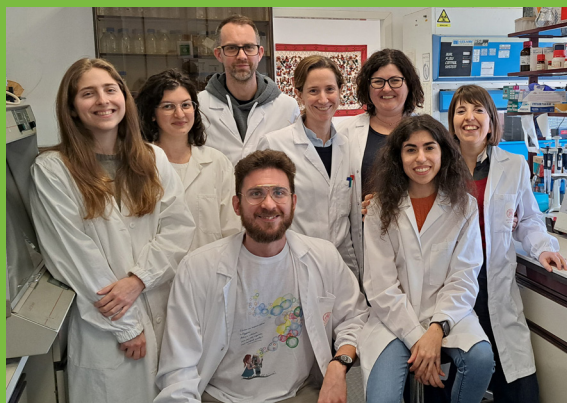
Sono stati identificati farmaci promettenti che inibiscono in modo specifico la crescita o i sistemi di segnalazione del c-di-GMP o del quorum sensing di *P. aeruginosa* in SCFM. Alcuni di questi farmaci sono attivi sia contro ceppi di *P. aeruginosa* di laboratorio sia contro isolati FC.

**Conclusioni**

Questo progetto pilota ha permesso di identificare molecole con proprietà farmacologiche favorevoli che mostrano attività antimicrobica o anti-virulenza in SCFM. I risultati di questo progetto pongono le basi per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici utili per le persone con FC con infezione polmonare da *P. aeruginosa*.

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

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



Silvia Buroni (standing, 2<sup>nd</sup> from right) and her research group

44

**Silvia Buroni<sup>1</sup>, Antonio Coluccia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology and Biotechnology Lazzaro Spallanzani, University of Pavia, Italy -

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Technology of Drug, University La Sapienza, Rome, Italy

**(FFC#6/2023, ongoing)**

**Background and rationale**

*New drugs are needed to treat the two most prevalent multidrug resistant (MDR) pathogens in people with cystic fibrosis (pwCF): *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. This is particularly important since these bacteria are able to cause chronic infections in adults and children despite the development of implemented strategies to prevent their acquisition and of early eradication therapies, thus impairing the life quality of pwCF.*

**Hypothesis and objectives**

*We propose to apply the Virtual Screening (VS) approach to identify bactericidal molecules with a mechanism of action different from the one of antibiotics in clinical use in order to avoid resistance. We will focus our attention on proteins involved in cell division which are essential for bacterial survival.*

**Essential methods**

*During the VS, millions of compounds are automatically evaluated by filter rules. After selecting a small number of molecules, a biological evaluation is performed, saving time and costs to research. In particular, we evaluate the activity of the identified compounds on the target proteins, their efficacy in inhibiting bacterial growth, and the toxicity on human cells. After obtaining these data, the compounds could be optimized to improve their activity and/or their safety profile. The compound showing the best properties are tested in vivo, first in the wax moth *Galleria mellonella*, and finally in a mouse model of infection.*



<b>Preliminary results</b>	<i>The VS on the cell division protein FtsZ led to the identification of a compound with antimicrobial activity against S. aureus, CF clinical isolates, and MRSA. The molecule has a very low toxicity. The combination with other antibiotics has a synergistic effect. Its efficacy was studied in G. mellonella, confirming that it can increase the survival of larvae infected with S. aureus.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>The reported results indicate that our compound is a promising drug candidate with a great potential to be further structurally optimized trying to improve its efficacy and to broaden the spectrum of action. This will allow pwCF to improve their lifetime and the quality of life. In the future the same approach could be applied to other proteins and bacteria to find new therapeutic solutions for airway pathogens, thus promoting the introduction of innovative treatments for pwCF.</i>

<b>Razionale dello studio</b>	Sono necessari nuovi farmaci per trattare i due patogeni resistenti più diffusi nelle persone con fibrosi cistica (FC): <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> . Ciò è particolarmente importante poiché questi batteri sono in grado di causare infezioni croniche negli adulti e nei bambini nonostante lo sviluppo di strategie implementate per prevenirne l'acquisizione e di terapie di eradicazione precoce, compromettendo così la qualità della vita delle persone con FC.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	L'obiettivo è applicare l'approccio di <i>Virtual Screening</i> (VS) per identificare molecole battericide con un meccanismo d'azione diverso da quello degli antibiotici in uso clinico al fine di evitare la resistenza. Focalizzeremo la nostra attenzione sulle proteine coinvolte nella divisione cellulare, essenziali per la sopravvivenza batterica.
<b>Metodi</b>	Con il VS milioni di composti vengono valutati tramite filtri. Dopo aver selezionato un piccolo numero di molecole, è eseguita una valutazione biologica, risparmiando tempo e costi di ricerca. In particolare, l'attività dei composti identificati è testata sulle proteine target, la loro efficacia sull'inibizione della crescita batterica e la tossicità sulle cellule umane. Dopo aver ottenuto questi dati, i composti possono essere ottimizzati per migliorare la loro attività e/o il loro profilo di sicurezza. Il composto che mostra le migliori proprietà viene testato <i>in vivo</i> , prima nelle larve di <i>Galleria mellonella</i> e infine in un modello di topo di infezione.
<b>Risultati preliminari</b>	Il VS sulla proteina di divisione cellulare FtsZ ha portato all'identificazione di un composto con attività antimicrobica contro <i>S. aureus</i> , isolati clinici FC e MRSA. La molecola ha una tossicità molto bassa. La combinazione con altri antibiotici ha un effetto sinergico. La sua efficacia è stata studiata in <i>G. mellonella</i> , confermando che può aumentare la sopravvivenza delle larve infette da <i>S. aureus</i> .
<b>Conclusioni</b>	I risultati riportati indicano che il nostro composto è un promettente candidato con un grande potenziale per essere ulteriormente ottimizzato, migliorandone l'efficacia e ampliandone lo spettro d'azione. Ciò consentirà alle persone con FC di migliorare la durata e la qualità della vita. In futuro, lo stesso approccio potrebbe essere applicato ad altre proteine e batteri per trovare nuove soluzioni terapeutiche per i patogeni delle vie aeree, promuovendo così l'introduzione di trattamenti innovativi per la FC.

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

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



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

45

**Marco Sette<sup>1</sup>, Mattia Falconi<sup>2</sup>, Marco Rinaldo Oggioni<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemical Sciences and Technology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy - <sup>2</sup>Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy - <sup>3</sup>Department of Pharmacy and Biotechnologies, University of Bologna, Italy (**FFC#13/2023, ongoing**)

<b>Background and rationale</b>	<i>People with cystic fibrosis (CF) are prone to bacterial infections, especially by Pseudomonas aeruginosa, a bacterium resistant to many antibiotic therapies. New care tools are therefore needed in these cases.</i>
<b>Hypothesis and objectives</b>	<i>The project aims to build peptides that stimulate the immune system against P. aeruginosa infections. We use an immunogenic region of the pilA protein of type IV pilus bound to a peptide scaffold. This region, the disulfide loop, is structured in a loop, and the scaffold is a peptide called TrpZip2, which forms a very stable hairpin. Molecular dynamics (MD) studies have shown that either by inserting the disulfide loop of the PAK strain in place of the TrpZip2 loop (molecule APT2) or by inserting it in the C-terminal position (molecule APT3), stable structures are obtained.</i>
<b>Essential methods</b>	<i>The molecules are modelled using AlphaFold, and MD studies the stability of the folding. The experimental verification of the tertiary structure is studied with Circular Dichroism and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The final molecules will be tested on mice.</i>

### Preliminary results

In the first year, we experimentally tested the structure of APT2 and APT3 molecules using NMR. The results show that: i) APT3 folds perfectly, with all the expected features and is stable for weeks; ii) APT2 assumes a partial folding where the hairpin area is only distally from the loop. To solve the problem, a new molecule containing the same scaffold was tested with an additional threonine on each strand. Threonines are strand stabilisers. This molecule is less folded than APT2 and has not been studied further. Other molecules are being studied: i) APT2KKK, with three lysines at the C-terminal to change the isoelectric point relative to APT2 and vary the pH; ii) APT4 was obtained using TrpZip4, a scaffold with the properties of TrpZip2 but with a different composition, and the disulfide loop was bound as in APT2. In both cases, MD calculations indicate that the molecules are stable. NMR will be used to check their folding.

### Conclusions

The correct folding of APT3 allows us to continue the project using the same scheme for the disulfide loops of PA14, PAO-1 and KB7 strains. We will also try to understand the problems related to folding APT2 to solve them and have an additional tool.

### Razionale dello studio

Le persone con fibrosi cistica (FC) sono soggette a infezioni batteriche, in particolar modo da *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio resistente a molte terapie antibiotiche. Nuovi strumenti di cura sono quindi necessari in questi casi.

### Ipotesi e obiettivi

Il progetto mira a costruire peptidi in grado di stimolare il sistema immunitario contro le infezioni da *P. aeruginosa*. usiamo una regione immunogenica della proteina pilA del pilus di tipo IV che viene legata su uno scaffold peptidico. La regione, chiamata *disulfide loop*, è strutturata ad ansa, e lo scaffold è un peptide chiamato TrpZip2, che forma *hairpin* molto stabili. Studi di dinamica molecolare (MD) hanno indicato che sia inserendo il disulfide loop del ceppo PAK al posto del loop del TrpZip2 (molecola APT2) o inserendolo in posizione C-terminale (molecola APT3) si ottengono strutture stabili.

### Metodi

Le molecole vengono modellate usando AlphaFold e la stabilità del ripiegamento viene studiata tramite MD. La verifica sperimentale della struttura terziaria viene studiata con Dicroismo Circolare e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Le molecole finali verranno testate su topi.

### Risultati preliminari

Nel primo anno abbiamo verificato sperimentalmente la struttura delle molecole APT2 e APT3 usando NMR. I risultati mostrano che: i) APT3 si forma perfettamente, con tutte le caratteristiche attese ed è stabile per settimane; ii) APT2 assume un ripiegamento parziale in cui la zona dell'*hairpin* si forma soltanto distalmente dal loop. Per risolvere il problema è stata testata una nuova molecola contenente lo stesso scaffold con in aggiunta una treonina su ogni strand. Le treonine sono infatti stabilizzatori di strand. Questa molecola risulta meno ripiegata di APT2 e non è stata studiata ulteriormente. Sono allo studio altre molecole: i) APT2KKK con 3 lisine al C-terminale per modificare il punto isoelettrico rispetto ad APT2 e variare il pH; ii) APT4 ottenuta usando TrpZip4, uno scaffold con le proprietà di TrpZip2 ma composizione diversa, e il disulfide loop legato come in APT2. In entrambi i casi calcoli MD indicano che le molecole sono stabili. Verrà usato NMR per verificarne il folding.

### Conclusioni

La corretta formazione di APT3 ci permette di proseguire il progetto usando lo stesso schema per i disulfide loop dei ceppi PA14, PAO-1 e KB7. Si cercherà inoltre di capire le problematiche relative al folding di APT2 in modo da risolverle e avere uno strumento aggiuntivo.

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

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



Picture on the left: Andrea Bosso, Ilaria Di Nardo, Elio Pizzo, Eugenio Notomista, Valeria Cafaro, Ida Palumbo, Francesca Tortora, Maria Cristiano. Picture on the right: Ivana d'Angelo, Pouria Savadi, Andrea Casale, Vincenzo Vendemia.

46

### Eugenio Notomista<sup>1</sup>, Ivana d'Angelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Naples Federico II, Italy - <sup>2</sup>Department of Environmental, Biological and Pharmaceutical Sciences and Technologies, Di.S.T.A.Bi.F., University of Campania Luigi Vanvitelli, Caserta, Italy (FFC#8/2023, ongoing)

### Background and rationale

P13#1 is an antimicrobial peptoid mimicking cationic antimicrobial peptides with antibacterial, antibiofilm and anti-inflammatory activities but high resistance to proteases. Moreover, it shows synergic activity with colistin (Col) and tobramycin (Tb), two antibiotics widely used in cystic fibrosis lung infection. Unfortunately, its polymeric nature hampers direct delivery to the lung where poor biodistribution and slow diffusion reduce efficacy and exacerbate its toxicity.

### Hypothesis and objectives

The main aim of the project is to develop inhalable polymeric nanoparticles (NPs) for lung delivery of P13#1, Col and Tb, alone and in combination.

### Essential methods

PLGA/Poloxamer (P407 or P188) NPs loaded with 2% drugs were prepared using the solvent emulsion/diffusion technique at different PLGA:Poloxamer ratios. Size, polydispersity index (PDI),  $\zeta$ -potential, drug encapsulation efficiency (EE), mucus interactions and drug release kinetics were determined. Antimicrobial and antibiofilm activity were determined for Col and Tb-loaded PLGA/P407 (2:1) NPs.

### Preliminary results

All the formulations exhibited a size of ~200 nm, low PDI (0.01 to 0.2) and negative  $\zeta$ -potential. These properties are suitable for pulmonary drug delivery and can promote NP diffusion across the infected lung barriers. EE was close to 60% for Col and higher than 90% for P13#1, whereas Tb EE was strongly affected (80-35%) by PLGA:Poloxamer ratio. Tested NPs exhibited low interaction with mucin suggesting that NPs can easily diffuse through the mucus layer, enhancing their ability to reach the therapeutic target. The release of Tb and P13#1 was prolonged and sustained for over 20 days. Increasing the percentage of Poloxamer in the matrix resulted in a faster release rate, likely due to the enhanced hydrophilicity and porosity that it introduces into the PLGA matrix. Tb-loaded NPs showed biological activities slightly lower than those of free Tb, likely due to a relatively slow release. Unexpectedly, Col-loaded NPs showed antimicrobial and antibiofilm activity slightly higher than those of free Col. Very intriguingly we demonstrated that the "excess" activity is due to the fact that poloxamers enhance Col efficacy.

### Conclusions

PLGA/P407 NPs proved to be very well suited to deliver Col and Tb in an active form. During the second year the analysis will be extended to P13#1-loaded NPs, hence the efficacy of the NPs, alone and in combination, will be tested in the CFaCore mouse model of lung infection.

### Razionale dello studio

P13#1 è un peptide antimicrobico ispirato ai peptidi antimicrobici cationici con attività antibatterica, antibiofilm e antinfiammatoria ma resistente alle proteasi. Inoltre, mostra attività sinergica con colistina (Col) e tobramicina (Tb), antibiotici ampiamente usati nelle infezioni polmonari in fibrosi cistica. Purtroppo, la sua natura polimerica rende complessa la somministrazione diretta ai polmoni dove la scarsa biodistribuzione ne riduce l'efficacia e ne esacerba la tossicità.

### Ipotesi e obiettivi

Obiettivo principale del progetto è sviluppare nanoparticelle polimeriche inalabili (NP) per la somministrazione polmonare di P13#1, Col e Tb, da soli e in combinazione.

### Metodi

Sono state preparate NP con diversi rapporti PLGA:Polossamero (P407 o P188) e contenenti il 2% di molecole attive. Sono state determinate dimensioni, indice di polidispersione (PDI), potenziale  $\zeta$ , efficienza di incapsulamento (EE), interazione con il muco e cinetica di rilascio degli antimicrobici. È stata anche determinata l'attività antimicrobica e antibiofilm di NP contenenti Col e Tb.

### Risultati preliminari

Tutte le formulazioni hanno mostrato dimensioni di ~200 nm, basso PDI e potenziale  $\zeta$  negativo, proprietà adatte alla somministrazione polmonare di farmaci e che possono promuovere la diffusione del NP attraverso le barriere polmonari. Le NP hanno mostrato bassa interazione con la mucina, suggerendo che esse possono diffondere facilmente attraverso lo strato di muco e raggiungere più facilmente il bersaglio terapeutico. Il rilascio di Tb e P13#1 è apparso prolungato e sostenuto per oltre 20 giorni. L'aumento della percentuale di Polossamero ha determinato un aumento della velocità di rilascio, probabilmente dovuto al conseguente incremento di idrofilia e porosità della matrice di PLGA. Le NP contenenti Tb hanno mostrato attività biologiche leggermente inferiori a quelle della Tb libera, effetto ragionevolmente attribuibile al rilascio controllato nel tempo. Inaspettatamente, le NP contenenti Col hanno mostrato attività biologiche leggermente superiori a quelle della Col libera. È stato possibile dimostrare che il surplus di attività è dovuto al fatto che i Polossameri migliorano l'efficacia della Col.

### Conclusioni

Le NP PLGA/P407 si sono dimostrate promettenti per la veicolazione di Col e Tb in forma attiva. Durante il secondo anno l'analisi sarà estesa alle NP contenenti P13#1, quindi l'efficacia delle NP, da sole e in combinazione, sarà valutata nel modello animale di infezione polmonare della CFaCore.

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

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



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

47

### Andrea Battistoni<sup>1</sup>, Luigi Scipione<sup>2</sup>

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

### Background and rationale

The ability of *Pseudomonas aeruginosa* to evade the host immune responses and thrive in the lungs of people with cystic fibrosis (CF) is significantly dependent on its ability to import zinc (Zn). *P. aeruginosa* displays a noteworthy ability to import this metal, which is captured in the extracellular environments by a zinc-transporting molecule (zincophore) named pseudopaline. The identification of a pseudopaline-mediated mechanism of Zn uptake offers possibilities to improve antibiotic delivery in *P. aeruginosa*, overcoming some of its intrinsic mechanisms of antibiotic resistance.

### Hypothesis and objectives

This project aimed to develop modified antibiotics to selectively and effectively target *P. aeruginosa*. This was pursued using the Trojan horse strategy, which involves conjugating antibiotics to molecules synthesized by microorganisms for importing essential nutrients. Specifically, the goal was to conjugate antibiotics to pseudopaline, exploiting the need for *P. aeruginosa* to import Zn during infections.

### Essential methods

Medicinal chemistry strategies were used to synthesize simplified derivatives of pseudopaline, which were conjugated to aztreonam. The antimicrobial activity of these compounds was tested on reference and clinical bacterial strains under Zn-rich and Zn-deficient conditions.



## Results

We successfully generated conjugates between aztreonam and two simplified forms of pseudopaline, which were preliminarily tested on the reference strain PA14. Under conditions of low Zn availability, mimicking the environment of the CF lung, both conjugates displayed antimicrobial activity against the wild type strain but poor efficacy against a strain lacking the pseudopaline receptor. In contrast, aztreonam maintained consistent efficacy against both the wild type and mutant strains, regardless of zinc availability. Notably, one conjugate was significantly more active than aztreonam against both PA14 and a collection of clinical isolates.

## Conclusions

These results, which provide proof of concept for the proposed strategy, led to the development of a modified antibiotic that, *in vitro*, is more effective than the original one. This study, therefore, paves the way for improved treatments against *P. aeruginosa* infections.

## Razionale dello studio

La capacità di *Pseudomonas aeruginosa* di proliferare nei polmoni delle persone con fibrosi cistica (FC) dipende significativamente dalla sua abilità di importare zinco (Zn). *P. aeruginosa* ha una notevole capacità di importare questo metallo, catturato nell'ambiente extracellulare attraverso una molecola trasportatrice di zinco chiamata pseudopalina. L'identificazione di un meccanismo di assorbimento dello Zn mediato dalla pseudopalina offre nuove opportunità per migliorare la somministrazione di antibiotici contro *P. aeruginosa*, superando alcuni dei suoi meccanismi intrinseci di resistenza agli antibiotici.

## Ipotesi e obiettivi

Questo progetto mirava a sviluppare antibiotici modificati per colpire *P. aeruginosa* in modo più efficace. A tal fine, è stata impiegata la strategia del cavallo di Troia, che prevede la coniugazione di antibiotici con molecole sintetizzate dai microrganismi per l'importo di nutrienti essenziali. In particolare, l'obiettivo era coniugare gli antibiotici alla pseudopalina, sfruttando la necessità di *P. aeruginosa* di importare Zn durante le infezioni.

## Metodi

Sono state adottate strategie di chimica farmaceutica per sintetizzare coniugati tra l'aztreonam e derivati semplificati della pseudopalina. L'attività antimicrobica di questi composti è stata testata su varianti batteriche di riferimento e cliniche in condizioni di abbondanza e carenza di Zn.

## Risultati

Abbiamo generato con successo coniugati tra aztreonam e due forme semplificate di pseudopalina, che sono state testate preliminarmente sul ceppo di riferimento PA14. In condizioni di bassa disponibilità di Zn, che imitano l'ambiente polmonare nella fibrosi cistica, entrambi i coniugati hanno mostrato attività antimicrobica contro la variante selvatica, ma scarsa efficacia contro una variante priva del recettore per la pseudopalina. Al contrario, l'aztreonam ha mantenuto un'efficacia costante contro entrambe le varianti, indipendentemente dalla disponibilità di Zn. È importante sottolineare che uno dei coniugati ha mostrato un'attività significativamente superiore rispetto all'aztreonam sia contro PA14 che contro gli isolati clinici testati.

## Conclusioni

Questi risultati, che forniscono una prova di concetto per la strategia proposta, hanno portato allo sviluppo di un antibiotico modificato che, *in vitro*, è più attivo dell'originale. Questo studio apre quindi la strada a trattamenti più efficaci contro le infezioni da *P. aeruginosa*.

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

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



Teresa Zelante (first pic, 2<sup>nd</sup> from the left) with her collaborators

48

## Teresa Zelante

Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Italy

(FFC#15/2022, ongoing)

## Background and rationale

Despite being a widespread global disease, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) still lacks clear understanding of pathogenesis, which limits the ability to be diagnosed and hinders development of therapeutic strategies. Current treatments focus on reducing Th2 immunological response using corticosteroids and lowering fungal burden with the use of antifungal agents. Unfortunately, even if treated, many patients still suffer from active disease or frequent exacerbation, which pose a further health burden on patients that are often already compromised. In addition, existing therapies focus only on treating symptoms of ABPA, which forces therapies to be always reactionary, as ABPA lacks clear biological markers to predict development and progression of the disease.

## Hypothesis and objectives

By understanding how the cytokine pattern may affect isotype switch, we are identifying the induction of non-beneficial IgE responses depending on the type of cell immunity and therefore cytokine microenvironment. Our interest is also focused on anti-fungal IgG with known anti-inflammatory role, also acting as a non-anaphylactic or "blocking immunoglobulin" against non-beneficial IgE responses. Pivotaly, the role of IL-17F in shaping IgE switch is here investigated. Our objectives are: i) to understand the kinetics and determine the titres of the human antibody repertoires against *Aspergillus* in ABPA; ii) to identify different cytokine patterns, which are known to correlate with Ig enhancement and disease severity and remission; iii) to investigate which is the cytokine pattern able to shape the protective or non-protective antifungal Ig subclasses.

<b>Essential methods</b>	<i>The titres of antigen specific/total IgG subclasses and IgE are first determined at different stages of ABPA in people with cystic fibrosis. In parallel, we are determining the cytokine pattern induced to understand the main cells involved in IgE switching.</i>
<b>Preliminary results</b>	<i>IL-17F was found to be increased in ABPA patients while barely detectable in cystic fibrosis and sensitized patients and it is positively correlated to both specific anti-Aspergillus IgE and total serum IgE. Furthermore, similarly to IL-17F, also IL-22 and IL-23 were found increased in plasma of ABPA patients but not in cystic fibrosis, while no difference was found for IL-17A.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>This peculiar IL-17F-IL-22-IL-23 cytokine signature is characterizing ABPA patients compared to non-ABPA. This signature is also associated with an increased susceptibility of ABPA patients to Staphylococcus aureus, as it seems to take advantage of the ABPA neutropenia.</i>

<b>Razionale dello studio</b>	Nonostante sia una malattia diffusa a livello globale, la patogenesi dell'aspergillosi broncopulmonare allergica (ABPA) non è del tutto chiara, il che limita la capacità di diagnosi e ostacola lo sviluppo di strategie terapeutiche. I trattamenti attuali si concentrano sulla riduzione della risposta immunologica usando corticosteroidi e sulla riduzione del carico fungino. Purtroppo, anche se trattati, molti pazienti soffrono di frequenti esacerbazioni della malattia, il che pone un ulteriore livello di gravità su pazienti spesso già compromessi. Inoltre, le terapie spesso sono sintomatiche e tardive, poiché l'ABPA manca di chiari marcatori biologici per prevedere lo sviluppo e la progressione della malattia.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Comprendendo come il pattern delle citochine possa influenzare la produzione di isotipi anticorpali, stiamo identificando l'induzione di risposte IgE patogenetiche a seconda del tipo di immunità cellulare e quindi del microambiente citochinico condizionante. In particolare, viene studiato il ruolo di IL-17F nel modificare il cambio di isotipo verso le IgE. I nostri obiettivi sono: i) comprendere la cinetica e determinare i titoli dei repertori anticorpali umani contro <i>Aspergillus</i> in persone con fibrosi cistica (FC) e ABPA; ii) identificare diversi pattern di citochine, che sono noti per essere correlati con il potenziamento delle IgE e gravità o al contrario remissione della malattia; iii) studiare quale sia il pattern citochinico in grado di modulare le sottoclassi di Ig antifungine protettive o non protettive.
<b>Metodi</b>	I titoli delle sottoclassi di IgG antigene/totali e delle IgE sono determinati in diversi stadi dell'ABPA in persone con FC. In parallelo, determiniamo il pattern di citochine indotto. Nel modello animale, stimoleremo la generazione delle sottoclassi anticorpali con il pattern delle citochine identificato.
<b>Risultati preliminari</b>	I livelli di IL-17F sono aumentati nei pazienti con ABPA rispetto a pazienti non-ABPA. La produzione di IL-17F è correlata positivamente sia alle IgE specifiche anti- <i>Aspergillus</i> che alle IgE sieriche totali. Inoltre, analogamente a IL-17F, anche IL-22 e IL-23 sono prodotte in elevata quantità nel plasma dei pazienti con ABPA versus i pazienti non-ABPA, mentre non è stata riscontrata alcuna differenza per IL-17A.
<b>Conclusioni</b>	Questa peculiare signature citochinica IL-17F-IL-22-IL-23 caratterizza i pazienti ABPA rispetto ai non-ABPA. Tale <i>signature</i> è anche associata a un'aumentata suscettibilità dei pazienti con ABPA allo <i>Staphylococcus aureus</i> .

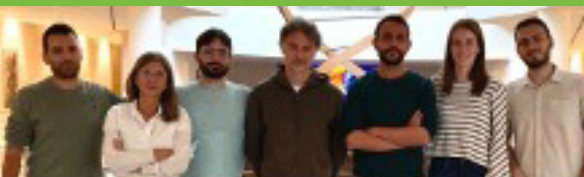
## SESSION 10

# Fighting Mycobacteria infections

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

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

**Background and rationale**



Nicola Ivan Lorè (on the left) with his collaborators

49

**Marco<sup>2</sup>, Stefano de Pretis<sup>3</sup>, Kiarash Moghaddasi<sup>2</sup>, Fabio Saliu<sup>2</sup>, Chiara Ferrari<sup>2</sup>, Andrea Gramegna<sup>4</sup>, Valeria Daccò<sup>5</sup>, Flavio Favari<sup>6</sup>, Maria Rosaria Catania<sup>7</sup>, Cristina Russo<sup>8</sup>, Valeria Ghisetti<sup>9</sup>, Francesco Blasi<sup>3</sup>, Daniela Maria Cirillo<sup>2</sup>, Nicola Ivan Lorè<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Clinical Microbiology and Virology Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>2</sup>Emerging Bacterial Pathogens Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>3</sup>Center for Omics Sciences, IRCCS San Raffaele Institute, Milan, Italy - <sup>4</sup>Respiratory Unit and Cystic Fibrosis Adult Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>5</sup>Department of Paediatrics, Cystic Fibrosis Center, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - <sup>6</sup>UOC Microbiology and Virology Unit, Department of Pathology, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona, Italy - <sup>7</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Italy - <sup>8</sup>UOC Unit of Microbiology and Diagnostic Immunology, Pediatric Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy - <sup>9</sup>Microbiology and Virology, ASL Città di Torino, Italy (**FFC#7/2022, ongoing**)

*Nontuberculous mycobacteria (NTM) are recently rising up as emerging pathogens among people with cystic fibrosis (pwCF). Mycobacterium abscessus complex (MA) is the dominant NTM species in the European CF community. PwCF colonized by MA display heterogeneous clinical outcomes, ranging from asymptomatic colonization to progressive lung function decline and damage, a condition known as MA Pulmonary Disease (MA-PD). Recent multicenter studies, exploiting whole genome sequencing (WGS) analysis of MA isolates, have reported the presence of Dominant Circulating Clones (DCCs) of MA in pwCF.*

### Hypothesis and objectives

To date, the intrinsic pathogenic potential of different MA DCCs, collected from Italian pwCF with different clinical outcomes, remains to be elucidated. Moreover, the development of new reliable biomarkers is urgently needed to better define disease stages and to limit the cost of MA-PD intensive therapeutic regimen. The hypotheses guiding this proposal are that i) the distribution of Italian DCCs can be characterized and that ii) molecular signatures associated with MA-PD disease can be identified.

### Essential methods

i) A retrospective/prospective observational study was set up collecting MA strains from pwCF with different stage of MA-PD. ii) We are using biological samples from pwCF with different risks of MA pulmonary disease in order to determine novel biomarkers of MA-PD by a new genomic technology approach called "Single Cells RNA sequencing".

### Preliminary results

Currently, we collected over 70 MA strains and related clinical data among different Italian CF centers. All strains were characterized phenotypically and genotypically by WGS, and their antimicrobial resistance profiles were defined. We found out common bacterial genomic mutations in MA strains and similar distribution of DCCs from different CF centers. Additional bioinformatic analyses are undervaluation. Antimicrobial resistance profiles and the association with clinical data is still under progress. For the second aim, we collected blood samples from the designed cohort of pwCF and defined immune signatures associated with MA-PD status.

### Conclusions

Our project is i) determining current distribution of MA DCCs, belonging to Italian pwCF with different clinical outcomes, and ii) validating novel biomarkers to improve the decision-making processes associated with NTM infection in pwCF.

### Razionale dello studio

I micobatteri non tubercolari (MNT) appartenenti al *Mycobacterium abscessus* complex (MA) sono le specie più frequentemente isolate nelle persone con fibrosi cistica (FC) in Europa. Le persone colonizzate da MA presentano quadri clinici eterogenei: possono avere una colonizzazione asintomatica o sviluppare una progressiva e grave disfunzione polmonare nota come MA-PD. Inoltre, un recente studio multicentrico inglese ha rilevato la presenza di Cloni Circolanti Dominanti (DCC) nelle persone con FC mediante il *Whole Genome Sequencing* (WGS) di ceppi di MA.

### Ipotesi e obiettivi

A oggi resta da chiarire la potenziale patogenicità dei diversi DCC di MA nelle persone italiane con FC, che presentano differenti quadri clinici. È evidente come la difficoltà di diagnosi e le limitate opzioni terapeutiche disponibili rendano necessario lo sviluppo di nuovi marcatori biologici utili a definire le diverse fasi della malattia polmonare da MA. Le ipotesi alla base di questo progetto sono che i) si possa caratterizzare la distribuzione dei DCC italiani e che ii) si possano associare specifici profili infiammatori al rischio di malattia da MA.

### Metodi

i) Abbiamo avviato uno studio osservazionale retrospettivo raccogliendo ceppi MA da persone con FC a diversi stadi di infezione da MA. ii) Abbiamo usato campioni biologici di persone con FC a diverso rischio di malattia polmonare da MA al fine di determinare nuovi biomarcatori mediante il sequenziamento di RNA a cellule singole.

### Risultati preliminari

Attualmente, abbiamo raccolto oltre 70 varianti MA tra i diversi centri FC. La caratterizzazione fenotipica e genotipica delle varianti collezionate ha rilevato la presenza di comuni mutazioni genomiche negli isolati MA e una distribuzione simile dei DCC tra i centri FC. I profili di resistenza antimicrobica e l'associazione con i dati clinici sono ancora in fase di sviluppo. Per il secondo obiettivo abbiamo raccolto campioni di sangue dalla coorte progettata di persone con FC e la valutazione della trascrittoma è stata effettuata. Abbiamo identificato potenziali nuovi biomarcatori associati con la malattia polmonare da MA.

### Conclusioni

Il nostro progetto mira a: i) determinare l'attuale distribuzione delle MA DCC, appartenenti a persone italiane con fibrosi cistica, con diversi esiti clinici, e ii) validare nuovi biomarcatori per migliorare i processi decisionali associati all'infezione da MNT nelle persone con FC.

### Nontuberculous Mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against *M. abscessus* iron acquisition pathways

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



Picture top left: Laurent Robert Chiarelli (2<sup>nd</sup> from the left) with his collaborators. Picture top right: Sonia Covaceuszach (2<sup>nd</sup> from the left) with her collaborators. At the bottom, Fiorella Meneghetti (in the middle) and collaborators.

50

**Matteo Mori<sup>2</sup>, Giovanni Stelitano<sup>1</sup>, Matteo Tomaiuolo<sup>3</sup>, Gabriele Diana<sup>3</sup>, Alberto Tresoldi<sup>2</sup>, Mario Cocorullo<sup>1</sup>, Giuseppe Mangiatordi<sup>3</sup>, Alberto Cassetta<sup>3</sup>, Marina Camera<sup>2</sup>, Stefania Villa<sup>2</sup>, Sonia Covaceuszach<sup>3</sup>, Fiorella Meneghetti<sup>2</sup>, Laurent Robert Chiarelli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology and Biotechnology Lazzaro Spallanzani, University of Pavia, Italy - <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Italy - <sup>3</sup>Institute of Crystallography, CNR, Trieste, Italy (FFC#5/2022, concluded)

### Background and rationale

The resistance of *Mycobacterium abscessus* (*Mab*) to conventional therapies is rising globally, particularly among individuals with cystic fibrosis. This highlights the urgent need for new strategies. Iron acquisition is a promising target, crucial for the growth and virulence of mycobacteria. To obtain this cofactor, mycobacteria produce siderophores, specific chelators whose biosynthesis was extensively studied in *M. tuberculosis*, leading to the development of inhibitors with bacteriostatic activity.



<b>Hypothesis and objectives</b>	<i>The project aims to identify new iron uptake inhibitors against Mab by targeting salicylate synthase (SaS), the first enzyme involved in siderophore biosynthesis.</i>
<b>Essential methods</b>	<i>In the first year, a structural model confirmed the potential of 5-phenylfuran-2-carboxylate as a scaffold for developing Mab-SaS inhibitors. Additionally, we solved the crystal structure of Mab-SaS, which was used to refine virtual screenings (VS). Concurrently, we attempted co-crystallization of Mab-SaS with previously identified ligands. For each compound identified, we evaluated activity and affinity by biochemical and biophysical methods.</i>
<b>Results</b>	<i>In this second year: i) we successfully crystallized Mab-SaS with picolinic acid, solving the enzyme-ligand complex structure. ii) The new structure was used to further refine the VS. This led to the identification of specific libraries, aimed at discovering novel promising scaffolds. iii) Among these, the pyrrolo-pyridine nucleus emerged as a particularly promising scaffold, with the best-performing compounds having IC50 values in the low <math>\mu\text{M}</math> range. iv) In addition to develop new inhibitors, a VS of FDA-approved drug libraries was conducted. Eleven drugs were selected and three showed significant activity against Mab-SaS. Notably, one drug, hydroxystilbamidine, also exhibited some antimycobacterial activity.</i>
<b>Conclusions</b>	<i>The availability of the Mab-SaS crystal structure allowed for more precise in silico screenings, leading to the discovery of new inhibitors. In particular, the identification of the pyrrolo-pyridine nucleus as a potent scaffold is promising. Additionally, the VS of FDA-approved drugs identified hydroxystilbamidine as a compound with dual activity: inhibiting Mab-SaS and displaying antimycobacterial properties. These findings underscore the potential of drug repurposing strategies to expedite the development of new agents against Mab which could improve treatment options for this pathogen.</i>

<b>Razionale dello studio</b>	La resistenza di <i>Mycobacterium abscessus</i> (Mab) alle terapie è in aumento, in particolare tra le persone con fibrosi cistica. Pertanto, sono necessarie nuove strategie. L'acquisizione del ferro è un bersaglio promettente, cruciale per la crescita e la virulenza del patogeno. Per acquisire questo cofattore, i micobatteri producono siderofori, specifici chelanti la cui biosintesi è stata ampiamente studiata in <i>M. tuberculosis</i> , portando a inibitori con attività batteriostatica.
<b>Ipotesi e obiettivi</b>	Il progetto si propone di identificare nuovi inibitori dell'assorbimento del ferro in Mab, che inibiscano la salicilato sintasi (SaS), il primo enzima della biosintesi dei siderofori.
<b>Metodi</b>	Durante il primo anno, usando un modello strutturale, abbiamo confermato il potenziale del fenil-furano-2-carbossilato come scaffold per lo sviluppo di inibitori. Inoltre, abbiamo risolto la struttura dell'enzima, che è stata usata per perfezionare gli screening virtuali (VS). Parallelamente, sono stati tentati esperimenti di cristallizzazione di Mab-SaS con i ligandi. Per tutti i composti, le attività e le affinità sono state determinate con metodi biochimici e biofisici.
<b>Risultati</b>	In questo secondo anno: i) abbiamo co-cristallizzato Mab-SaS con l'acido picolinico, risolvendone la struttura. ii) La nuova struttura è stata usata per affinare il VS, portando all'identificazione di librerie specifiche, finalizzate a individuare nuovi scaffold. iii) Tra questi, molto interessante è il nucleo pirrolo-piridinico, i cui composti più performanti hanno valori di IC50 nel basso $\mu\text{M}$ . iv) Inoltre, è stato condotto un VS di librerie di farmaci approvati dalla FDA, selezionando 11 farmaci, tre dei quali hanno mostrato un'attività significativa contro Mab-SaS. In particolare, un farmaco, l'idrossistilbamidina, ha dimostrato anche attività antimicobatterica.
<b>Conclusioni</b>	La disponibilità della struttura di Mab-SaS ha permesso di affinare lo screening <i>in silico</i> , portando alla scoperta di nuovi inibitori, tra cui un promettente scaffold rappresentato dal nucleo pirrolo-piridinico. Inoltre, il VS di farmaci approvati dalla FDA, ha permesso di identificare l'idrossistilbamidina come un composto con doppia attività: inibizione di Mab-SaS e proprietà anti-micobatteriche. Questi risultati sottolineano il potenziale della strategia di riproposizione di farmaci, per accelerare lo sviluppo di nuovi agenti contro Mab, che possano migliorare le opzioni di trattamento.

**Fighting *Mycobacterium abscessus* infections by a novel combination therapy**

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



Left to right: Noemi Poerio, Tommaso Olimpieri, Greta Ponzecchi, Marco Maria D'Andrea and Maurizio Fraziano

51

**Noemi Poerio<sup>1</sup>, Tommaso Olimpieri<sup>1</sup>, Nicola I. Lorè<sup>2</sup>, Fabiana Ciciriello<sup>3</sup>, Greta Ponsecchi<sup>1</sup>, Marco Maria D'Andrea<sup>1</sup>, Federico Alghisi<sup>3</sup>, Daniela Cirillo<sup>2</sup>, Maurizio Fraziano<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy - <sup>2</sup>Emerging Bacteria Pathogens Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - <sup>3</sup>Fibrosis Unit, Paediatric Hospital Bambino Gesù, Rome, Italy

(FFC#13/2022, concluded)

**Background and rationale**

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

**Hypothesis and objectives**

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

**Essential methods**

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

**Results**

Our results show that both ABL/PI5P or ABL/PS and Kaftrio *in vitro* treatment is able to reduce Mab intracellular viability in macrophages of people with CF undergoing or not Kaftrio regimen. Notably, no synergistic, additive or interference effects were shown when the treatments are combined. Furthermore, the *in vitro* stimulation with ABL/PI5P or ABL/PS of *in vitro* Mab-infected macrophages from people with CF who did not receive Kaftrio therapeutic regimen lead to a significant reduction of intracellular mycobacterial viability and the combination with amikacin resulted in a further significant reduction in comparison with the single treatments.

**Conclusions**

The results reported herein suggest that ABL/PI5P and ABL/PS liposomes, in combination with antibiotic, may represent a valuable therapeutic treatment which can be developed for the control of Mab infection both in patients receiving standard Kaftrio therapy and, most importantly, in people with CF who cannot benefit of such pharmacological treatment.

**Razionale dello studio**

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

**Ipotesi e obiettivi**

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

**Metodi**

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

**Risultati**

I nostri risultati mostrano che sia il trattamento *in vitro* con ABL/PI5P che ABL/PS e Kaftrio è in grado di ridurre la vitalità intracellulare di Mab in macrofagi di persone con FC sottoposte o meno a terapia farmacologica con il Kaftrio, non riscontrando alcun effetto sinergico, additivo o di interferenza quando i trattamenti sono stati combinati. Inoltre, la stimolazione *in vitro* con ABL/PI5P o ABL/PS in combinazione con l'antibiotico amikacina, di macrofagi infettati *in vitro* con Mab e provenienti da persone con FC non trattate farmacologicamente con Kaftrio, ha portato a una riduzione significativa della vitalità micobatterica significativa rispetto ai singoli trattamenti.

**Conclusioni**

I nostri risultati dimostrano che il trattamento con i liposomi ABL/PI5P e ABL/PS, in combinazione con antibiotici, possa rappresentare una valida strategia terapeutica alternativa per il controllo dell'infezione da Mab, sia in persone con FC che ricevono il trattamento terapeutico con il Kaftrio ma soprattutto, in tutte le persone con FC che non possono beneficiare di tale trattamento farmacologico.



**Anna Griego<sup>1,2</sup>, Stefano Muzzioli<sup>1,2</sup>, Beatrice Antinori<sup>1,2</sup>, Giorgia Moschetti<sup>1,2</sup>, Nicola I. Lorè<sup>3</sup>, Daniela M. Cirillo<sup>3</sup>, Loris Rizzello<sup>1,2</sup>, Edoardo Scarpa<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Science, University of Milan, Italy - <sup>2</sup>National Institute of Molecular Genetics (INGM), Milan, Italy - <sup>3</sup>Emerging Bacterial Pathogens Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

(FFC#12/2023, ongoing)

### Background and rationale

*Mycobacterium abscessus* (*Mab*) is increasingly recognized as a significant pathogen in people with cystic fibrosis (CF). *Mab* intrinsic antibiotic resistance and the overuse of antimycobacterial treatment are diminishing the effectiveness of current therapies. Thus, the development of novel approaches is required. Upon infection, *Mab* is phagocytized by alveolar macrophages (AMs), and recent studies suggest that histone posttranslational modification (PTMs), such as the acetylation of H3 lysine 14 (H3K14ac), could influence AMs polarization. Specifically, H3K14ac might significantly impact how single-AMs sense *Mab* and orchestrate their inflammatory responses.

### Hypothesis and objectives

We hypothesize that H3K14ac remodeling could enhance AMs' capacity to resolve *Mab* infection by shifting their polarization from a permissive to an eradicating phenotype.

### Essential methods

To test this, we explored the potential of Panobinostat, a clinically approved histone deacetylase inhibitor, to modulate AMs towards a more *Mab*-killing state. By using a combination of transcriptomic, proteomic, and high-resolution microscopy, we analyzed Panobinostat's effect on AMs viability, physiology, and polarization.

### Preliminary results

We showed that Panobinostat did not induce apoptosis at low concentrations but significantly altered AMs function, promoting a more proinflammatory state. Additionally, we confirmed its ability to remodel H3K14ac in AMs, demonstrating that Panobinostat shifts AMs polarization towards a phenotype more adept at controlling *Mab* infection. In infected AMs, Panobinostat appeared to limit *Mab*'s ability to hijack host cells and prevent the spread of infection to neighbouring, non-infected AMs. Our results suggest that epigenetic regulation via HDAC inhibition can enhance host defence mechanisms against *Mab*, highlighting the crucial role of epigenetics in infection control.

### Conclusions

In sum, this research paves the way for a novel epitherapy that exploits the functional and phenotypic plasticity of AMs, offering a promising adjunct to current *Mab* treatment regimens in people with CF.

### Razionale dello studio

Tra tutti i microrganismi patogeni, le infezioni causate da *Mycobacterium abscessus* (*Mab*), un micobatterio non tubercolare, sono in aumento tra le persone con fibrosi cistica (FC). A oggi, il trattamento dell'infezione da *Mab* è lungo e debilitante in quanto comporta l'uso di più antibiotici. *Mab* ha la capacità naturale di contrastare l'attività di molti farmaci che, combinata con il loro attuale uso improprio, sta promuovendo l'aumento di specie resistenti ai farmaci disponibili. Pertanto, è fondamentale trovare approcci alternativi che aiutino a eliminare l'infezione da *Mab*. Quando *Mab* entra nell'organismo viene riconosciuto e fagocitato dai macrofagi alveolari (MA), attivando una risposta infiammatoria. Al riguardo, studi recenti suggeriscono che le modifiche post-traduzionali degli istoni, come per esempio l'acetilazione della lisina 14 dell'istone 3 (H3K14ac), possano influenzare la polarizzazione dei MA, condizionando il modo in cui loro rilevano *Mab* e orchestrano la risposta infiammatoria.

### Ipotesi e obiettivi

La nostra ipotesi è che la rimodulazione di H3K14ac possa potenziare la capacità dei MA di risolvere l'infezione, spostando il loro fenotipo da permissivo a infiammatorio. Per verificare questa ipotesi, abbiamo esplorato l'uso del Panobinostat, un inibitore delle deacetilasi istoniche già approvato clinicamente, per modulare i MA verso uno stato più efficace contro *Mab*.

### Metodi

Usando un approccio combinato di trascrittomico, proteomico e microscopia ad alta risoluzione, abbiamo usato l'effetto di Panobinostat sulla vitalità, fisiologia e polarizzazione dei MA.

### Risultati preliminari

Abbiamo dimostrato che, a basse concentrazioni, Panobinostat non induce apoptosi ma altera significativamente la funzione dei MA, promuovendo uno stato più pro-infiammatorio. Inoltre, abbiamo confermato la sua capacità di rimodulare H3K14ac nei MA, evidenziando un cambiamento verso un fenotipo più efficace nel controllo dell'infezione da *Mab*. Nei MA infettati, il Panobinostat sembra limitare la capacità di *Mab* di prendere il controllo delle cellule ospiti e prevenire la diffusione dell'infezione nei MA non infetti.

### Conclusioni

Questo studio apre la strada a una nuova epiterapia che sfrutta la plasticità funzionale e fenotipica dei MA, offrendo una potenziale terapia aggiuntiva per le persone con FC infettate da *Mab*.



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

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



On the left: Riccardo Manganelli (at the top, 3<sup>rd</sup> from the right) with his collaborators. Top right: Maria Rosalia Pasca (3<sup>rd</sup> from the left) with her collaborators. Bottom right: Fabio Saliu (3<sup>rd</sup> from the right) with his collaborators

53

### **Maria Rosalia Pasca<sup>1</sup>, Riccardo Manganelli<sup>2</sup>, Fabio Saliu<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology and Biotechnology Lazzaro Spallanzani, University of Pavia, Italy -

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, University of Padua, Italy - <sup>3</sup>Infection and Cystic Fibrosis Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

(FFC#9/2023, ongoing)

#### **Background and rationale**

VOMG is a new small synthetic, water soluble, "drug-like" molecule with high bactericidal activity against several cystic fibrosis (CF) pathogens such as *Mycobacterium abscessus* (Mab). Because of its physicochemical properties, it is suitable for novel drug delivery formulations, including aerosol inhalation. Additional features include: i) VOMG is active against planktonic Mab cells and in Mab-infected mice. ii) VOMG is active against Mab biofilms. iii) VOMG kills Mab cells by targeting an essential mechanism for bacterial growth, namely cell division and the FtsZ enzyme. iv) VOMG kills also other CF pathogens (e.g.: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium avium*, fungal species, etc). So, it could be used in case of co-infection. v) VOMG can be also used in combination with other anti-Mab antibiotics. This project proposes further preclinical studies for the progression of VOMG as a potential antibiotic against lung infections in CF.

#### **Hypothesis and objectives**

In the 1<sup>st</sup> year of this project the following points were developed: i) in-depth study of VOMG mechanism of action by the construction of Mab conditional knock-down (KD) mutants in genes coding for enzymes involved in cell division (FtsZ, SepF, EnvC, SteA, SteB, FtsQ); ii) optimization of Granuloma-like-structure (GLS) assay in Mab; iii) activity of VOMG in combination with amikacin by using a mouse model of Mab infection.

#### **Essential methods**

We used microbiological and biochemical methods to reach the aims of the project.

#### **Preliminary results**

To study the VOMG mechanism of action, we are constructing Mab conditional KD mutants in cell division (CD) encoding genes by using the CRISPRi system. We showed that the activity of SepF CD enzyme is not inhibited by VOMG. GLS assay was optimized in Mab, obtaining further information regarding the first stage of Mab infection. We validated the activity of VOMG alone and in combination with amikacin in a Mab infected animal model.

#### **Conclusions**

VOMG represents a valid drug candidate, specifically designed to inhibit Mab cells. It is endowed with excellent *in vitro* and *in vivo* properties, as well as a unique mode of action to inhibit the cell divisome. New therapeutic strategies for treating lung disease caused by Mab infection and other microorganisms may become available if VOMG progresses into the clinic.

#### **Razionale del progetto**

VOMG è una nuova piccola molecola sintetica, solubile in acqua, drug-like, con un'elevata attività battericida contro diversi patogeni che colpiscono individui con fibrosi cistica (FC), come *Mycobacterium abscessus* (Mab). Grazie alle sue proprietà fisico-chimiche, è adatto a nuove formulazioni per la somministrazione di farmaci, compreso l'aerosol. Ulteriori caratteristiche sono: i) VOMG è attivo contro Mab *in vitro* e *in vivo*; ii) VOMG è attivo contro i biofilm formati da Mab; iii) VOMG uccide le cellule di Mab colpendo un meccanismo essenziale per la crescita batterica, ovvero la divisione cellulare e l'enzima FtsZ; iv) VOMG uccide anche altri patogeni che colpiscono individui con FC (per es: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium avium*, specie fungine, ecc.) Può quindi essere usato in caso di coinfezione; v) VOMG può essere usato anche in combinazione con altri antibiotici anti-Mab. Questo progetto propone ulteriori studi preclinici per la progressione di VOMG come potenziale antibiotico contro le infezioni in individui con FC.

#### **Ipotesi e obiettivi**

Nel primo anno di questo progetto sono stati sviluppati i seguenti punti: i) studio approfondito del meccanismo d'azione della VOMG mediante la costruzione di mutanti condizionali di Mab knock-down (KD) in geni che codificano per enzimi coinvolti nella divisione cellulare (FtsZ, SepF, EnvC, SteA, SteB, FtsQ); ii) ottimizzazione del saggio Granuloma-like-structure (GLS) in Mab; iii) attività del VOMG in combinazione con l'amikacina usando un modello murino infettato da Mab.

#### **Metodi**

Abbiamo usato metodi microbiologici e biochimici per raggiungere gli obiettivi del progetto.

#### **Risultati**

Per studiare il meccanismo d'azione di VOMG, stiamo costruendo mutanti KD condizionali di Mab nei geni codificanti enzimi coinvolti nella CD usando il sistema CRISPRi. Abbiamo dimostrato che l'attività dell'enzima SepF della CD non è inibita da VOMG. Il saggio GLS è stato ottimizzato in Mab, ottenendo ulteriori informazioni sulla prima fase dell'infezione. Abbiamo confermato l'attività di VOMG da solo e in combinazione con l'amikacina in un modello animale infettato da Mab.

#### **Conclusioni**

VOMG rappresenta un valido candidato farmaco, specificamente progettato per inibire la crescita di Mab. È attivo *in vitro* e *in vivo*, e inibisce il divisoma cellulare. Se VOMG dovesse entrare in clinica, potrebbero essere disponibili nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle malattie polmonari causate dall'infezione da Mab e da altri microrganismi.

# Appendix 1

Publications from the studies funded by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation 2014-2024

Pubblicazioni dagli studi finanziati da FFC Ricerca dal 2014 al 2024

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Ibrahim SH, Turner MJ, Saint-Criq V et al "CK2 is a key regulator of SLC4A2-mediated Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in human airway epithelia" European Journal of Physiology 2017 Sep;469(9):1073-1091.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Brandas C, Ludovico A, Parodi A et al. "NBD2 Is Required for the Rescue of Mutant F508del CFTR by a Thiazole-Based Molecule: A Class II Corrector for the Multi-Drug Therapy of Cystic Fibrosis" *Biomolecules*. 2021 Oct; 11(10): 1417.
- Bongiorno R, Ludovico A, Moran O et al. "Elexacaftor Mediates the Rescue of F508del CFTR Functional Expression Interacting with MSD2" *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 16;24(16):12838.

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

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

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

- Finotti A, Fabbri E, Lampronti I et al. "MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in Genetic Diseases" *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2019 Jan 4.
- Gasparello J, Manicardi A, Casnati A et al. "Efficient cell penetration and delivery of peptide nucleic acids by an argininocalix[4]arene" *SCI REP* 2019 Feb 28;9(1):3036.
- Manicardi A, Gambari R, De Cola et al. "Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine" *Methods in Mol Biol* 2018;1811:49-63.



- Gambari R “Targeting microRNAs in Cystic Fibrosis (CF)” International Journal of Molecular Medicine 44: supplement, 2019, page S22
- Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. “Peptide Nucleic Acids for MicroRNAs Targeting” Methods in Mol Biol. submitted
- Sultan S, Fabbri E, Tamanini A et al. “A PNA-based masking strategy for CFTR upregulation by targeting miR-145-5p binding sites of CFTR mRNA” International Journal of Molecular Medicine 44: supplement, 2019, page S22
- Manicardi A, Gambari R, de Cola et al. “Preparation of Anti-miR PNAs for Drug Development and Nanomedicine” Methods in Mol Biol, 2018;1811:49-63.
- Fabbri E, Tamanini A, Jakova T et al. “Treatment of human airway epithelial Calu-3 cells with a peptide-nucleic acid (PNA) targeting the microRNA miR-101-3p is associated with increased expression of the cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ( ) gene” European Journal of Medicinal Chemistry, 2 October 2020, 112876
- Gambari R, Gasparello J, Fabbri E et al. “Peptide Nucleic Acids for MicroRNA Targeting” Methods Mol Biol. 2020;2105:199-215
- Gasparello J, Lomazzi M, Papi C et al. “Efficient *delivery* of MicroRNA and AntimiRNA molecules using an Argininocalix[4] arene macrocycle” Molecular Therapy Nucleic Acids 2019 Dec 6;18:748-763
- Sultan S, Rozzi A, Gasparello J et al. “A Peptide Nucleic Acid (PNA) Masking the miR-145-5p Binding Site of the 30UTR of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) mRNA Enhances CFTR Expression in Calu-3 Cells” Molecules 2020 Apr 5;25(7):1677
- Tamanini A, Fabbri E, Jakova T et al. “A Peptide-Nucleic Acid Targeting miR-335-5p Enhances Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ( CFTR) Gene with the Possible Involvement of the CFTR Scaffolding Protein NHERF1” Biomedicines. 2021 Jan 26;9(2):117.
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. “Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis” Front Immunol. 2020 Aug 4;11:1438.
- Papi C, Gasparello J, Zurlo M et al. “Combined Treatment of Bronchial Epithelial Calu-3 Cells with Peptide Nucleic Acids Targeting miR-145-5p and miR-101-3p: Synergistic Enhancement of the Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene” Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 9348.
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. “Overview of CF lung pathophysiology” Curr Opin Pharmacol. 2022 Jun;64:102214.
- Papi C, Gasparello J, Zurlo M et al., “The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene (CFTR) Is under Post-Transcriptional Control of microRNAs: Analysis of the Effects of agomiRNAs Mimicking miR-145-5p, miR-101-3p, and miR-335-5p” Noncoding RNA, 2023 Apr 18;9(2):29

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

- Sala V, Murabito A, Ghigo A “Inhaled Biologicals for the Treatment of Cystic Fibrosis” Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2019;13(1):19-26.
- Sala V, Della Sala A, Ghigo A et al. “Roles of phosphatidyl inositol 3 kinase gamma (PI3Kγ) in respiratory diseases” Cell Stress. 2021 Mar 8;5(4):40-51.

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

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

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

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

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

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

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

- Caldre S, Bergamini G, Sandri A et al. “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functional evaluations in a G542X+/IVS8Tn:T7/9 patient with acute recurrent pancreatitis” World Journal of Clinical Cases, submitted
- Conti C, Sorio S and Melotti 2 P “Organoid Technology and Its Role for Theratyping Applications in Cystic Fibrosis” Children (Basel). 2022 Dec 20;10(1):4.
- Kleinfelder K, Elena Somenza E, Farinazzo A et al. “CFTR Modulators Rescue the Activity of CFTR in Colonoids Expressing the Complex Allele p.[R74W;V201M;D1270N]/dele22\_24” Int J Mol Sci. 2023 Mar 8;24(6):5199.
- Latorre RV, Calicchia M, Bigliardi M et al. “Functional rescue of CFTR in rectal organoids from patients carrying R334W variant by CFTR modulators and PDE4 inhibitor Roflumilast” Respiratory Investigation, Volume 62, Issue 3, May 2024, Pages 455-461

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

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

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



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

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

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

*FFC Project#4/2019 “Restoring defective proteostasis in Cystic Fibrosis: novel strategies for F508del-CFTR repair” Giorgio Cozza (Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. Chimica Biologica)*

- Zanin S, Molinari S, Cozza G et al. “Intracellular protein kinase CK2 inhibition by ferulic acid-based trimodal nanodevice” *Int J Biol Macromol*, 2020 Sep 30;165(Pt A):701-712

*FFC Project#6/2019 “Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue” Luis J. V. Galiotta (Tethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)*

- Scudieri P, Musante I, Venturini A et al. “Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells” *Cells* 2020 Sep 13;9(9):2090
- Venturini A, Borrelli A, Musante I et al. “Comprehensive Analysis of Combinatorial Pharmacological Treatments to Correct Nonsense Mutations in the CFTR Gene” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11972.
- Galiotta LJV “TMEM16A (ANO1) as a therapeutic target in cystic fibrosis” *Curr Opin Pharmacol.* 2022 Jun;64:102206.

*FFC Project#8/2019 “Antimicrobial peptides from amphibian skin for treatment of lung pathology in cystic fibrosis: advanced in vitro and in vivo functional characterization” Maria Luisa Mangoni (Università La Sapienza Roma, Dip. di Scienze Biochimiche, Lab. di Peptidi Bioattivi)*

- Cappiello F, Carnicelli V, Casciaro B et al. “Antipseudomonal and Immunomodulatory Properties of Esc Peptides: Promising Features for Treatment of Chronic Infectious Diseases and Inflammation” *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 8;22(2):557.
- Ferrera L, Cappiello F, Loffredo MR et al. “Esc peptides as novel potentiators of defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an unprecedented property of antimicrobial peptides” *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021 Dec 31;79(1):67.

*FFC Project#10/2019 “Rescuing defective CFTR-F508del applying a drug repositioning strategy based on computational studies, surface plasmon resonance and cell-based assays” Marco Rusnati (Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale Sez. di Oncologia e Immunologia, Università di Brescia), Paola Fossa (Università di Genova, Dip. di Farmacia, Sez. di Chimica del Farmaco e del prodotto cosmetico), Alessandro Orro (Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR, Milano)*

- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20)
- Rusnati M, D’Ursi P, Pedemonte N et al. “Recent Strategic Advances in CFTR Drug Discovery: An Overview” *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 31;21(7):2407.
- Orro A, Uggeri M, Rusnati M et al. “*In silico* drug repositioning on F508del-CFTR: A proof-of-concept study on the AIFA library” *Eur J Med Chem.* 2021 Mar 5;213:113186.

- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. “Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(20), 12274

*FFC Project#11/2019 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)*

- Salvi M “Non-Histone Protein Methylation: Molecular Mechanisms and Physiopathological Relevance” *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(7):640-641
- D’Amore C, Borgo G, Salvi M “A mutational approach to dissect the functional role of the putative CFTR “PTM-CODE”” *J Cyst Fibros.* 2021 Sep;20(5):891-894.
- Borgo C, D’Amore C, Sarno S et al. “Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases” *Signal Transduct Target Ther.* 2021 May 17;6(1):183.
- D’Amore C, Borgo C, Bosello Travain V et al. “KDM2A and KDM3B as Potential Targets for the Rescue of F508del-CFTR” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9612.

*FFC Project#12/2019 “Proteomic approach for the identification of new leukocytes biomarkers directly related to a restored CFTR activity following ex vivo treatment with VX-770” Monica Averna (Università di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale), Emilio Marengo (Università del Piemonte Orientale, Dip. di Scienze e Innovazione Tecnologica, Torino)*

- Pedrazzi M, Vercellone S, Barberis E et al. “Identification of Potential Leukocyte Biomarkers Related to Drug Recovery of CFTR: Clinical Applications in Cystic Fibrosis” *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 10;22(8):3928
- Averna M, Melotti P, Sorio C “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” *Cells* 2021, 10, 3380.
- Capraro M, Pedrazzi M, De Tullio R et al. “Modulation of Plasmatic Matrix Metalloprotease 9: A Promising New Tool for Understanding the Variable Clinical Responses of Patients with Cystic Fibrosis to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulators” *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 29;24(17):13384.

*FFC Project#14/2019 “Investigating epithelial-stromal crosstalk in full thickness cystic fibrosis model on chip for evaluating novel therapeutic strategies” Paolo Netti (Istituto Italiano di Tecnologia, Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli), Diego Di Bernardo (Centro di Ricerca Interdipartimentale sui Biomateriali, Università di Napoli)*

- Mazio M, Scognamiglio LS, Passariello R et al. “Easy-to-Build and Reusable Microfluidic Device for the Dynamic Culture of Human Bronchial Cystic Fibrosis Epithelia”, *ACS Biomater Sci Eng.* 2023 May 8;9(5):2780-2792.
- Mazio C, Scognamiglio LS, Casale C et al. “A functional 3D full-thickness model for comprehending the interaction between airway epithelium and connective tissue in cystic fibrosis” *Biomaterials.* 2024 Mar 26;308:122546.

*FFC Project#1/2020 “Peptide-nucleic acids as potential CFTR amplifier molecules for cystic fibrosis treatment” Felice Amato (CEIN-GE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Lab. di ricerca in fibrosi cistica)*

- Comegna M, Conte G, Falanga AP et al. “Assisting PNA transport through cystic fibrosis human airway epithelia with biodegradable hybrid lipid-polymer nanoparticles” *Sci Rep.* 2021 Mar 18;11(1):6393.
- Ramalho AS, Amato F, Gentzsch M, “Patient-derived cell models for personalized medicine approaches in cystic fibrosis” *J Cyst Fibros.* 22 (2023) S32–S38

*FFC Project#5/2020 “Intestinal organoids for assessment and pharmacological correction of abnormalities in fluid transport and anion currents in patients affected by pancreatitis” Luca Frulloni (Università degli Studi di Verona, Dip. di Medicina, Div. Gastroenterologia), Hugo De Jonge (Erasmus University Medical Center), Vincenzina Lucidi (Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Centro Fibrosi Cistica)*

- Angyal D, Kleinfelder K, Ciciriello F et al. “CFTR function is impaired in a subset of patients with pancreatitis carrying rare CFTR variants” *Pancreatology*, 2024 Mar 10;S1424-3903(24)00066-8.

*FFC Project#6/2020 “Validation of the distribution and activity of new optimized leads in mouse model and other CF model systems” Laura Lentini and Ivana Pibiri (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), University of Palermo, Palermo)*

- Corrao F, Zizzo MG, Tutone M et al. “Nonsense codons suppression. An acute toxicity study of three optimized TRIDs in murine model, safety and tolerability evaluation” *Biomedicine & Pharmacotherapy* in press. October 2022.
- Pibiri I, Melfi R, Tutone M et al. “Targeting nonsense: Optimization of 1,2,4-oxadiazole trids to rescue cftr expression and functionality in cystic fibrosis cell model systems” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17), pp. 1–18, 6420.
- Tutone M, Pibiri I, Perriera R et al. “Pharmacophore-Based Design of New Chemical Scaffolds as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs)” *ACS Medicinal Chemistry Letters Open Access Volume 11, Issue 5, Pages 747 75314 May 2020.*
- Carollo PS, Tutone M, Culetta G et al. “Investigating the Inhibition of FTSJ1, a Tryptophan tRNA-Specific 20-O-Methyltransferase by NV TRIDs, as a Mechanism of Readthrough in Nonsense Mutated CFTR”, *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 1;24(11):9609.
- Perriera R, Vitale E, Pibiri I et al. “Readthrough Approach Using NV Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs): A Study of the Possible Off-Target Effects on Natural Termination Codons (NTCs) on TP53 and Housekeeping Gene Expression” *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 11;24(20):15084.

*FFC Project#7/2020 “Functional role of post-translational modifications in F508del-CFTR correction” Mauro Salvi (Università di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche)*

- Borgo C, D’Amore C, Capurro V et al. “Targeting the E1 ubiquitin-activating enzyme (UBA1) improves elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor efficacy towards F508del and rare misfolded CFTR mutants” *Cellular and Molecular Life Sciences* (2022) 79:192.
- Kleinfelder K, Villella VR, Hristodor AM et al. “Therotyping of the Rare CFTR Genotype A559T in Rectal Organoids and Nasal Cells Reveals a Relevant Response to Elxacaftor (VX-445) and Tezacaftor (VX-661) Combination” *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 19;24(12):10358.
- Okiyoneda T, Borgo C, Bosello Travain V et al. “Targeting ubiquitination machinery in cystic fibrosis: Where do we stand?” *Cell Mol Life Sci.* 2024 Jun 18;81(1):271.
- Borgo C, D’Amore C, Capurro V et al. “SUMOylation Inhibition Enhances Protein Transcription under CMV Promoter: A Lesson from a Study with the F508del-CFTR Mutant” *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 15;25(4):2302.

*FFC Project#9/2020 “Therotyping of rare CFTR genotypes for treatment with CFTR modulators” Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, AOUI Verona)*

- Ciciriello F, Bijvelds JCM, Alghisi F et al. “Therotyping of the Rare CFTR Variants E193K and R334W in Rectal Organoid-Derived Epithelial Monolayers” *J. Pers. Med.* 2022, 12, 632.
- Averna M, Melotti P, Sorio C. “Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis” *Cells.* 2021 Dec 1;10(12):3380
- Kleinfelder K, Melotti P, Manuela Hristodor AM et al., “CFTR modulators response of S737F and T465N CFTR variants on patient-derived rectal organoids” *Orphanet J Rare Dis.* 2024 Sep 13;19(1):343.
- Kleinfelder K, Villella VR, Manuela Hristodor AM et al. “Thermostable Lactonases Inhibit *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Effect *In Vitro* and in *Drosophila melanogaster* Model of Chronic Infection” *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 19;24(12):10358
- Conti J, Sorio C, Melotti P “Organoid Technology and Its Role for Therotyping Applications in Cystic Fibrosis”, *Children (Basel).* 2022 Dec 20;10(1):4.
- Kleinfelder K, Lotti V, Eramo A et al. “In silico analysis and therotyping of an ultra-rare CFTR genotype (W57G/A234D) in primary human rectal and nasal epithelial cells” *iScience* 26, 108180, November 17, 2023

- Kleinfelder K, Somenza E, Farinazzo A et al. “CFTR Modulators Rescue the Activity of CFTR in Colonoids Expressing the Complex Allele p. R74W;V201M;D1270N[dele22\_24]” *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(6), 5199

*FFC Project#1/2021 “Multiomics exploration of the CF primary bronchial epithelium lipidome and its role on CFTR rescue” Andrea Armirotti (Istituto Italiano di Tecnologia - IIT), Valeria Tomati (UOC Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova)*

- Liessi N, Tomati V, Capurro V et al. “The combination elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) modulates the de novo synthetic pathway of ceramides in a genotype-independent manner” *J Cyst Fibros.* 2023 Apr 21;S1569-1993(23)00115-7

*FFC Project#2/2021 “Harnessing CRISPR-Cas technology to revert F508del and 2789+5G>A CFTR defects” Anna Cereseto (CIBIO - Centro per la Biologia Integrata, Università degli Studi di Trento), Daniele Arosio (Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Trento)*

- Amistaldi S, Maule G, Ciciani M et al. “Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor”, *Mol Ther.* 2023 Mar 8;S1525-0016(23)00125-9.
- Bulcaen M, Kortleven P, Liu RB et al. “Prime editing functionally corrects cystic fibrosis-causing CFTR mutations in human organoids and airway epithelial cells” *Cell Rep Med.* 2024 May 21;5(5):101544.
- Amistaldi S, Maule G, Ciciani M et al. “Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor” *Mol Ther.* 2023 Mar 8;S1525-0016(23)00125-9.

*FFC Project#3/2021 “Toward the development of tailored therapies for insensitive CF gating mutations” Adriana Chilin (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Farmacologiche, Università di Padova), Gergely L. Lukacs (Dipartimento di Fisiologia, McGill University, Montreal - Canada)*

- Vaccarin C, Veit G, Hegedus T et al. “Synthesis and biological evaluation of Pyrazole-Pyrimidones as a new class of correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)” *J Med Chem.* 2024 Aug 13.

*FFC Project#4/2021 “Oxidative stress and autophagy in Cystic Fibrosis: Novel biochemical characterizations and drug discovery approaches” Giorgio Cozza (Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova), Federica Rossin (Dipartimento di Biologia dell’Università Tor Vergata di Roma)*

- Palucci I, Salustri A, De Maio F et al. “Cysteamine/Cystamine Exert Anti-*Mycobacterium abscessus* Activity Alone or in Combination with Amikacin”, 2023, *Int J Mol Sci.* 24:1203.
- Palucci I, Salustri A, De Maio F et al. “Cysteamine/Cystamine Exert Anti-*Mycobacterium abscessus* Activity Alone or in Combination with Amikacin” *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(2), 1203;

*FFC Project#5/2021 “In vitro evaluation of novel sequence-specific RNA editing tools to rescue nonsense mutant CFTR transcript” Aldo Di Leonardo (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche - STEBICEF, Università degli Studi di Palermo)*

- Chiavetta RF, Titoli S, Barra V et al. “Site-Specific RNA Editing of Stop Mutations in the CFTR mRNA of Human Bronchial Cultured Cells” *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 13: 10940.

*FFC Project#9/2021 “Lead optimization of MKT-077 analogues as Hsp70 allosteric inhibitors combined with F508del CFTR correctors: a multi-drug approach to contrast cystic fibrosis” Enrico Millo (Dip. di Medicina Sperimentale DIMES, Università degli Studi di Genova), Elena Cichero (Dip. di Farmacia, Università degli Studi di Genova), Santina Bruzzone (Dip. Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Genova)*

- Sabbadini R, Pesce E, Parodi A et al. “Probing Allosteric HSP70 Inhibitors by Molecular Modelling Studies to Expedite the Development of Novel Combined F508del CFTR Modulators” *Pharmaceuticals* 2021, 14, 1296.



- Baroni D, Scarano N, Ludovico A et al. “In Silico and In Vitro Evaluation of the Mechanism of Action of Three VX809-Based Hybrid Derivatives as Correctors of the F508del CFTR Protein” *Pharmaceuticals* (Basel). 2023 Dec 8;16(12):1702.
- Spallarossa A, Pedemonte N, Pesce E et al. “Cyclic diacyl thioureas enhance activity of corrector Lumacaftor on F508del-CFTR” *ChemMedChem*. 2023 Dec 17:e202300391.

*FFC Project#11/2021 “Alternative targets for the treatment of cystic fibrosis basic defect” Paolo Scudieri (Dipartimento di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili DINOGMI, Università degli Studi di Genova), Fabiana Ciciriello (IRCSS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma)*

- Gorrieri G, Zara F, Scudieri P “SLC26A9 as a Potential Modifier and Therapeutic Target in Cystic Fibrosis Lung Disease” *Biomolecules* 2022, 12, 202.
- Debczynski M, Gorrieri G, Mojsak D et al. “ATP12A Proton Pump as an Emerging Therapeutic Target in Cystic Fibrosis and Other Respiratory Diseases”, *Biomolecules* 2023, 13(10), 1455.
- Dębczyński M, Mojsak D, Tamburro S et al. “Generation of an induced pluripotent stem cell line (IGGi002A) from nasal cells of a cystic fibrosis patient homozygous for the G542X-CFTR mutation”, *Stem Cell Res*. 2023 Oct 18:72:103232.

*FFC Project#1/2022 “A lipid-based therapeutic approach to rescue CFTR with orphan mutations and implications in bacterial infections in cystic fibrosis” Massimo Aureli (Dip. Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale, Università di Milano), Anna Tamanini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)*

- Dobi D, Loberto N, Bassi R et al. “Cross-talk between CFTR and sphingolipids in cystic fibrosis” *FEBS Open Bio*. 2023 Sep;13(9):1601-1614. doi: 10.1002/2211-5463.13660. Epub 2023 Jun 22.
- Cafora M, Poerio N, Forti F et al. “Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models”, *Front Microbiol*. 2022 Sep 15:13:979610.

*FFC Project#4/2022 “Esculentin-derived peptides as novel therapeutic agents with antimicrobial and CFTR potentiator activities to address cystic fibrosis lung disease” Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma), Arianna Venturini (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA), Mattia Mori (Dip. Biotecnologie Mediche, Università di Siena)*

- Loffredo MR, Casciaro B, Bellavita R et al. “Strategic single-residue substitution in the antimicrobial peptide Esc(1-21) confers activity against *Staphylococcus aureus*, including drug-resistant and biofilm phenotype” *ACS Infect Dis*. 2024 Jul 12;10(7):2403-2418.
- Mangoni ML, Loffredo MR, Casciaro B et al. “An Overview of Frog Skin-Derived Esc Peptides: Promising Multifunctional Weapons against *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Pulmonary and Ocular Surface Infections”, *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 16;25(8):4400. doi: 10.3390/ijms25084400
- Di YP, Kuhn JM, Mangoni ML, “Lung antimicrobial proteins and peptides: from host defense to therapeutic strategies”, *Physiol Rev*. 2024 Oct 1;104(4):1643-1677.
- Loffredo MR, Cappiello F, Cappella G et al. “The pH-Insensitive Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Frog Skin Derived Peptide Esc(1-21): Promising Features for Novel Anti-Infective Drugs. *Antibiotics* (Basel). 26;13(8):701.

*FFC Project#9/2022 “Effect of inflammatory stimuli on airway epithelium ion transport in cystic fibrosis” Luis J. V. Galieta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)*

- Guidone D, Buccicrossi M, Scudieri P et al. “Airway surface hyper-viscosity and defective mucociliary transport by IL-17/TNF- $\alpha$  are corrected by beta-adrenergic stimulus” *JCI Insight*. 2022 Nov 22;7(22):e164944.

## 2. PERSONALIZED THERAPIES - THERATYPING

### Terapie personalizzate

*FFC Project#12/2018 “Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (theratyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches” Adriana Eramo (Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità), Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie Cellulari e Ematologia, La Sapienza, Roma)*

- Sette G, Lo Cicero S, Blaconà G et al. “Theratyping cystic fibrosis in vitro in ALI-culture and organoid models generated from patient-derived nasal epithelial Conditionally Reprogrammed Stem Cells” *Eur Respir J*. 2021 Aug 19;2100908

*FFC Project#9/2019 “Theratyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNF5 inhibitors” Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto “G. Gaslini”, UOC Genetica Medica, Genova), Andrea Cavalli (Istituto Italiano di Tecnologia, Biologia Computazionale e Chimica, Genova)*

- Pesce E, Pedemonte N, Leoni A et al. “Synthesis and biological evaluation of thiazole derivatives on basic defects underlying cystic fibrosis” *Bioorg Med Chem Lett*. 2020 Nov 1;30(21):127473.
- Capurro V, Tomati V, Sondo E et al. “Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment” *Int J Mol Sci*. 2021 May 17;22(10):5262
- Martina MG, Sannio F, Crespan E et al. “Towards Innovative Antibacterial Correctors for Cystic Fibrosis Targeting the Lung Microbiome with a Multifunctional Effect” *ChemMedChem* 2022, 17, e202200277
- Brusa I, Sondo E, Falchi F et al. “Proteostasis Regulators in Cystic Fibrosis: Current Development and Future Perspectives” *J. Med. Chem*. 2022, 65, 5212–5243
- Sondo E, Cresta F, Pastorino C et al. “The L467F-F508del Complex Allele Hampers Pharmacological Rescue of Mutant CFTR by Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis Patients: The Value of the *Ex vivo* Nasal Epithelial Model to Address Non-Responders to CFTR-Modulating Drugs” *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 3175.
- Principi E, Sondo E, Bianchi G et al. “Targeting of Ubiquitin E3 Ligase RNF5 as a Novel Therapeutic Strategy in Neuroectodermal Tumors” *Cancers* 2022, 14, 1802.
- Brusa I, Sondo E, Pesce E et al. “Innovative Strategy toward Mutant CFTR Rescue in Cystic Fibrosis: Design and Synthesis of Thiadiazole Inhibitors of the E3 Ligase RNF5”, *J Med Chem*. 2023 Jul 27;66(14):9797-9822.
- Tomati V, Costa S, Capurro V et al. “Rescue by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor of the G1244E cystic fibrosis mutation’s stability and gating defects are dependent on cell background” *J Cyst Fibros*. 2023 May;22(3):525-537.

*FFC Project#8/2020 “Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (theratyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches” Adriana Eramo (Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare), Marco Lucarelli (Università La Sapienza, Dip. di Medicina Sperimentale)*

- Lo Cicero S, Castelli G, Blaconà G et al., “L1077P CFTR pathogenic variant function rescue by Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor in cystic fibrosis patient-derived air–liquid interface (ALI) cultures and organoids: in vitro guided personalized therapy of non-F508del patients” *Respir Res*. 2023 Sep 6;24(1):217.
- Bruno SM, Blaconà G, Lo Cicero S et al., “Quantitative Evaluation of CFTR Gene Expression: A Comparison between Relative Quantification by Real-Time PCR and Absolute Quantification by Droplet Digital PCR” *Genes* (Basel). 2023 Sep 9;14(9):1781.

*FFC Project#7/2021 “Monocyte integrin activation as a cystic fibrosis drug evaluation test: validation phase” Carlo Laudanna (Università degli Studi di Verona, Dip. Di Medicina)*



- Toffali L, D'Ulivo B, Giagulli C et al. "An isoform of the giant protein titin is a master regulator of human T lymphocyte trafficking", *Cell Rep.* 2023 May 30;42(5):112516. Abstracts
- Melotti P, Conti J, Kleinfelder K et al. "Effects of ivacaftor therapy confirm the results of theratyping using rectal and nasal epithelial cells of a CF patient carrying the ultra-rare CFTR genotype W57G/A234D" European Cystic Fibrosis Society, 17th ECFS Basic Science Conference
- Melotti P, Montresor A, Kleinfelder K et al. "Monocyte integrin activation as a CFTR-targeted drugs evaluation test in cystic fibrosis patients: preliminary analysis" *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022
- Conti J, Melotti P, Kleinfelder K et al. "Effects of ivacaftor therapy confirm the results of theratyping using rectal and nasal epithelial cells of a cystic fibrosis patient carrying the ultra-rare CFTR genotype W57G (c.169T > G)/A234D (c.701C > A)" *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022
- Murabito A, Sala V, Pisano AR et al. "A PI3K $\gamma$  mimetic peptide triggers CFTR gating, bronchodilation and reduced inflammation in obstructive airway diseases" *Journal of Cystic Fibrosis*, Volume 21, Supplement 1, 2022
- Montresor A, Beatrice D'Ulivo B, Preato S et al. "Real-Life experience with CFTR modulators shows correction of LAD-IV phenotype in cystic fibrosis" *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2024 Oct;71(4):495-498.

FFC Project#8/2021 "**Theratyping of cystic fibrosis**" Marco Lucrelli (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma), Adriana Eramo (Istituto Superiore di Sanità, Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare, Roma)

- Lo Cicero S, Castelli G, Blaçonà G et al., "L1077P CFTR pathogenic variant function rescue by Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor in cystic fibrosis patient-derived air-liquid interface (ALI) cultures and organoids: in vitro guided personalized therapy of non-F508del patients" *Respiratory Research* (2023) 24:217.
- Bruno SM, Blaçonà G, Lo Cicero S et al., "Quantitative evaluation of CFTR gene expression: a comparison between relative quantification by real-time PCR and absolute quantification by droplet digital PCR" *Genes* (2023) 14(9):1781
- Kleinfelder K, Lotti V, Eramo A et al., "In silico analysis and theratyping of an ultra-rare CFTR genotype (W57G/A234D) in primary human rectal and nasal epithelial cells" *iScience* (2023) accepted

FFC Project#10/2021 "**Theratyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: meeting unmet needs**" Nicoletta Pedemonte (IRCCS Istituto Giannina Gaslini, UOC Genetica Medica, Genova), Renata Bocciardi (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili - DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

- Pedemonte N "Nasal epithelial cells as a gold-standard predictive model for personalized medicine in cystic fibrosis" *J Physiol.* 2022 Mar;600(6):1285-1286.
- Baldassarri M, Zguro K, Tomati V et al., "Gain- and Loss-of-Function CFTR Alleles Are Associated with COVID-19 Clinical Outcomes", *Cells.* 2022 Dec 16;11(24):4096.
- Farinha CM, Brodsky JL, Pedemonte N, "Fundamental and translational research in Cystic Fibrosis –why we still need it", *J Cyst Fibros.* 2023 Mar;22 Suppl 1:S1-S4.
- Fossa P, Uggeri M, Orro A et al. "Virtual Drug Repositioning as a Tool to Identify Natural Small Molecules That Synergize with Lumacaftor in F508del-CFTR Binding and Rescuing" *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 14;23(20):12274.
- Oliver KE, Carlon MS, Pedemonte N et al., "The revolution of personalized pharmacotherapies for cystic fibrosis: what does the future hold?" *Expert Opin Pharmacother.* 2023 Sep-Dec;24(14):1545-1565.
- Terlizzi V, Pesce E, Capurro V et al. "Clinical Consequences and Functional Impact of the Rare S737F CFTR Variant and Its Responsiveness to CFTR Modulators" *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 31;24(7):6576.
- Tomati V, Costa S, Capurro V et al. "Rescue by elexacaf tor-tezacaf tor-ivacaftor of the G1244E cystic fibrosis mutation's stability and gating defects are dependent on cell background", *J Cyst Fibros.* 2023 May;22(3):525-537.

- Borgo C, D'Amore C, Capurro V et al. "SUMOylation Inhibition Enhances Protein Transcription under CMV Promoter: A Lesson from a Study with the F508del-CFTR Mutant" *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 15;25(4):2302.
- Tomati V, Costa S, Capurro V et al. "Rescue by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor of the G1244E cystic fibrosis mutation's stability and gating defects are dependent on cell background" *J Cyst Fibros.* 2023 May;22(3):525-537.

### 3. MICROBIOLOGY

#### Terapie dell'infezione broncopolmonare

FFC Project#11/2014 "**Development and preclinical testing of a novel antimicrobial peptide to treat Pseudomonas aeruginosa-induced lung infections**" Maria Luisa Mangoni (Dip. di Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma)

- Cappiello F. et al. "Esculentin-1a-Derived Peptides Promote Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* Internalized in Bronchial Cells of Cystic Fibrosis Patients and Lung Cell Migration: Biochemical Properties and a Plausible Mode of Action" *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Sep 26
- Ghosh A. et al. "NMR structure and binding of esculentin-1a (1–21)NH<sub>2</sub> and its diastereomer to lipopolysaccharide: Correlation with biological functions" *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1858(4):800-12
- Chen C, Mangoni ML, Di YP "In vivo therapeutic efficacy of frog skin-derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pulmonary infection" *Sci. Rep.* 2017 Aug 17;7(1):8548
- Loffredo MA, Ghoshb A, Harmouchec N et al "1c: Correlation with their antipseudomonal and cytotoxic activity" *BBA – Biomembranes* 1859 (2017) 2327–2339
- Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML "A Novel *In vitro* Wound Healing Assay to Evaluate Cell Migration" *Journal of Visualized Experiments* 2018 Mar 17;(133)

FFC Project#12/2014 "**Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application**" Eugenio Notomista (Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli "Federico II")

- D'Angelo I. et al. "Overcoming barriers in *Pseudomonas aeruginosa* lung infections: Engineered nanoparticles for local delivery of a cationic antimicrobial peptide" *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015 Aug 22;135:717-725
- Oliva R, Chino M, Pane K et al "Exploring the role of unnatural amino acids in antimicrobial peptides" *SCI REP* 2018 Jun 11;8(1):8888.
- Oliva R, Chino M, Lombardi A et al. "Similarities and differences for membranotropic action of three unnatural antimicrobial peptides" *Journal of Peptide Science* 2020 Aug;26(8):e3270

FFC Project#14/2014 "**Development of BMAP18 as a peptide drug in the lung bacterial infections: a study to improve its effectiveness in the CF pulmonary environment**" Marco Scocchi (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste)

- Mardirossian M, Pompilio A, Degasperi M et al. "D-BMAP18 Antimicrobial Peptide Is Active *In vitro*, Resists to Pulmonary Proteases but Loses Its Activity in a Murine Model of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection" *Frontiers in Chemistry* 2017 Jun 19;5:40
- Mardirossian M, Pompilio A, Crocetta V et al. "In vitro and in vivo evaluation of BMAP-derived peptides for the treatment of cystic fibrosis-related pulmonary infections" *Amino Acids*, 2016 Sep;48(9):2253-60

FFC Project#18/2014 "**GSH inhalation therapies in CF: how useful, how safe? Set-up of a CF murine model for monitoring of inflammation in vivo and assessment of convenient alternatives**" Alessandro Corti (Dip. di Ricerca Traslationale NTMS Lab. Patologia Generale, Università di Pisa)

- Corti A, Griese M, Hector A et al. "Increasing sputum levels of gamma-glutamyltransferase may identify cystic fibrosis patients who do not benefit from inhaled glutathione", *Journal of Cystic Fibrosis*, 2017, May;16(3):342-345
- Corti A, Pompella A, Bergamini G et al. "Glutathione inhalation treatments in cystic fibrosis: the interference of airway  $\gamma$ -Glutamyltransferase" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014 Jan 15;189(2):233-4
- Corti A, Belcastro E, Dominici S et al. "The dark side of gamma-glutamyltransferase (GGT): Pathogenic effects of an 'antioxidant' enzyme" *Free Radical Biology and Medicine* 2020 Sep 9;160:807-819
- Piaggi S, Marchi E, Carnicelli V et al. "Airways glutathione S-transferase omega-1 and its A140D polymorphism are associated with severity of inflammation and respiratory dysfunction in cystic fibrosis" *J Cyst Fibros*. 2021 Feb 11;S1569-1993(21)00033-3.

*FFC Project#19/2014 "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent inflammasome activation exacerbates the P. aeruginosa-driven inflammatory response" Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)*

- Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S et al. "Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications" *Antioxidant & redox signaling* 22 (12), 995-1019

*FFC Project#21/2014 "Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis" Antonio Recchiuti (Dip. di Scienza Clinica e Sperimentale e Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento-CeSI, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara)*

- Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A et al. "Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection" *Mucosal Immunology* 2017 Apr 19

*FFC Project#23/2014 "Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in cystic fibrosis" Mario Romano (Dip. di Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. di Medicina Molecolare, Università G. D'Annunzio, Chieti-Pescara)*

- Plebani R, Tripaldi R, Lanuti P et al. "Establishment and long-term culture of human cystic fibrosis endothelial cells" *Laboratory Investigation* 2017 Jul 31
- Totani L, Plebani R, Piccoli A et al. "Mechanisms of endothelial cell dysfunction in cystic fibrosis" *Biochimica et Biophysica Acta* 2017 Aug 25

*FFC Project#24/2014 "The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies" Sandro Sonnino (Dip. di Biochimica Medica e Medicina Traslationale, Università di Milano)*

- Aureli M. et al. "Unravelling the role of sphingolipids in cystic fibrosis lung disease" *Chem Phys Lipids* 2016 Aug 31;200:94-103

*FFC Project#10/2015 "A CF, IL-8 transgenic mouse model for the in vivo, long-term monitoring of the antiinflammatory role of metallo-protease inhibitors and antibiotics with mechanisms of action similar to that of azithromycin" Maria M. Lledò (Dipartimento di Patologia e Diagnostica, sezione di Microbiologia Università di Verona)*

- Sandri A, Ortombina A, Boschi F et al. "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors reduces lung inflammation in CF mice" *Virulence* 2018;9(1):1008-1018.

*FFC Project#12/2015 "Anti-inflammatory and anti-bacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models" Francesca Berlutti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive Università La Sapienza, Roma)*

- Valenti P, Frioni A, Rossi A et al. "Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" *Biochemistry and Cell Biology* 2017 Feb;95(1):41-47
- Cutone A, Lepanto MS, Rosa L et al. "Aerosolized bovine lactoferrin counteracts infections, inflammation and iron dysbalance in a cystic fibrosis mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection" *International Journal of Molecular Science* 2019, 20(9), 2128

*FFC Project#13/2015 "Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by Pseudomonas aeruginosa: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials" Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze - Università degli Studi di Milano)*

- Ferrara S, Falcone M, Macchi R et al. "The PAPI-1 pathogenicity island-encoded small RNA PesA influences *Pseudomonas aeruginosa* virulence and modulates pyocin S3 production" *PLoS ONE* 2017 Jun 30;12(6):e0180386
- Silvia F, Carrubba R, Santoro S et al. "The Small RNA ErsA Impacts the Anaerobic Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* Through Post-Transcriptional Modulation of the Master Regulator Anr" *Front Microbiol*. 2021 Aug 20
- Ferrara S, Rossi A, Ranucci S et al. "The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Airway Infections" *mSphere* 2020 Oct 14;5(5):e00909-20

*FFC Project#14/2015 "Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy" Anna Maria Bevivino (Unità Tecnica per lo Sviluppo e Innovazione del Sistema Agroindustriale ENEA Agenzia Nazionale Italiana per le Nuove Tecnologie, Energie e Sviluppo Economico Sostenibile, Laboratorio di Microbiologia, Centro Ricerche Casaccia, Roma), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università di Firenze); Giovanni Taccetti (Dip. di Pediatria, Centro fibrosi cistica, Firenze), Ersilia Vita Fiscarelli (Ospedale dei Bambini, Istituto di Ricerca Bambino Gesù, Lab. di Microbiologia per fibrosi cistica), Alessandra De Alessandri (Centro Fibrosi Cistica, Dip. di Scienze Pediatriche, Pneumologia e Allergologia Istituto G. Gaslini, Genova)*

- Bacci G, Mengoni A, Fiscarelli E et al. "A Different Microbiome Gene Repertoire in the Airways of Cystic Fibrosis Patients with Severe Lung Disease" *International Journal of Molecular Sciences* 2017 Jul 29;18(8).
- Bevivino A, Bacci G, Drevinek P et al. "Deciphering the Ecology of Cystic Fibrosis Bacterial Communities: Towards Systems-Level Integration" *Trends Mol Med* 2019

*FFC Project#16/2015 "Development of metallo-enzyme inhibitors to overcome P. aeruginosa antibiotic-resistance in cystic fibrosis patients" Sandra Gemma (Dipartimento di Biotecnologia, Chimica e Farmacia Università di Siena), Jean-Denis Docquier (Dip. di Biotecnologia Medica Università di Siena)*

- Brindisi M. et al. "Targeting clinically-relevant metallo- $\beta$ -lactamases: from high-throughput docking to broad-spectrum inhibitors", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*

*FFC Project#19/2015 "Inhalable formulations of new molecules effective against Burkholderia cenocepacia: from in vitro to in vivo applications" Giovanna Riccardi (Laboratorio di Microbiologia Molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Pavia), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia Università degli Studi Federico II, Napoli)*

- Scoffone VC. et al. "Discovery of new diketopiperazines inhibiting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing in vitro and in vivo" *Sci Rep*. 2016 Sep 1;6:32487
- Israyilova A, Buroni S, Forneris F et al. "Biochemical Characterization of Glutamate Racemase-A New Candidate Drug Target against *Burkholderia cenocepacia* Infections" *PLoS ONE* 2016 Nov 29;11(11)



- Scoffone VC, Chiarelli LR, Trespido G et al. “*Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches” *Frontiers in Microbiology* 2017 Aug 22;8:1592
- Pellosi Silva D, d'Angelo I, Maiolino S et al “*In vitro/in vivo* investigation on the potential of Pluronic® mixed micelles for pulmonary drug *delivery*” *European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics* 2018 Jun 8
- Hogan AM, Scoffone VC, Makarov V et al. “Competitive Fitness of Essential Gene *Knockdowns* Reveals a Broad-Spectrum Antibacterial Inhibitor of the Cell Division Protein FtsZ.” *Antimicrob Agents Chemother*, 2018 Nov 26;62(12).
- Costabile G, Provenzano R, Azzalin A et al. “PEGylated mucus-penetrating nanocrystals for lung *delivery* of a new FtsZ inhibitor against *Burkholderia cenocepacia* infection” *Nanomedicine* 2020 Jan;23:102113

**FFC Project#21/2015 “Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection”** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia Università di Roma Tre, Roma), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze Università Bicocca, Milano), Raffaella Sorrentino (Dip. di Farmacia Università Federico II, Napoli)

- Hijazi S, Visca P, Frangipani E “Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes” *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017 Jan 26;7:12
- Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A et al “The ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*” *J Bacteriol* 2017 Aug 28
- Porcaro F, Bonchi C, Ugolini A et al “Understanding the biomimetic properties of gallium in *Pseudomonas aeruginosa*: an XAS and XPS study” *Dalton Trans* 2017 May 30;46(21):7082-7091
- Costabile G, d'Angelo I, d'Emmanuele R et al “Development of inhalable hyaluronan/mannitol composite dry powders for flucytosine repositioning in local therapy of lung infections” *J Control Release*, 2016 Sep 28;238:80-91

**FFC Project#14/2016 “Role of small RNA-based regulatory systems in cystic fibrosis airways infection by *Pseudomonas aeruginosa*: a new frontier in the identification of molecular targets for novel antibacterials”** Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

- Falcone M, Ferrara S, Rossi E et al. “The Small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to Biofilm Development and Motility through Post-transcriptional Modulation of AmrZ” *Frontiers in Microbiology* 2018 Feb 15;9:238
- Carloni S, Macchi R, Sattin S et al. “The small RNA ReaL: a novel regulatory element embedded in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing networks” *Environmental Microbiology* 2017 Oct;19(10):4220-4237
- Ferrara S, Rossi A, Ranucci S et al. “The Small RNA ErsA Plays a Role in the Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity in Airway Infections” *mSphere*, September/October 2020 Volume 5 Issue 5 e00909-20

**FFC Project#15/2016 “Cystic fibrosis modifier genes related to *Pseudomonas aeruginosa* lung disease”** Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Cigana C, Sipione B et al. “The impact of host genetic background in the *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections” *Mammalian Genome* 2018 Jun 12.
- Bragonzi A, Horati H, Kerrigan L et al. “Inflammation and host-pathogen interaction: cause and consequence in cystic fibrosis lung disease” *Journal of Cystic Fibrosis*, 2018 Mar;17(2S):S40-S45.

**FFC Project#16/2016 “Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients”** Daniela Erica Ghisotti (Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano)

- Forti F, Roach DR, Cafora M et al. “Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models” *Antimicrob Agents Chemother* 2018 Mar 19

**FFC Project#17/2016 “Development of inhalable particles for optimal delivery of a potent antimicrobial molecule in *Pseudomonas aeruginosa* infected lungs”** Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologia Medica, Università di Siena)

- Puglia M, Landi C, Gagliardi A et al. “The proteome speciation of an immortalized cystic fibrosis cell line: New perspectives on the pathophysiology of the disease” *Journal of Proteomics* 2018 Jan 6;170:28-42
- Brunetti J, Roscia G, Lampronti I et al. “Immunomodulatory and anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* of novel antimicrobial candidate” *Journal of Biological Chemistry*, 2016 Dec 2;291(49):25742-25748
- Quercini L, Brunetti J, Riolo G et al. “An Antimicrobial Molecule Mitigates Signs of Sepsis *in vivo* and Eradicates Infections From Lung Tissue” *FASEB Journal* 2020 Jan;34(1):192-207.

**FFC Project#4/2017 “Phenotyping new genetically-diverse mouse models mirroring the complexity of the cystic fibrosis pathology”** Nicola Ivan Lorè (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Ospedale San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Sipione B, He G et al. “Collaborative cross mice yield modifiers for *Pseudomonas aeruginosa* infection in human lung disease” *Genome Research*, submitted
- Sipione B, Lorè NI, Rossi G et al. “Phenotypic and genotypic characterisation of a novel mouse model of F508del-CFTR in genetically diverse collaborative cross” 44<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 9–12 June 2021, *J Cystic Fibrosis*, Vol. 20 Supp. 1 (2021)

**FFC Project#13/2017 “Induction of viable but non-culturable forms, possibly responsible for treatment failure, in vitro biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Role of antibiotics and antibiotic concentrations”** Francesca Biavasco (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche)

- Mangiaterra G, Amiri M, Di Cesare A et al. “Detection of viable but non-culturable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis by qPCR: a validation study” *BMC Infection Disease*, 2018 Dec 27;18(1):701
- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiasicca S et al. “Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in an *In vitro* Biofilm Model” *Antibiotics*, 2020 Jul 10;9(7):399

**FFC Project#14/2017 “Preclinical study of a host-directed therapy based on Metformin and bioactive liposomes for the control of multidrug resistant *P. aeruginosa* infection”** Maurizio Fraziano (Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata)

- Nisini R, Poerio N, Mariotti S et al. “The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of Infectious Diseases” *Frontiers in Immunology* 2018 Feb 5;9:155
- Poerio N, De Santis F, Rossi A et al. “Liposomes loaded with phosphatidylinositol 5phosphate improve the antimicrobial response to *P. aeruginosa* in impaired macrophages from Cystic Fibrosis patients and limit airway inflammatory response” *Frontiers in Immunology*, 2020; 11: 532225

**FFC Project#15/2017 “Frog skin-derived peptides for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection and bronchial epithelial repair: advanced *in vitro* and *in vivo* characterization and development of polymeric nanoparticles for lung delivery”** Maria Luisa Mangoni (Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università La Sapienza)

- Casciaro B, d'Angelo I, Zhang X et al. “Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas ae-*



*ruginosa* Lung Infection: *in vitro* and *in vivo* Studies” Biomacromolecules, 2019 Apr 23

- Casciaro B, Cappiello F, Loffredo MR et al. “The Potential of Frog Skin Peptides for Anti-Infective Therapies: the Case of Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub>” *Curr Med Chem* 2019, Jul 21
- Casciaro B, Lin Q, Afonin S et al. “Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and expression of virulence genes by selective epimerization in the peptide Esculentin-1a(1-21)NH<sub>2</sub>” *FEBS J* 2019 Oct;286(19):3874-3891
- Cappiello F, Ranieri D, Carnicelli V et al. “Bronchial epithelium repair by Esculentin-1a-derived antimicrobial peptides: involvement of metalloprotease-9 and interleukin-8, and evaluation of peptides’ immunogenicity” *SCI REP* 2019 Dec 12;9(1):18988
- Casciaro B, Cappiello F, Verrusio W et al. “Antimicrobial Peptides and their Multiple Effects at Sub-Inhibitory Concentrations” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2020;20(14):1264-1273.
- Casciaro B, Ghirga F, Quaglio D et al. “Inorganic Gold and Polymeric Poly(Lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Novel Strategies to Ameliorate the Biological Properties of Antimicrobial Peptides” *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(4):429-438

**FFC Project#16/2017 “Pre-clinical effectiveness of three human cryptic antibiofilm peptides (GVF27, HVA36 and IMY47): efficacy against lung pathogens and studies in animals”** Eliodoro Pizzo (Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II)

- Pane K, Cafaro V, Avitabile A et al. “Identification of novel cryptic multifunctional antimicrobial peptides from the human stomach enabled by a computational-experimental platform” *ACS Synthetic Biology* 2018 Sep 21;7(9):2105-2115
- Bosso A, Di Maro A, Cafaro V et al. “Enzymes as a Reservoir of Host Defence Peptides” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2020;20(14):1310-1323
- Gaglione R, Pizzo E, Notomista E et al. “Host Defence Cryptides from Human Apolipoproteins: Applications in Medicinal Chemistry” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2020;20(14):1324-1337
- Zanfardino A, Bosso A, Gallo G et al. “Human apolipoprotein E as a reservoir of cryptic bioactive peptides: The case of ApoE 133-167” *Journal of Peptide Science* 2018 Jul;24(7):e3095
- Gaglione R, Cesaro A, Dell’Olmo E et al. “Cryptides Identified in Human Apolipoprotein B as New Weapons to Fight Antibiotic Resistance in Cystic Fibrosis Disease” *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 17;21(6):2049.

**FFC Project#17/2017 “Identification of new efflux pumps inhibitors able to contrast Nontuberculous Mycobacterial infections in cystic fibrosis patients”** Stefano Sabatini (Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia)

- Felicietti T, Machado D, Cannalire R et al. “Modifications on C6 and C7 positions of 3-phenylquinolone efflux pump inhibitors led to potent and safe anti-Mycobacterial treatment adjuvants.” *ACS Infectious Diseases* 2019 Mar 25

**FFC Project#18/2017 “Exploiting the potential of gallium for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection”** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre), Francesco Peri (Dip. di Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca), Raffella Sorrentino (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- Hijazi S, Visaggio D, Pirolo M et al “Antimicrobial activity of Gallium compounds on ESKAPE pathogens” *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018 Sep 10;8:316

**FFC Project#19/2017 “A longitudinal metagenomic analysis to uncover microbial signatures of CF lung disease: unravelling host-microbial community interactions in humans and animal models”** Annamaria Bevivino (ENEA, Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Lab. Sostenibilità, Qualità e Sicurezza delle Produzioni Agroalimentari, Centro Ricerche Casaccia, Roma), Alessio Mengoni (Dip. di Biologia, Università degli Studi di Firenze), Nicola Segata (CIBIO, Laboratorio di Metagenomica computazionale, Università di Trento)

- Bacci G, Taccetti G, Dolce D et al. “Untargeted Metagenomic Investigation of the Airway Microbiome of Cystic Fibrosis Patients with Moderate-Severe Lung Disease” *Microorganism* 2020 Jul 4;8(7):1003.
- Bacci G, Rossi A, Armanini F, et al. “Lung and Gut Microbiota Changes Associated to *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mouse Models of Cystic Fibrosis” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12169.

**FFC Project#20/2017 “Establishment of animal model to investigate pathogenesis of infection by *Mycobacterium abscessus* complex members in cystic fibrosis patients”** Enrico Tortoli (Unità Batteri Patogeni Emergenti, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele, Milano)

- Riva C, Tortoli E, Cugnata F et al. “A New Model of Chronic *Mycobacterium abscessus* Lung Infection in Immunocompetent Mice” *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Sep; 21(18): 6590

**FFC Project#22/2017 “In vivo validation of phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections using the new Zebrafish (*Danio rerio*) animal model”** Anna Silvia Pistocchi (Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)

- Cafora M, Deflorian G, Forti F et al. “Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model” *SCI REP*, 2019 Feb 6;9(1):1527
- Brix A, Cafora M, Aureli M et al. “Animal Models to Translate Phage Therapy to Human Medicine” *International Journal of Molecular Sciences* 2020 May 25;21(10):3715
- Cafora M, Foti F, Briani F et al. “Phage Therapy Application to Counteract *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Zebrafish Embryos” *Journal of Visualized Experiments* 2020 May 12;(159)

**FFC Project#23/2017 “Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation: therapeutic potential of hybrid lipid/polymer nanoparticles”** Francesca Ungaro (Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II), Olivia Monica Merkel (Dept. Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München)

- Costabile G, Baldassi D, Müller C et al., “Antibiotic-loaded nanoparticles for the treatment of intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: In vitro and in vivo efficacy of a novel antibiotic” *J Control Release.* 2024 Aug 22;S0168-3659(24)00577-7.

**FFC Project#14/2018 “Ex vivo study on Type I and III interferon response and virus-bacteria interactions in cystic fibrosis patients: a new approach to try to develop alternative therapeutic strategy”** Guido Antonelli (Dip. Medicina Molecolare, Lab. Virologia, La Sapienza Roma; Unità di Microbiologia e Virologia, Policlinico Umberto I)

- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. “Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients Affected by Cystic Fibrosis” *Viruses*, 2019 Jun 21;11(6)
- Antonelli G “No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy” *J Cyst Fibros* 2020 Sep; 19(5): 837-838
- Prezioso C, Di Lella FM, Rodio DM et al. “Merkel Cell Polyomavirus DNA Detection in Respiratory Samples: Study of a Cohort of Patients affected by Cystic Fibrosis” *Viruses* 2019 Jun 21;11(6):571
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. “Differential toll like receptor expression in cystic fibrosis patients’ airways during rhinovirus infection *Journal of Infection*” 2020 Nov;81(5):726-735
- Scagnolari C, Bitossi C, Frasca F et al. “No detection of SARS-CoV-2 in cystic fibrosis patients at the Regional (Lazio) Reference Center for CF in Italy” *J Cyst Fibros* 2020 Sep;19(5):837-838
- Bitossi C, Frasca F, Viscido A et al. “SARS-CoV-2 Entry Genes Expression in Relation with Interferon Response in Cystic Fibrosis Patients” *Microorganisms*, 2021 Jan 3;9(1):93.

- Bitossi C, Viscido A, Prezioso C et al. “High prevalence of Merkel cell polyomavirus is associated with dysregulation in transcript levels of TLR9 and type I IFNs in a large cohort of CF patients from the Italian (Lazio) reference center for cystic fibrosis” *Microb Pathog.* 2022 Aug;169:105644.

**FFC Project#17/2018 “Drug repurposing for antivirulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*”** Livia Leoni (Università Roma Tre, Dip. Scienze, Lab. Microbiologie dei microrganismi)

- D’Angelo F, Baldelli V, Halliday N et al. “Identification of FDA-Approved Drugs as Antivirulence Agents Targeting the pqs Quorum-Sensing System of *Pseudomonas aeruginosa*” *Antimicrob Agents Chemother* 2019 Oct 24;62(11).
- Mellini M, Di Muzio E, D’Angelo F et al. “*In silico* Selection and Experimental Validation of FDA-Approved Drugs as Anti-quorum Sensing Agents” *Frontiers in Microbiology* 2019 Oct 10;10:2355
- Baldelli V, D’Angelo F, Pavoncello V et al. “Identification of FDA-approved antivirulence drugs targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing effector protein PqsE” *Virulence* 2020 Dec;11(1):652-668
- Collalto D, Giallonardi G, Fortuna A et al. “*In vitro* Activity of Antivirulence Drugs Targeting the las or pqs Quorum Sensing Against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* Isolates” *Front. Microbiol.* 2022, 13:845231

**FFC Project#18/2018 “In vitro and in vivo efficacy of an antimicrobial and antibiofilm designed peptidomimetic against CF lung pathogens”** Eugenio Notomista (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia), Eliodoro Pizzo (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Biologia)

- Siepi M, Donadio G, Dardano P et al. “Denatured lysozyme-coated carbon nanotubes: a versatile biohybrid material” *SCI REP* 2019 Nov 12;9(1):16643
- Siepi M, Oliva R, Masino A et al. “Environment-Sensitive Fluorescent Labelling of Peptides by Luciferin Analogues” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 13312.
- Cafaro V, Bosso A, Di Nardo I et al., “The Antimicrobial, Anti-biofilm and Anti-Inflammatory Activities of P13#1, a Cathelicidin-like Achiral Peptoid”, *Pharmaceuticals* 2023, 16(10), 1386.

**FFC Project#19/2018 “New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other Nontuberculous *Mycobacteria*”** Maria Rosalia Pasca (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia Lazzaro Spallanzani, Lab. Microbiologia molecolare)

- Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR et al. “*Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients” *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 22;20(23):5868.
- Chiarelli LR, Degiacomi G, Egorova A et al. “Nitric oxide-releasing compounds for the treatment of lung infections” *Drug Discov Today.* 2021 Feb;26(2):542-550.

**FFC Project#20/2018 “Biocompatible and inhalable antimicrobial-loaded nanoparticles for the counteraction of biofilm formation and antibiotic resistance: towards a potential new therapy for CF related infections”** Maurizio Sanguinetti (Divisione Microbiologia clinica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma), Alberto Vitali (Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR-ICRM); Michele Iafisco (Istituto di Scienza e Tecnologia dei materiali ceramici ISTECCNR, Faenza), Daniele Catalucci (Istituto di Genetica e Ricerca biomedica -IRGB, Milano)

- Velino C, Carella F, Adamiano A et al. “Nanomedicine Approaches for the Pulmonary Treatment of Cystic Fibrosis” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019 Dec 17;7:406
- Bugli F, Martini C, Di Vito M et al. “Antimicrobial peptides for tackling cystic fibrosis related bacterial infections: A review” *Microbiological Research* 263 (2022) 127152
- Iafisco M, Carella F, Degli Esposti L et al. “Biocompatible antimicrobial colistin loaded calcium phosphate nanoparticles for the counteraction of biofilm formation in cystic fibrosis related infections” *J Inorg Biochem.* 2022 May;230:111751.

**FFC Project#15/2019 “Pharmacological inhibition of colistin resistance in gram-negative cystic fibrosis pathogens”** Fiorenza Ascenzioni (Dip. Biologia e Biotecnologie C. Darwin, Università La Sapienza, Roma)

- Ghirga F, Stefanelli R, Cavinato L et al. “A novel colistin adjuvant identified by virtual screening for ArnT inhibitors” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020 Sep 1;75(9):2564-2572
- Quaglio D, Mangoni ML, Stefanelli R et al. “ent-Beyerane Diterpenes as a Key Platform for the Development of ArnT-Mediated Colistin Resistance Inhibitors” *Journal of Organical Chemistry* 2020 Aug 21;85(16):10891-10901

**FFC Project#16/2019 “Fighting *Pseudomonas aeruginosa* persisters in cystic fibrosis pulmonary infections: improved detection and therapeutic strategies”** Francesca Biavasco (Dip. Scienze Ambientali e della Vita, Università Politecnica delle Marche, Ancona)

- Mangiaterra G, Cedraro N, Vaiasicca S et al. “Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in an *In vitro* Biofilm Model” *Antibiotics (Basel).* 2020 Jul 10;9(7):399.
- Mangiaterra G, Amiri M, Cedraro N et al. “*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Lung Infection in Cystic Fibrosis: The Challenge of Persisters” *IntechOpen, Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation, Infections and Treatments*, June 9<sup>th</sup> 2021
- Mangiaterra G, Carotti E, Vaiasicca S et al. “Contribution of Drugs Interfering with Protein and Cell Wall Synthesis to the Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: An *In vitro* Model” *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 5;22(4):1628.
- Mangiaterra G, Cedraro N, Salvatore Vaiasicca S et al., Involvement of Acquired Tobramycin Resistance in the Shift to the Viable but Non-Culturable State in *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 18;24(14):11618.

**FFC Project#18/2019 “Investigating *Achromobacter xylosoxidans* pathogenicity and clinical role in CF lung infection”** Maria M. Lleò (Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona)

- Veschetti L, Boaretti M, Saitta GM et al. “*Achromobacter* spp. prevalence and adaptation in cystic fibrosis lung infection” *Microbiological Research* 263 (2022) 127140
- Sandri A, Veschetti L, Saitta GM et al. “*Achromobacter* spp. Adaptation in Cystic Fibrosis Infection and Candidate Biomarkers of Antimicrobial Resistance” *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9265.
- Sandri A, Saitta GM, Veschetti L et al. “*In Vivo* Inflammation Caused by *Achromobacter* spp. Cystic Fibrosis Clinical Isolates Exhibiting Different Pathogenic Characteristics” *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 18;24(8):7432.

**FFC Project#19/2019 “Gallium as an antibacterial agent in cystic fibrosis: animal studies for the delivery of inhalable formulations to the clinic”** Paolo Visca (Dipartimento di Scienze, Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Università Roma Tre), Raffella Sorrentino (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

- Visaggio D, Frangipani E, Hijazi S et al. “Variable Susceptibility to Gallium Compounds of Major Cystic Fibrosis Pathogens” *ACS Infect Dis.* 2022; 8:78-85.
- Mitidieri E, Visaggio D, Frangipani E et al. “Intra-tracheal administration increases gallium availability in lung: implications for antibacterial chemotherapy” *Pharmacol Res.* 2021; 170:105698
- Costabile G, Mitidieri E, Visaggio D et al. “Boosting lung accumulation of gallium with inhalable nano-embedded microparticles for the treatment of bacterial pneumonia” *Int J Pharm.* 2022 Dec 15;629:122400.

**FFC Project#21/2019 “Preclinical study of a combined host-pathogen directed approach based on bioactive liposomes and bacteriophages against *Mycobacterium abscessus* infection”** Maurizio Fraziano (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)



- Nisini R, Oggioni MR, Rossolini GM “Editorial: Exploiting Novel Combined Host and Pathogen-Directed Therapies for Combating Bacterial Multidrug Resistance” *Frontiers in Immunology*, Front Immunol. 2020 Nov 4;11:616486.
  - Rinaldi F, Hanieh P, Sennato S et al. “Rifampicin–Liposomes for *Mycobacterium abscessus* Infection Treatment: Intracellular Uptake and Antibacterial Activity Evaluation” *Pharmaceutics*. 2021 Jul 13;13(7):1070.
  - Grassi G, Vanini V, De Santis F et al. “PMN-MDSC Frequency Discriminates Active Versus Latent Tuberculosis and Could Play a Role in Counteracting the Immune-Mediated Lung Damage in Active Disease” *Front Immunol*. 2021 Apr 26;12:594376.
  - Poerio N, Riva C, Olimpieri T et al. “Combined Host and Pathogen-Directed Therapy for the Control of *Mycobacterium abscessus* Infection” *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0254621.
  - Poerio N, Olimpieri T, De Angelis LH et al. “Fighting MDRK-lebsiella pneumoniae Infections by a Combined Host and Pathogen-Directed Therapeutic Approach” *Front Immunol*. 2022 Feb 14;13:835417.
  - De Santis F, Borrajo Lopez A, Virtuoso S et al. “Phosphatidylcholine Liposomes Down-Modulate CD4 Expression Reducing HIV Entry in Human Type-1 Macrophages” *Front Immunol*. 2022 May 19;13:830788.
  - Cafora M, Poerio N, Forti F et al. “Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models” *Front Microbiol*. 2022 Sep 15:13:979610.
- FFC Project#11/2020 “Disrupting *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing signalling in cystic fibrosis patients as a new frontier for antibacterial therapy” Paola Brun (Università degli Studi di Padova, Dip. di Medicina Molecolare)**
- Bernabè G, Marzaro G, Di Pietra G et al. “A novel phenolic derivative inhibits AHL-dependent quorum sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*” *Front. Pharmacol*. 13:996871.
- FFC Project#13/2020 “Can old and new sweet glycomimetics act as antibacterial and antibiofilm agents in the treatment of CF lung disease infections?” Annalisa Guaragna (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche), Eliana De Gregorio (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche)**
- Esposito A, Rossi A, Stabile M et al. “Assessing the potential of N-Butyl-L-deoxyjirimycin (L-NBDNJ) in models of cystic fibrosis as a promising antibacterial agent” *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2024 May 10;7(6):1807-1822.
- FFC Project#14/2020 “New weapons against *Mycobacterium abscessus* and other Nontuberculous Mycobacteria” Maria Rosalia Pasca (Università degli Studi di Pavia, Dip. di Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Lab. Microbiologia molecolare), Vladim Makarov (Federal Research Center, Moscow), Santiago Ramón-García (University of Zaragoza), Enrico Tortoli (Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive HSR, Milano)**
- Degiacomi G, Chiarelli LR, Recchia R et al. “The Antimalarial Mefloquine Shows Activity against *Mycobacterium abscessus*, Inhibiting Mycolic Acid Metabolism” *Int J Mol Sci*. 2021 Aug; 22(16): 8533.
  - Egorova A, Jackson M, Gavrilyuk V et al. “Pipeline of anti-*Mycobacterium abscessus* small molecules: Repurposable drugs and promising novel chemical entities” *Med Res Rev*. 2021 Jul;41(4):2350-2387
- FFC Project#15/2020 “Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-direct approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis” Mauro Piacentini (Università di Roma Tor Vergata, Dip. di Biologia), Valeria Raia (Università degli Studi di Napoli, Dip. di Scienze Mediche Traslacionali)**
- Occhigrossi L, D’Eletto M, Barlev N et al. “The Multifaceted Role of HSF1 in Pathophysiology: Focus on Its Interplay with TG2” *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 14;22(12):6366
  - Occhigrossi L, Rossin R, D’Eletto M et al. “Transglutaminase 2 Regulates Innate Immunity by Modulating the STING/TBK1/IRF3 Axis” *J Immunol*. 2021 May 15;206(10):2420-2429.
  - Rossin F, Costa R, Bordini M et al. “Transglutaminase Type 2 regulates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in vertebrates” *Cell Death Dis*. 2021 Mar 5;12(3):249.
  - Alonzi T, Aiello A, Petrone L et al. “Cysteamine with In vitro Antiviral Activity and Immunomodulatory Effects Has the Potential to Be a Repurposing Drug Candidate for COVID-19 Therapy” *Cells*, 2022 11:52.
  - Alonzi T, Aiello A, Repele F et al. “Cysteamine exerts in vitro antiviral activity against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants” *Cell Death Discov*. 8:288.
  - Occhigrossi L, D’Eletto M, Vecchio A et al. “Transglutaminase type 2-dependent crosslinking of IRF3 in dying melanoma cells. 2022, *Cell Death Discov*. 8:498.
  - Occhigrossi L, Rossin F, Vilella VR et al. “The STING/TBK1/IRF3/IFN type I pathway is defective in cystic fibrosis” *Front Immunol*. 2023 Feb 27;14:1093212.
- FFC Project#13/2021 “Probiotics: an emerging strategy to fight bacterial pulmonary infections in CF” Giovanna Batoni (Dipartimento di Ricerca Traslacionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)**
- Kaya E, Batoni G, Di Luca M et al. “Planktonic and Biofilm-Associated *Pseudomonas aeruginosa* and Staphylococcus epidermidis Elicit Differential Human Peripheral Blood Cell Responses” *Microorganisms*. 2021 Aug 31;9(9):1846.
  - Batoni G, Maisetta G, Kaya E et al. “Lung-Directed Bacteriotherapy in Cystic Fibrosis: Could It Be an Option?” *Antibiotics* 2022, 11, 326.
  - Pompilio A, Kaya E, Lupetti V et al. “Cell-free supernatants from *Lactobacillus* strains exert antibacterial, antibiofilm, and antiviral activity against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients” *Microbes Infect*. 2024 Jan 16:105301.
  - Batoni G, Kaya E, Catelli E et al. “*Lactobacillus* Probiotic Strains Differ in Their Ability to Adhere to Human Lung Epithelial Cells and to Prevent Adhesion of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Lung” *Microorganisms*. 2023 Jun 29;11(7):1707.
  - Batoni G, Catelli E, Kaya E et al. “Antibacterial and Antibiofilm Effects of Lactobacilli Strains against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* under Conditions Relevant to Cystic Fibrosis” *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jul 7;12(7):1158.
- FFC Project#14/2021 “Targeting small RNA-mediated regulation of virulence and antibiotic resistance to develop non-traditional therapeutic options against *Pseudomonas aeruginosa*” Giovanni Bertoni (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)**
- Santoro S, Paganin C, Gilardi S et al. “Multifaceted Interplay between Hfq and the Small RNA GssA in *Pseudomonas aeruginosa*” *mBio*. 2023 Feb 28;14(1):e0241822.
  - Ferrara S, Brignoli T and Bertoni G “Little reason to call them small noncoding RNAs” *Front. Microbiol.*, 29 June 2023, Sec. Microbial Physiology and Metabolism
- FFC Project#15/2021 “Tackling phage resistance to increase the robustness of phage therapy for curing *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis (PhaCyf)”, Federica Briani (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)**
- Lokareddy RK, Hou CD, Doll SG, et al. “Terminase Subunits from the *Pseudomonas*-Phage E217”, *J. Mol. Biol*. 434(20):167799
  - Cafora M, Poerio N, Forti F et al. “Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models”, *Front. Microbiol*. 13
  - Li F, Hou CD, Lokareddy RK et al., “High-resolution cryo-EM structure of the *Pseudomonas* bacteriophage E217”, *Nat Commun*. 2023 Jul 8;14(1):4052.
  - Forti F, Bertoli C, Cafora M et al. “Identification and impact on *Pseudomonas aeruginosa* virulence of mutations conferring resistance to a phage cocktail for phage therapy” *Microbiol Spectr*. 2023 Dec 12;11(6):e0147723.



FFC Project#16/2021 “**Linking elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor to infections in cystic fibrosis lung disease**” Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano), Daniela Girelli (Lab. Microbiologia FC, Fondazione IRCCS Ca’ Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano); Ersilia Vita Fiscarelli (Lab. Microbiologia FC, Ospedale Bambino Gesù, Roma)

- Cigana C, Giannella R, Colavolpe A et al., “Mutual Effects of Single and Combined CFTR Modulators and Bacterial Infection in Cystic Fibrosis”, *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0408322.

FFC Project#17/2021 “**New drug combinations against non-tuberculous Mycobacteria infections in cystic fibrosis**” Lanfranco Fattorini (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Malattie infettive, Roma)

- Lanni A, Borroni E, Iacobino A et al “Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions” *Microorganisms.* 2022 Jul 14;10(7):1421

FFC Project#5/2022 “**Nontuberculous Mycobacteria in cystic fibrosis: scouting molecules against M. abscessus iron acquisition pathways**” Chiarelli Laurent Roberto (Lab. Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Università di Pavia)

- Mori M, Stelitano G, Cazzaniga G et al., “Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria” *Pharmaceutics* (2023) 15:502.
- Recchia D, Stelitano G, Stamilla A et al. “*Mycobacterium abscessus* infections in cystic fibrosis individuals: a review on therapeutic options” *Int J Mol Sci* (2023) 24:4635.
- Stelitano G, Cocorullo M, Mori M et. al. “Iron acquisition and metabolism as a promising target for antimicrobials (bottlenecks and opportunities): where do we stand?” *Int J Mol Sci* (2023) 24:6181.
- Cocorullo M, Chiarelli LR, Giovanni Stelitano G, “Improving Protection to Prevent Bacterial Infections: Preliminary Applications of Reverse Vaccinology against the Main Cystic Fibrosis Pathogens”, *Vaccines* (Basel). 2023 Jul 9;11(7):1221.
- Mori M, Cocorullo M, Tresoldi A et al. “Structural basis for specific inhibition of salicylate synthase from *Mycobacterium abscessus*” *Eur J Med Chem* (2024) 265: 116073.
- Cocorullo M, Stelitano G, Chiarelli LR “Phage therapy: an alternative approach to combating multidrug-resistant bacterial infections in cystic fibrosis” *Int J Mol Sci* (2024) 25: 8321
- Recchia D, Stelitano G, Stamilla A et al. “*Mycobacterium abscessus* Infections in Cystic Fibrosis Individuals: A Review on Therapeutic Options” *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(5), 4635.

FFC Project#7/2022 “**Genomic and phenotypic characterization of Mycobacterium abscessus and detection of host biomarkers to define mycobacterial infection in cystic fibrosis**”, Nicola Lorè (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Lisa Cariani (Fondazione IRCCS, Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano)

- Lorè NI, Gramegna A, de Pretis S et al. “Single-Cell RNA Sequencing Shows that Circulating Monocytes Enriched in IFN Signaling Are Associated with Nontuberculous Mycobacteria Pulmonary Disease in Cystic Fibrosis” *Am J Respir Crit Care Med.* 2024 Sep 15;210(6):834-837.

FFC Project#8/2022 “**Targeting the STING/Transglutaminase 2-regulated Interferon response as a novel host-directed approach to fight bacterial infections in cystic fibrosis**” Mauro Piacentini (Dip. Biologia, Università Roma Tor Vergata), Valeria Raia (Dip. di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli Federico II)

- Occhigrossi L, Rossin F, Villella VR et al. “The STING/TBK1/IRF3/IFN type I pathway is defective in cystic fibrosis” 2023, *Front Immunol.* 14:1093212.
- Rossin F, Ciccocanti F, D’Eletto M et al. “Type 2 transglutaminase in the nucleus: the new epigenetic face of a cytoplasmic enzyme”, 2023, *Cell Mol Life Sci.* 80:52.

- Palucci I, Salustri A, De Maio F et al. “Cysteamine/Cystamine Exert Anti-*Mycobacterium abscessus* Activity Alone or in Combination with Amikacin”, 2023 *Int J Mol Sci.* 24:1203.
- Occhigrossi L, D’Eletto M, Vecchio A et al. “Transglutaminase type 2-dependent crosslinking of IRF3 in dying melanoma cells” 2022, *Cell Death Discov.* 8:498.
- Alonzi T, Aiello A, Petrone L, Najafi Fard S, D’Eletto M, Falasca L, Nardacci R, Rossin F, Delogu G, Castilletti C, Capobianchi MR, Ippolito G, Piacentini M, Goletti D. 2022. Cysteamine with In Vitro Antiviral Activity and Immunomodulatory Effects Has the Potential to Be a Repurposing Drug Candidate for COVID-19 Therapy. *Cells* 11:52.
- Alonzi T, Aiello A, Repele F, Falasca L, Francalancia M, Garbuglia AR, Delogu G, Nicastrì E, Piacentini M, Goletti D. 2022. Cysteamine exerts in vitro antiviral activity against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants. *Cell Death Discov.* 8:288.
- Rossin F, Ciccocanti F, D’Eletto M et al. “Type 2 transglutaminase in the nucleus: the new epigenetic face of a cytoplasmic enzyme” *Cell Mol Life Sci.* 2023 Jan 25;80(2):52.

FFC Project#5/2023 “**Beyond the lung: the gut’s role in the pathology of cystic fibrosis**” Alessandra Bragonzi (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Federica Ungaro (IRCCS San Raffaele, Laboratory of Experimental Gastroenterology, Milano), Valeria Daccò (Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Cigana C, Lorè NI, Sipione B et al. “Genetic diversity in mouse models unlocks the gut-lung axis in Cystic Fibrosis” *Science Translational Medicine (Under review)*

FFC Project#6/2023 “**Using a Virtual Screening approach to find new drugs against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus**” Silvia Buroni (Dip. Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”, Università di Pavia), Antonio Coluccia (Dip. Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università La Sapienza, Roma)

- Scoffone VC, Barbieri G, Irudal S et al. “New Antimicrobial Strategies to Treat Multi-Drug Resistant Infections Caused by Gram-Negatives in Cystic Fibrosis” *Antibiotics* (Basel). 2024 Jan 11;13(1):71.
- Sciò P, Scoffone VC, Parisi A et al. “Identification of new FtsZ inhibitor by virtual screening, mechanistic insights and SAR analyses” (*Submitted to European Journal of Medicinal Chemistry*)

FFC Project#9/2023 “**Evaluation of the efficacy of the “VOMG” new antibiotic against Mycobacterium abscessus**” Maria Rosalia Pasca (Dip. di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Università degli Studi di Pavia), Riccardo Manganelli (Dip. di Medicina Molecolare, Università di Padova), Fabio Saliu (Infection and Cystic Fibrosis Unit San Raffaele Scientific Institute, Milano)

- Degiacomi G, Chiarelli LR, Riabova O et al. “The novel drug candidate VOMG kills *Mycobacterium abscessus* and other pathogens by inhibiting cell division”, *Int J Antimicrob Agents.* 2024 Jul 26;64(4):107278.

FFC Project#10/2023 “**Drug repurposing to inhibit Pseudomonas aeruginosa adaptation to the CF lung environment**” Giordano Rampioni (Dip. di Scienze, Università Roma Tre)

- Caruso L, Mellini M, Catalano Gonzaga O et al. “Hydrogen sulfide production does not affect antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*” *Antimicrob Agents Chemother.* 2024 Apr 3;68(4):e0007524.
- Weimann A, Dinan AM, Ruis C et al. “Evolution and host-specific adaptation of *Pseudomonas aeruginosa*” *Science*, 2024 Jul 5;385(6704):eadi0908.

## 4. INFLAMMATION

### Terapie dell'infiammazione polmonare

**FFC Project#13/2014 "Targeting extracellular Protein Disulfide Isomerase to control Burkholderia cenocepacia lung infections"** Francesca Pacello (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

- Pacello F. et al. "An ERp57-mediated disulphide exchange promotes the interaction between *Burkholderia cenocepacia* and epithelial respiratory cells" *Sci Rep*. 2016 Feb 16;6:21140

**FFC Project#17/2014 "TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung"** Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Romina Nassini (Dip. di Scienze Sanitarie, Unità di Farmacologia Clinica e Oncologica, Università di Firenze)

- Prandini P. et al. "TRPA1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Cystic Fibrosis Patients" *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Jun 9
- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti M et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" *Mucosal Immunology*, 2020 Aug 4;11:1438
- Ribeiro CMP, McElvaney NG and Cabrini G "Editorial: Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies" *Front. Pharmacol.* 12:794854.
- Cabrini G "Innovative therapies for cystic fibrosis: the road from treatment to cure" *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2018 Nov 26
- Rimessi A, Bezzerri V, Salvatori F et al. "PLCB3 Loss of Function Reduces *Pseudomonas aeruginosa*-Dependent IL-8 Release in Cystic Fibrosis" *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2018 Oct;59(4):428-436.

**FFC Project#19/2014 "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent inflammasome activation exacerbates the *P. aeruginosa*-driven inflammatory response"** Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

- Rimessi A. et al. "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa* driven inflammatory response in cystic fibrosis" *Nat Commun*. 2015 Feb 4;6:6201
- Rimessi A, Vitto VAM, Patergnani S et al. "Update on Calcium Signaling in Cystic Fibrosis Lung Disease" *Front Pharmacol*. 2021 Mar 11;12:581645.

**FFC Project#20/2014 "Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease"** Eliodoro Pizzo (Lab. di Struttura e Funzione delle Proteine-SFP, Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Emilia Maria Pedone (Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, C.N.R. Napoli)

- Pizzo E. et al. "A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating protein of *Phytolacca dioica* L: A new function of RIPs for plant defence" *FEBS Lett*. 2015 Sep 14;589(19 Pt B):2812-8
- Notomista E. et al. "The identification of a novel *Sulfolobus islandicus* CAMP-like peptide points to archaeal microorganisms as cell factories for the production of antimicrobial molecules" *Microb Cell Fact*. 2015 Sep 4;14:126
- Pane K. et al. "Rational Design of a Carrier Protein for the Production of Recombinant Toxic Peptides in *Escherichia coli*" *PLoS ONE* 2016 Jan 25;11(1):e0146552
- Pane K. et al. "A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells" *FEBS J* 2016 Jun;283(11):2115-31
- Gaglione R, Pane K, Dell'Omo E et al. "Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*" *New Biotechnology* 2019 Jul 25;51:39-48

**FFC Project#22/2014 "Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: from drug discovery to preclinical validation"** Luigina Romani (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Perugia)

- Zelante T. et al. "Tryptophan Feeding of the IDO1-AhR Axis in Host-Microbial Symbiosis" *Front Immunol*. 2014 Dec 15;5:640
- Borghi M. et al. "Antifungal Th Immunity: Growing up in Family" *Front Immunol*. 2014 Oct 15;5:506
- Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V et al. "IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis" *Nature Communications*, 2016 Mar 14;7:10791
- De Luca A, Pariano M, Cellini B et al. "The IL-17F/IL-17RC Axis Promotes Respiratory Allergy in the Proximal Airways" *Cell Reports* 2017 Aug 15;20(7):1667-1680
- Piliponsky AM, Romani L "The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity" *Immunological Reviews* 2018 Mar;282(1):188-197
- Costantini C, Renga G, Oikonomou V et al. "The Mast Cell-Aryl Hydrocarbon Receptor Interplay at the Host-Microbe Interface" *Mediators of Inflammation*, 2018 Oct 28;2018:7396136
- Puccetti M, Paolicelli G, Oikonomou V et al. "Towards Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor in Cystic Fibrosis" *Mediators of Inflammation*, 2018 Feb 18;2018:1601486"
- Pariano M, Pieroni S, De Luca A et al. "Anakinra Activates Superoxide Dismutase 2 to Mitigate Inflammasome Activity" *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 18;22(12):6531.
- Van de Veerdonk FL, Renga G, Pariano M et al. "Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy" *J Clin Invest*. 2022 Jan 18;132(2):e144983.
- Pariano M, Costantini C, Santarelli I et al. "Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis" *Vaccines* 2021, 9, 1311.

**FFC Project#12/2015 "Anti-inflammatory and antibacterial activity of bovine lactoferrin administered by aerosol in airways infections of pre-clinical wt and CF mouse models"** Francesca Berluti (Dip. di Salute Pubblica e Malattie Infettive Università La Sapienza, Roma)

- Valenti P, Frioni A, Rossi A "Aerosolized bovine lactoferrin reduces neutrophils and pro-inflammatory cytokines in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections" *Biochemistry and Cell Biology* 2017 Feb;95(1):41-47

**FFC Project#20/2015 "Mitochondrial quality control machinery a role in the *P. aeruginosa*-triggered inflammatory response in cystic fibrosis"** Alessandro Rimessi (Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Laboratorio Trasduzione Segnali Università di Ferrara)

- Rimessi A. et al. "Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies" *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Jun 29
- Yoboue ED, Rimessi A, Anelli T et al. "Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane" *Antioxidant & redox signalling* 2017 Sep 20;27(9):583-595

**FFC Project#22/2015 "A systematic investigation of miglustat-derivatives iminosugar clusters as possible anti-inflammatory agents for cystic fibrosis lung disease"** Maria Cristina Dechecchi (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dipartimento di Patologia e Diagnostica Università di Verona), Massimo Aureli (Dip. di Biotecnologia Medica e Medicina Traslationale Università di Milano)

- Munari S. et al. "Neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulation of the sphingolipid metabolism" *JSM Genetics & Genomics*, 3 September 2016
- Lampronti I, Dechecchi MC, Rimessi A et al. "β-Sitosterol Reduces the Expression of Chemotactic Cytokine Genes in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells" *Frontiers in Pharmacology* 2017 May 12;8:236



- Chiricozzi E, Loberto N, Schiumarini D et al. “Sphingolipids role in the regulation of inflammatory response: from leukocyte biology to bacterial infection” *J Leukoc Biol*, 10.1002/JLB.3MR0717-269R
- Dehecchi MC, Tamanini A, Cabrini G “Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside” *Annals of Translational Medicine* 2018 Sep;6(17):334
- De Fenza M, D’Alonzo D, Esposito A et al. “Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of N-alkyl-deoxyimino-sugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections for application in CF lung disease” *Eur J Med Chem* 2019 Aug 1;175:63-71.

**FFC Project#24/2015 “CFTR-defective biliary cells from human induced pluripotent-stem cells (iPSC) as a model to study the role of innate immunity in cystic fibrosis liver disease”** Mario Strazzabosco (Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Laboratorio di Epatologia Università degli Studi Milano-Bicocca)

- Fiorotto R, Amenduni M, Mariotti V et al “Src kinase inhibition reduces inflammatory and cytoskeletal changes in ΔF508 human cholangiocytes and improves CFTR correctors efficacy” *Hepatology* 2017 Jul 24
- Strazzabosco M, Fiorotto R, Cadamuro M et al. “Pathophysiological implications of innate immunity and autoinflammation in the biliary epithelium” *BBA Molecular Basis of Disease* 2018 Apr;1864(4 Pt B):1374-1379.

**FFC Project#18/2016 “Interfering with glycosaminoglycans during *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection: pre-clinical exploitation of a novel therapeutic strategy for cystic fibrosis”** Cristina Cigana (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, Divisione Immunologia, Trapianto e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Lorè NI, Veraldi N, Riva C et al. “Synthesized Heparan Sulfate Competitors Attenuate *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection” *International Journal of Molecular Science* 2018 Jan 9;19(1)

**FFC Project#19/2016 “Resolvin D1 for targeting chronic lung inflammation, infection, and damage in cystic fibrosis”** Antonio Recchiuti (Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologie Centro di Eccellenza delle Scienze dell’Invecchiamento, Università G. D’Annunzio, Chieti-Pescara)

- Pierdomenico AM, Patruno S, Codagnone M et al. microRNA-181b is increased in cystic fibrosis cells and impairs lipoxin A4 receptor-dependent mechanisms of inflammation resolution and antimicrobial defense” *SCI REP* 2017 Oct 18;7(1):13519 11-mag-18
- Isopi E, Mattoscio D, Codagnone M et al. “Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection” *Mucosal Immunol*, 2018 Jan;11(1):35-49
- Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E “Roles, action, and therapeutic potential of specialized pro-resolving lipid mediators for the treatment of inflammation in cystic fibrosis” *Frontiers in Pharmacology* 2019 Apr 2;10:252.

**FFC Project#21/2017 “Testing the anti-inflammatory effects of matrix metalloprotease inhibitors in *P. aeruginosa*-infected CFTR-knockout mice by in vivo imaging techniques”** Federico Boschi (Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona)

- Sandri A, Lleo MM, Signoretto C et al. “Chemotaxis anti-inflammatory effects in CF mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *The Journal of Translational Immunology*, 18 September 2020
- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. “Longitudinal monitoring of sinonasal and oral bacterial reservoirs to prevent chronic lung infection in people with cystic fibrosis” *European Respiratory Journal* 2020 Jul; 6(3): 00115-2020
- Sandri A, Lleo MM, Boschi F et al. “Protease inhibitors elicit anti-inflammatory effects in mice with *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection” *Clin Exp Immunol*. 2021 Jan;203(1):87-95.

**FFC Project#22/2018 “Preclinical testing in cystic fibrosis of a repurposed molecule targeting HMGB1”** Marco Emilio Bianchi (Divisione Genetica e Biologia Cellulare, Unità dinamica della cromatina, Ospedale San Raffaele, Milano)

- De Leo F, Rossi A, De Marchis F et al. “Pamoic acid is an inhibitor of HMGB1-CXCL12 elicited chemotaxis and reduces inflammation in murine models of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia” *Molecular Medicine* (2022) 28:108

**FFC Project#23/2018 “Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo”** Maria Cristina Dehecchi (Dip. Patologia e Diagnostica, Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona), Annalisa Guaragna (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Scienze Chimiche)

- Esposito A, D’Alonzo D, De Fenza M et al. “Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis” *Int J Mol Sci*. 2020 May 9;21(9):3353

**FFC Project#24/2018 “Pharmacology and therapeutics of inhaled indoles, as aryl hydrocarbon receptor ligands, in cystic fibrosis”** Luigina Romani (Università degli Studi di Perugia, Dip. Medicina Sperimentale)

- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. “Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans” *Frontiers in Immunology*, 2019 May 7;10:890
- van de Veerndonk F, Servillo G, De Luca A et al. “Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy” *Science*, submitted
- Costantini C, Puccetti M, Pariano M et al. “Selectively targeting key inflammatory pathways in cystic fibrosis” *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020 Aug 9;206:112717
- Napolioni V, Pariano M, Borghi M et al. “Genetic Polymorphisms Affecting IDO1 or IDO2 Activity Differently Associate With Aspergillosis in Humans” *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 890
- Puccetti M, Pariano M, Renga G et al. “Targeted Drug Delivery Technologies Potentiate the Overall Therapeutic Efficacy of an Indole Derivative in a Mouse Cystic Fibrosis Setting” *Cells*. 2021 Jun 25;10(7):1601
- Pariano M, Puccetti M, Stincardini C et al. “Aryl Hydrocarbon Receptor Agonism Antagonizes the Hypoxia-driven Inflammation in Cystic Fibrosis” *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2022 Oct 17.

**FFC Project#25/2018 “Enabling pulmonary delivery of siRNA in cystic fibrosis lung inflammation: therapeutic potential of hybrid lipid/polymer nanoparticles”** Francesca Ungaro (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. Farmacia), Olivia Monica Merkel (Dept. Pharmazie, Ludwig-Maximilians Universität, München)

- Conte G, Costabile G, Baldassi D et al. “Hybrid Lipid/Polymer Nanoparticles to Tackle the Cystic Fibrosis Mucus Barrier in siRNA Delivery to the Lungs: Does PEGylation Make the Difference?” *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2022, 14, 7565–7578

**FFC Project#18/2019 “Investigating *Achromobacter xylosoxidans* pathogenicity and clinical role in CF lung infection”** Maria M. Lleò (Dip. Diagnostica e Sanità Pubblica, Università di Verona)

- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. “Genomic characterization of *Achromobacter* species isolates from chronic and occasional lung infection in cystic fibrosis patients” *Microb Genom*. 2021 Jul;7(7):000606
- Veschetti L, Sandri A, Patuzzo C et al. “Mobilome Analysis of *Achromobacter* spp. Isolates from Chronic and Occasional Lung Infection in Cystic Fibrosis Patients” *Microorganisms*. 2021 Jan 8;9(1):130.



*FFC Project#20/2019 "Evaluation of anti-inflammatory treatments for CF lung disease in murine models of lung infection in vivo: insights on the anti-inflammatory effect of  $\beta$ -sitosterol and anti-inflammatory/anti-infective activity of L-miglustat" Maria Cristina Dechecchi (Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Laboratorio di Patologia Molecolare-Laboratorio Analisi), Annalisa Guaragna (Università di Napoli Federico II, Dip. di Scienze Chimiche)*

- De Fenza M, D'Alonzo D, Esposito A et al. "Exploring the effect of chirality on the therapeutic potential of Nalkyl-deoxyiminosugars: anti-inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infections for application in CF lung disease" Eur J Med Chem, 2019 Aug 1;175:63-71
- De Gregorio E, Esposito A, Vollario A et al. "N-Nonyloxypentyl-1-Deoxynojirimycin Inhibits Growth, Biofilm Formation and Virulence Factors Expression of *Staphylococcus aureus*" Antibiotics 2020 Jun 26;9(6):362
- Esposito A, D'Alonzo D, De Fenza M et al. "Synthesis and Therapeutic Applications of Iminosugars in Cystic Fibrosis" International Journal of Molecular Sciences 2020 May; 21(9): 3353

*FFC Project#22/2019 "Multi-task evaluation of TMA analogues as anti-inflammatory treatments for CF lung disease" Ilaria Lampronti (Dip. Scienze della vita e biotecnologie, Sez. biochimica e biologia molecolare, Università di Ferrara)*

- Cabrini G, Rimessi A, Borgatti E et al. "Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis" Frontiers in Immunology, 2020 Aug 4;11:1438
- Rimessi A, Pozzato C, Carparelli L et al. "Pharmacological modulation of mitochondrial calcium uniporter controls lung inflammation in cystic fibrosis" Science Advances 2020 May; 6(19): eaax9093

*FFC Project#23/2019 "Potential action of phages as immunomodulators in cystic fibrosis" Anna Silvia Pistocchi (Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano)*

- Cafora M, Brix A, Forti F et al. "Phages as immunomodulators and their promising use as anti-inflammatory agents in a cfr loss-of-function zebrafish model" J Cyst Fibros. 2020 Dec 6;S1569-1993(20)30927-9.
- Cafora M, Poerio N, Forti F et al. "Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models" 2022 Front. Microbiol. 13:979610.

*FFC Project#17/2020 "Oral and pulmonary delivery platforms for anakinra repurposing in cystic fibrosis" Stefano Giovagnoli (Università degli Studi di Perugia, Dip. di Scienze Farmaceutiche)*

- Puccetti P, Pariano P, Stincardini C et al. "Pulmonary drug delivery technology enables anakinra repurposing in cystic fibrosis", J Control Release. 2023 Jan;353:1023-1036.
- Puccetti M, Pariano M, Stincardini C et al. "Pulmonary drug delivery technology enables anakinra repurposing in cystic fibrosis" J Control Release. 2023 Jan;353:1023-1036.

*FFC Project#20/2020 "Harnessing selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibition to tackle inflammation and fibrotic remodeling in cystic fibrosis" Vincenzo Summa (Università degli Studi di Napoli Federico II, Dip. di Farmacia), Lucia Altucci (Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dip. di Medicina di Precisione)"*

- Barone S, Cassese E, Alfano AI et al. "Chasing a Breath of Fresh Air in Cystic Fibrosis (CF): Therapeutic Potential of Selective HDAC6 Inhibitors to Tackle Multiple Pathways in CF Pathophysiology" Published as part of the Journal of Medicinal Chemistry special issue "Epigenetics 2022", J Med Chem. 2022 Feb 24;65(4):3080-3097

*FFC Project#19/2021 "Exploring the dual targeting of host and microbial sphingosine-1-phosphate lyase as antimicrobial strategy in cystic fibrosis" Barbara Cellini (Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Sperimentale)*

- Cellini B, Pampalone G, Camaioni E et al. "Dual species sphingosine-1-phosphate lyase inhibitors to combine antifungal and anti-inflammatory activities in cystic fibrosis: a feasibility study" Sci Rep. 2023 Dec 20;13(1):22692.

*FFC Project#20/2021 "Nanotechnology-based Resolvin D1 as Proresolving Therapy in Cystic Fibrosis: Preclinical Studies for the Delivery of Innovative Formulations to the Clinic" Antonio Recchiuti (Università G. d'Annunzio Chieti-Pescara, Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche), Alessandra Aloisi (Istituto per la microelettronica e microsistemi - IMM, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Lecce)*

- Sousa T, Pinho D, Recchiuti A et al. "Editorial: Specialized proresolving mediators: Benefits within and beyond inflammation resolution in cardiometabolic, neurological and psychiatric disorders" Front Physiol. 2023 Apr 4;14:1176700.
- Ferri G, Serano M, Isopi E et al. "Resolvin D1 improves airway inflammation and exercise capacity in cystic fibrosis lung disease" FASEB J. 2023 Nov;37(11):e23233.

*FFC Project#10/2022 "Towards the development of GY971a as anti-inflammatory drug in Cystic Fibrosis" Ilaria Lampronti (Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)*

- Vaccarin C, Gabbia D, Franceschinis E et al. "Improved Trimethylangelicin Analogs for Cystic Fibrosis: Design, Synthesis and Preliminary Screening", Int J Mol Sci 2022;23:11528.
- Tupini C, Chilin A, Rossi A et al. "New TMA (4,6,4'-Trimethyl angelicin) Analogues as Anti-Inflammatory Agents in the Treatment of Cystic Fibrosis Lung Disease, Int J Mol Sci 2022; 23a:14483.
- Ribeiro CMP, Higgs MG, Muhlebach MS et al. "Revisiting Host-Pathogen Interactions in Cystic Fibrosis Lungs in the Era of CFTR Modulators", Int J Mol Sci. 2023 Mar 5;24(5):5010.
- Ribeiro CMP, Higgs MG, Muhlebach MS et al. "Revisiting Host-Pathogen Interactions in Cystic Fibrosis Lungs in the Era of CFTR Modulators" Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(5), 5010;

*FFC Project#11/2022 "Targeting platelet activation with pro-resolving mediators: an innovative strategy to dampen lung inflammation in cystic fibrosis" Domenico Mattoscio (Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Univ. Chieti-Pescara)*

- D'Orazio S, Mattoscio D "Dysregulation of the arachidonic acid pathway in cystic fibrosis: implications for chronic inflammation and disease progression" Pharmaceuticals (Basel) 2024, 17(9).

*FFC Project#12/2022 "Evaluation of phage interactions with host immune system in models of cystic fibrosis: one step toward phage therapy application" Anna Silvia Pistocchi (Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale - Biometra, Università degli Studi di Milano)*

- Cafora M, Brix A, Forti F et al. "Studying Bacteriophage Efficacy Using a Zebrafish Model" Methods Mol Biol. 2024;2734:151-169.
- Cafora M, Poerio N, Forti F et al. "Evaluation of phages and liposomes as combination therapy to counteract *Pseudomonas aeruginosa* infection in wild-type and CFTR-null models" Front Microbiol. 2022 Sep 15;13:979610.

## 5. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH

### Ricerca clinica ed epidemiologica

FFC#27/2014 **“Transmissibility and clinical significance of *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis”** Tortoli Enrico (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Div. di Immunologia, trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano), Lisa Cariani (Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano), Clelia Di Serio (CUSSE-Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano), Stefan Niemann (Molecular Mycobacteriology, Research Center Borstel)

- Tortoli E, Kohl TA, Brow-Elliott BA et al. “Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov.” Int. J Systematic and Evolut. Microbiology 2016 Nov;66(11):4471-4479.
- Tortoli E, Kohl TA, Trovato A et al “*Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis: low impact of inter-human transmission in Italy” European Respiratory Journal 2017 Jul 13;50(1)
- Trovato A, Baldan R, Costa D et al. “Molecular typing of *Mycobacterium abscessus* isolated from cystic fibrosis patients” International Journal of Mycobacteriology 2017 Apr-Jun;6(2):138-141.

FFC Project#28/2014 **“In vitro study of potential pro-fibrotic effect of Everolimus in different human airway cell lines. Searching for new biomarkers to optimize MTOR-inhibitor immunosuppressive treatment of cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation”** Gianluigi Zaza (Unità di Nefrologia, Dip. di Medicina, Azienda Universitaria Ospedaliera, Verona), Marco Chilosi (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

- Tomei P. et al. “Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in bronchial/pulmonary cells: when the dosage does matter in transplantation” J Nephrol. 2016 Dec;29(6):881-891
- Granata S, Santoro G, Masola V et al. “In vitro Identification of New Transcriptomic and miRNomic Profiles Associated with Pulmonary Fibrosis Induced by High Doses Everolimus: Looking for New Pathogenetic Markers and Therapeutic Targets” Int. J. Mol. Sci. 2018 Apr 20;19(4).

FFC Project#29/2014 **“Properties of airway mucus in cystic brosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate”** Olga Luisa A. Zegarra (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “Giannina Gaslini”, Genova)

- Stigliani M. et al. “Rheological properties of Cystic Fibrosis bronchial secretion and *in vitro* drug permeation study: the effect of sodium bicarbonate” J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2016 Aug;29(4):337-45
- Gianotti A. et al. “Pharmacological rescue of mutant CFTR protein improves the viscoelastic properties of CF mucus” J Cyst Fibros. 2016 May;15(3):295-301

FFC Project#27/2015 **“Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations”** Natalia Cirilli (Centro di Riferimento per fibrosi cistica, Ospedale dei Bambini G. Salesi, Dipartimento Materno Infantile degli Ospedali Riuniti, Ancona)

- Cirilli N, Raia V, Rocco I et al. “Intra-individual biological variation in sweat chloride concentrations in CF, CFTR dysfunction, and healthy pediatric subjects” Pediatr Pulmonol 2018 Jun;53(6):728-734

FFC Project#29/2015 **“Testing CFTR repair in cystic fibrosis patients carrying nonsense and channel gating mutations”** Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia e Diagnostica Università di Verona), Monica Averna (Dip. di Medicina Sperimentale, sez. di Biochimica Università di Genova)

- Sorio C. et al. “Mutations of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Cause a Monocyte-Selective Adhesion Deficiency” Am J Respir Crit Care Med. 2016 May 15;193(10):1123-33

- Averna M. et al. “Abnormal activation of calpain and protein kinase Ca promotes a constitutive release of matrix metalloproteinase 9 in peripheral blood mononuclear cells from cystic fibrosis patients” Arch Biochem Biophys. 2016 Aug 15;604:103-12
- Bergamini G, Stellari F, Sandri A et al. “An IL-8 Transiently Transgenic Mouse Model for the *In vivo* Long-term Monitoring of Inflammatory Responses” J Vis Exp. 2017 Jul 7;(125)

FFC Project#20/2016 **“Italian multicenter study of glucose tolerance defects in cystic fibrosis”** Alberto Battezzati (Centro Internazionale per Inquadramento dello Stato Nutrizionale-ICANS, DeFENS, Università degli Studi di Milano)

- Colombo C, Alicandro G, Gambazza S et al. “Ventilation inhomogeneity is associated with OGTT-derived insulin secretory defects in cystic fibrosis” Pediatr Pulmonol 2018 Dec 21

FFC Project#22/2016 **“Environmental and human reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species colonizing the lower airways of cystic fibrosis patients”** Caterina Signoretto (Dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica, Sezione di Microbiologia, Università di Verona)

- Passarelli Mantovani R, Sandri A, Boaretti M et al. “Toothbrushes may convey bacteria to the cystic fibrosis lower airways” Journal of Oral Microbiology, 2019 Aug 7;11(1):1647036

FFC Project#27/2018 **“Use of multivolume MRI instead of ionizing imaging techniques for surveillance in young patients after lung transplantation for cystic fibrosis”** Alessandro Palleschi (Fondazione IRCCS Ca’ Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Pennati F, Salito C, Borzani I et al. “Quantitative Multivolume Proton-Magnetic Resonance Imaging in Lung Transplant Recipients: Comparison With Computed Tomography and Spirometry” Acad Radiol. 2021 Oct;28(10):e297-e305.

FFC Project#28/2018 **“Identification of early molecular biomarkers of acute and chronic rejection in cystic fibrosis patients with lung transplant through the application of omics technologies”** Federico Rea (Dip. Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari, Div. Chirurgia toracica, AOU Padova), Francesco Paolo Schena (Schena Foundation – Omics Research)

- Lunardi F, Abbrescia DI, Vedovelli L et al. “Molecular Profiling of Tissue Samples with Chronic Rejection from Patients with Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Pilot Study in Cystic Fibrosis Patients” Biomolecules 2023, 13(1), 97;

FFC Project#30/2018 **“Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome”** Vito Terlizzi (Centro FC, AOU Meyer, Firenze), Rita Padoan (Centro supporto FC, Spedali Civili, Brescia); Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Terlizzi V, Mergni G, Buzzetti R et al. Cystic fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): experience in Tuscany, Italy, Journal of Cystic Fibrosis, 2019 Jul;18(4):484-490
- Taccetti G, Botti M, Terlizzi V et al. “Clinical and Genotypical Features of False-Negative Patients in 26 Years of Cystic Fibrosis Neonatal Screening in Tuscany, Italy” Diagnostics (Basel) 2020 Jul 1;10(7):446
- Terlizzi V, Mergni G, Centrone C et al. “Trend of sweat chloride values in a cohort of patients carrying CFTR mutations of varying clinical consequence: Is there a risk of increasing sweat chloride over time?” Pediatr Pulmonol 2020 May;55(5):1089-1093
- Castaldo A, Cimbalo C, Castaldo RJ et al. “Cystic Fibrosis-Screening Positive Inconclusive Diagnosis: Newborn Screening and Long-Term Follow-Up Permits to Early Identify Patients with CFTR-Related Disorders” Diagnostics (Basel) 2020 Aug 8;10(8):E570

- Terlizzi V, Padoan R, Claut L et al. “CRMS/CFSPID Subjects Carrying D1152H CFTR Variant: Can the Second Variant Be a Predictor of Disease Development?” *Diagnostics (Basel)*. 2020 Dec 12;10(12):1080.
- Terlizzi V, Claut L, Tosco A et al. “A survey of the prevalence, management and outcome of infants with an inconclusive diagnosis following newborn bloodspot screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) in six Italian centres” *J Cyst Fibros*. 2021 Sep;20(5):828-834.
- Terlizzi V, Padoan R “Infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis and acute recurrent pancreatitis: what definition?” *J Med Screen*. 2021 Jul 13;9691413211031613.
- Botti M, Terlizzi V, Francalanci M et al. “Cystic fibrosis in Tuscany: evolution of newborn screening strategies over time to the present” *Ital J Pediatr*. 2021 Jan 6;47(1):2.
- Terlizzi V, Claut L, Colombo C et al. “Outcomes of early repeat sweat testing in infants with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/CF screen-positive, inconclusive diagnosis” *Pediatr Pulmonol*. 2021 Sep 22.

**FFC Project#24/2019 “Early Derangements of Glucose Tolerance in Cystic Fibrosis: effect of CFTR Modulators”** Alberto Battezzati (Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea, DeFENS, Università di Milano), Carla Colombo (Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Clinica Pediatrica De Marchi, Centro Regionale FC, Milano), Vincenzina Lucidi (Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Roma), Maria Cristina Lucanto (AOU Messina, Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica); Andrea Mari (Istituto di Neuroscienze, CNR, Padova)

- Battezzati A, Foppiani A, Alicandro G et al. “Prepubertal insulin secretory indices are long-term predictors of short adult stature in cystic fibrosis” *Endocr Connect*. 2022 May 10;11(5):e220056.
- Andrea F, Ciciello F, Bisogno A et al. “Distribution of OGTT-Related Variables in Patients with Cystic Fibrosis from Puberty to Adulthood: An Italian Multicenter Study”, *J Pers Med*. 2023 Mar 3;13(3):469.
- Colombo C, Foppiani A, Bisogno A et al. “Lumacaftor/Ivacaftor in Cystic Fibrosis: Effects on Glucose Metabolism and Insulin Secretion”, *J Endocrinol Invest*. 2021 Oct;44(10):2213-2218

**FFC Project#27/2019 “Right ventricle dysfunction in cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation”** Vittorio Scaravilli (Dipartimento Anestesia, Rianimazione ed Emergenza, Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano)

- Scaravilli V, Scansani S, Grasso A et al. “Right Ventricle Dysfunction in Patients With Adult Cystic Fibrosis Enlisted for Lung Transplant” *Transplant Proc*. Jan-Feb 2021;53(1):260-264
- Scaravilli V, Merrino A, Bichi F et al. “Longitudinal assessment of renal function after lung transplantation for cystic fibrosis: transition from post-operative acute kidney injury to acute kidney disease and chronic kidney failure” *Journal of Nephrology* (2022) 35:1885–1893
- Scaravilli V, Guzzardella A, Madotto F et al. “Hemodynamic failure and graft dysfunction after lung transplant: A possible clinical continuum with immediate and long-term consequences”, *Clin Transplant*. 2023 Sep 11;e15122.

**FFC Project#22/2020 “Role of viable but non culturable (VBNC) bacterial forms in CF patients in a clinical setting: a translational research”** Natalia Cirilli (Ospedali Riuniti, Dip. Materno Infantile, Centro FC, Ancona), Luca Tiano (Università Politecnica delle Marche, Dip. di Scienze della Vita e dell’Ambiente), Rosaria Gesuita (Università Politecnica delle Marche, Centro di Epidemiologia, Biostatistica e Informatica Medica)

- Mangiaterra G, Schiavoni V, Cedraro N et al. “Clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa* viable but non-culturable forms in cystic fibrosis” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2024 Sep;43(9):1865-1867

- Cirilli N, Schiavoni V, Tagliabracci V et al. “Role of viable but non culturable cells in patients with cystic fibrosis in the era of highly effective modulator therapy” *J Cyst Fibros* 2024 Feb 28;S1569-1993(24)00026-2.

**FFC Project#23/2020 “Unravelling novel biomarkers to define the progression of *Mycobacterium abscessus* lung disease in cystic fibrosis”**, Nicola Ivan Lorè (Università Vita-Salute, Ospedale San Raffaele, Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive)

- Lorè NI, Saliu F, Spitaleri A et al. “The aminoglycoside modifying enzyme Eis2 represents a new potential *in vivo* target for reducing antimicrobial drug resistance in *Mycobacterium abscessus* complex” *Eur Respir J*. 2022 Dec 1;60(6):2201541

**FFC Project#24/2020 “Cystic Fibrosis screen positive inconclusive diagnosis (CFSPID): an italian multicenter survey evaluating prevalence, clinical data, management and outcome”** Vito Terlizzi (Centro FC, AOU Meyer, Firenze), Antonella Tosco (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Elisabetta Claut (IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano)

- Terlizzi V, Motisi MA, Pellegrino R et al. “Risk factors for severe COVID-19 in people with cystic fibrosis: A systematic review” *Front Pediatr*. 2022 Aug 8;10:958658
- Tosco A, Castaldo A, Colombo C et al. “Clinical outcomes of a large cohort of individuals with the F508del/5T;TG12 CFTR genotype” *J Cyst Fibros*. 2022; 21:850-855.
- Dolce D, Claut L, Colombo C et al. “Different management approaches and outcome for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis (CRMS/CFSPID) and *Pseudomonas aeruginosa* isolation” *J Cyst Fibros*. 2023 Jan;22(1):73-78
- Fevola C, Dolce D, Tosco A et al. “Risk of CFTR-related disorders and cystic fibrosis in an Italian cohort of CRMS/CFSPID subjects in preschool and school age” *Eur J Pediatr*. 2024 Feb;183(2):929-938.
- Dolce D, Fevola C, Camera E et al. “Comparison between Gibson-Cooke and Macroduct Methods in the Cystic Fibrosis Neonatal Screening Program and in Subjects Who Are Cystic Fibrosis Screen-Positive with an Inconclusive Diagnosis”; *Int. J. Neonatal Screen*. 2023, 9(3), 41
- Terlizzi V, Fevola C, Ferrari B et al. “Lung clearance index in children with cystic fibrosis previously diagnosed with CRMS/CFSPID: A monocentric prospective experience” *Pediatr Pulmonol*. 2023 Jul;58(7):2124-2131.
- Tosco A, Marino D, Sara Polizzi S et al. “A Multicentre Italian Study on the Psychological Impact of an Inconclusive Cystic Fibrosis Diagnosis after Positive Neonatal Screening” *Children (Basel)*. 2023 Jan 18;10(2):177.

**FFC Project#21/2021 “Mental Health in Cystic Fibrosis patients: the prognostic role of temperament, personality and attachment styles”** Gianluca Serafini (DINO GMI, Università di Genova)

- Amerio A, Magnani L, Castellani C et al. “The Expression of Affective Temperaments in Cystic Fibrosis Patients: Psychopathological Associations and Possible Neurobiological Mechanisms” *Brain Sci*. 2023 Apr 5;13(4):619
- Ciprandi R, Pescini R, Serafini G et al., “Mental health in cystic fibrosis patients: predictive factors and psychopathology” *Journal of Cystic Fibrosis*, 2023, vol 22, suppl 2, S174.

**FFC Project#13/2022 “Fighting *Mycobacterium abscessus* infections by a novel combination therapy with liposome/Kafrtio/antibiotic”** Maurizio Fraziano (Dip. di Biologia, Università di Roma “Tor Vergata”), Daniela Maria Cirillo (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

- Olimpieri T, Poerio N, Poncechi G et al. “Phosphatidylserine liposomes induce a phagosome acidification-dependent and ROS-mediated intracellular killing of *Mycobacterium abscessus* in human macrophages” *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Aug 19;14:1443719.



FFC Project#15/2022 “**Study on anti-fungal IMMUNOGlobulins, as a potential diagnostic biomarker and therapeutic values for Allergic Bronchopulmonary ASPERGillosis in Children with Cystic Fibrosis**” Teresa Zelante (Dip. di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia)

- Gago S, Mandarano M, Floridi C et al. “Host, pathogenic fungi and the microbiome: A genetic triangle in infection” *Front Immunol.* 2023 Jan 17;13:1078014
- Gago S, Mandarano M, Floridi C et al. “Host, pathogenic fungi and the microbiome: A genetic triangle in infection” *Front Immunol.* 2023 Jan 17;13:1078014

FFC Project#16/2023 “**Facing resistance to therapeutic phages observed in Pseudomonas aeruginosa isolates from people with cystic fibrosis**” Federica Briani, (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

- Lokareddy R, Hou CF, Forti F et al. “Integrative structural analysis of Pseudomonas phage DEV reveals a genome ejection motor” *Res Sq [Preprint]*. 2024 Feb 21:rs.3.rs-3941185.
- Forti F, Bertoli C, Cafora M et al. “Identification and impact on Pseudomonas aeruginosa virulence of mutations conferring resistance to a phage cocktail for phage therapy” *Microbiology Spectrum* 12;11(6):e0147723.

## FFC RICERCA FACILITIES

**Cystic Fibrosis animal Core facility (CFaCore)** Alessandra Bragonzi (Istituto di Ricerca San Raffaele, Milano)

- Facchini M. et al. “Long-term chronic Pseudomonas aeruginosa airway infection in mice” *J Vis Exp.* 2014 Mar 17;(85)
- Kukavica-Ibrulj I FM et al. “Assessing Pseudomonas aeruginosa virulence and the host response using murine models of acute and chronic lung infection” *Methods Mol Biol.* 2014;1149:757-71
- Facchini M, De Fino I, Riva C, Bragonzi A “Long term chronic Pseudomonas aeruginosa airway infection in mice” *J Vis Exp* 2014 Mar 17;(85)
- Cigana C, Ranucci S, Rossi A et al. “Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for Pseudomonas aeruginosa” *Eur Respir J.* 2020 Mar 5;55(3):1802456.
- Cigana C, Rossi R, Alcalá-Franco B et al. “Improving the Predictive Value of Preclinical Mouse Models of Pseudomonas aeruginosa Respiratory Infection to Evaluate Antibiotic Efficacy” *Methods Mol Biol.* 2024:2721:215-231.

**Cystic Fibrosis Database (CFDB)** Roberto Buzzetti, Donatello Salvatore (Centro FC, Osp. S. Carlo, Potenza), Valeria Raia (Centro FC, Università Federico II, Napoli), Laura Minicucci (Centro FC, Osp. Gaslini, Genova), Natalia Cirilli (Centro FC, Ospedali Riuniti, Ancona), Daniele Alessio (OnLime, Milano)

- Buzzetti R et al. “CFDB (cystic fibrosis database): a new web-based tool for cystic fibrosis specialists” *Pediatr Pulmonol.* 2014 Sep;49(9):938-40.

**Servizio Colture Primarie** Valeria Capurro (U.O.C. Genetica Medica, Istituto “G. Gaslini”, Genova), Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Prandini P, De Logu F, Fusi C, Provezza L et al. “Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels Modulate Inflammatory Response in Respiratory Cells from Patients with Cystic Fibrosis” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2016 Nov;55(5):645-656.
- Gianotti A, Capurro V, Del Piano L et al. “Small Molecule Anion Carriers Correct Abnormal Airway Surface Liquid Properties in Cystic Fibrosis Airway Epithelia” *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Feb 21;21(4)
- Gianotti A, Delpiano L, Caci E “*In vitro* Methods for the Development and Analysis of Human Primary Airway Epithelia” *Frontiers in Pharmacology* 2018 Oct 26;9:1176

- Ferrera L, Capurro V, Delpiano L et al. “The Application of Bicarbonate Recovers the Chemical-Physical Properties of Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis Epithelia Models” *Biology (Basel).* 2021 Mar 29;10(4):278.
- Ludovico A, Moran O and Baroni D “Modulator Combination Improves *In vitro* the Microrheological Properties of the Airway Surface Liquid of Cystic Fibrosis Airway Epithelia” *Int. J. Mol.Sci.* 2022, 23, 11396.

## STRATEGIC PROJECTS

**FFC/TFCE “Task Force for Cystic Fibrosis”**, Tiziano Bandiera (Istituto italiano di tecnologia, Genova), Nicoletta Pedemonte (Lab. Genetica Medica, Istituto G. Gaslini, Genova), Luis J. V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Liessi N, Pesce E, Braccia C et al. “Distinctive lipid signatures of bronchial epithelial cells associated with cystic fibrosis drugs, including Trikafta” *Journal of Clinical Investigation* 2020 Aug 20; 5(16): e138722.
- Brindani N, Gianotti A, Giovani S, et al. “Identification, Structure-Activity Relationship, and Biological Characterization of 2,3,4,5-Tetrahydro-1 H-pyrindo[4,3b]indoles as a Novel Class of CFTR Potentiators” *Journal of medicinal chemistry*, 2020 Oct 8;63(19):11169-11194
- Pedemonte N, Bertozzi F, Caci E et al. “Discovery of a picomolar potency pharmacological corrector of the mutant CFTR chloride channel” *Science Advances*, 21 Feb 2020: Vol. 6, no. 8, eaay9669

**“Molecole 3.0”**, Paola Barraja (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo), Luis J.V. Galietta (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

- Renda M, Barreca M, Borrelli A et al. “Novel tricyclic pyrrolo-quinolines as pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel” *Scientific Reports*, (2023), 13, 7604.
- Spanò V, Barreca M, Cilibrasi V et al. “Evaluation of Fused Pyrrolothiazole Systems as Correctors of Mutant CFTR Protein”, *Molecules* (2021), 26, 1275.
- Barreca M, Renda M, Spanò V et al. “Identification of 6,9-dihydro-5H-pyrrolo[3,2-h]quinazolines as a new class of F508del-CFTR correctors for the treatment of cystic fibrosis” *Eur J Med Chem* 276:116691, 2024.

**FFC Ricerca Strategica Project “1 out 30 and You Don’t Know It”** Carlo Castellani, (Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini), Cinzia Colombo, Paola Mosconi (Lab. di Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità - Istituto Mario Negri); Chiara Gerardi, Rita Banzi (Centro Politiche Regolatorie in Sanità - Istituto Mario Negri); Emanuela Foglia, Lucrezia Ferrario, Daniele Bellavia, Elisabetta Garagiola, Fabrizio Schettini (LIUC Università Carlo Cattaneo); Giulia Candiani, Dania Puggioni (Zadig srl)

- Banzi R, Allocati E, Gerardi C et al. “Effectiveness of pre-conceptual and prenatal cystic fibrosis carrier screening: a systematic review” *Epidemiol Prev.* 2023 Jul-Oct;47(4-5):243-256.

# Appendix 2

Institutes and Laboratories involved in the projects presented at the 22<sup>nd</sup> FFC Ricerca Convention

*Istituti e Laboratori attivi nei progetti presentati durante la XXII Convention di FFC Ricerca*

## ITALY

### ABRUZZO

- Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara
- Dipartimento di Medicina e Scienze dell’Invecchiamento, Università “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara

### CAMPANIA

- Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università Federico II, Napoli
- Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Di.S.T.A.Bi.F., Seconda Università di Napoli
- Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA
- Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Napoli Federico II
- Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II

### EMILIA ROMAGNA

- Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara
- Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FABIT), Università degli Studi di Bologna
- Dipartimento di Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità ambientale, Università degli Studi di Parma

### FRIULI VENEZIA GIULIA

- Istituto di Cristallografia, CNR, Trieste
- International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste

### LAZIO

- Dipartimento di Scienze Biochimiche “A. Rossi Fanelli”, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Charles Darwin”, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università La Sapienza, Roma
- Dipartimento di Biologia, Università di Roma “Tor Vergata”
- Dipartimento di Biologia, Università di Roma “Tor Vergata”, Laboratorio Immunologia e Patologia
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma “Tor Vergata”
- Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre, Roma
- Dipartimento di Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore Sanità (ISS), Roma
- Dipartimento di Salute Pubblica e Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma
- Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Laboratorio Microbiologia Fibrosi Cistica, Roma
- Ospedale pediatrico Bambino Gesù, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Roma

### LIGURIA

- Centro Fibrosi Cistica, Istituto “G. Gaslini”, Genova
- UOC Genetica Clinica, Istituto “G. Gaslini”, Genova
- Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINO GMI)
- Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Genova
- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di

Genova

- Istituto Italiano di Tecnologia, Analytical Chemistry Facility, Genova
- IRCCS, Istituto Giannina Gaslini, Terapia Intensiva Neonatale e Pediatrica, Genova
- IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova

### LOMBARDIA

- Centro Internazionale per lo Studio della Composizione Corporea (ICANS), Dipartimento di Scienze per gli alimenti, la nutrizione e l’ambiente, Università di Milano
- Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Lazzaro Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia
- Lab. Microbiologia molecolare, Dipartimento di Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Università degli Studi di Pavia
- Dipartimento di Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale (BioMeTra), Università degli Studi di Milano
- Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano
- Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, Emerging Bacterial Pathogens Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, Laboratory of Experimental Gastroenterology, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- Fondazione IRCCS Ca’ Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Laboratorio Microbiologia FC, Milano
- Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Milano
- Istituto Nazionale Genetica Molecolare (INGM), Milano
- IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano
- Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Centro Politiche Regolatorie in Sanità, Milano
- Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Laboratorio Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità, Milano
- LIUC - Università Carlo Cattaneo, Varese

### MARCHE

- Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università degli Studi di Urbino “Carlo Bo”
- Dipartimento Materno Infantile, Centro Regionale FC, Ospedali Riuniti, Ancona
- Centro di Epidemiologia, Biostatistica e Informatica Medica, Università Politecnica delle Marche, Ancona
- Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

### PIEMONTE

- Dipartimento di Biotecnologie molecolari e Scienze per la Salute, Università degli Studi di Torino

### PUGLIA

- Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia

### SARDEGNA

- Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) CNR, (Monserrato, Cagliari)

### SICILIA

- Unità di Gastroenterologia Pediatrica e Fibrosi Cistica, AOU Messina
- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli Studi di Palermo

## TOSCANA

- Dipartimento di Biotecnologia, Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Siena
- Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa
- Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Pisa
- Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università di Siena

## TRENTINO ALTO-ADIGE

- Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata (CIBio), Università degli Studi di Trento

## UMBRIA

- Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

## VENETO

- Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova
- Dipartimento di Farmacia e Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Padova
- Istituto di Neuroscienze, CNR, Padova
- Laboratorio Analisi, AOUI, Verona
- Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova
- Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Padova

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova
- Laboratorio di Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona

## PORTUGAL

- Biosystems and Integrative Sciences Institute (BioISI), University of Lisboa

## UNITED KINGDOM

- Queen Mary University of London

## SPAIN

- Research and Development Agency of Aragón (ARAID) Foundation, University of Zaragoza

## HUNGARY

- Semmelweis University, Budapest

## NORWAY

- Stiftelsen for Industriell og Teknisk Forskning (SINTEF), Trondheim

## CANADA

- McGill University Department of Physiology, Montreal
- University of Alberta, Edmonton

# Appendix 3

## International Reviewers of FFC Ricerca Projects (2002-2024)

### ASIA AND MIDDLE EAST

#### HONG KONG

- Dennis Lo Yuk Ming

#### INDIA

- Vasundhra Bandahri
- Vikas Gautam
- Amit Misra

#### ISRAEL

- Batsheva Kerem
- Orit Reish
- Hanoch Senderowitz
- Michael Wilschanski

#### IRAN

- Esmaeil Mortaz

#### JAPAN

- Hiroshi Kubo

#### TURCHIA

- Duygu Gözen

#### AUSTRALIA

- Scott Bell
- Andrew Burke
- Margaret Cooley
- Martin Delatycki
- Manohar Garg
- Allan Glanville
- Phil Hansbro
- Ameneh Khatami
- Anthony Kicic
- Tim Kidd
- John Massie
- John Mattick
- (Keith) Chee Ooi
- Sarath Ranganathan
- David Reid
- Louis Rendina

- Geraint Rogers
- Claudia Trappetti
- Tony Velkov
- Shafagh Waters
- Cynthia Withchurch

#### CANADA

- Asmahan AbuArish
- Yossef Av-Gay
- Diana Averill-Bates
- Christine Bear
- Emmanuelle Brochiero
- Lori Burrows
- André Cantin
- Tom Clandinin
- Elizabeth Cowley
- Peter Durie
- Paul Eckford
- Tanja Gonska
- Hartmut Grasemann
- Bob Hancock
- John W. Hanrahan
- Yeger Herman
- Waliul Khan
- Susan Koval
- Sheila Innis
- Roger Levesque
- Paul Linsdell
- Gengerly Lukacs
- Tong-jun Lin
- George A Mackie
- François Malouin
- Liu Mingyao
- Robert Newton
- Michael Parkins
- Grace Parraga
- Paul Pencharz
- Martin Post
- Danuta Radzioch
- Felix Ratjen

- Johanna Rommens
- Daniela Rotin
- Andrew Sandford
- Molly Schmid
- Aaron Shawn
- Christopher Sibley
- Pamela Sokol
- David Speert
- Anne Stephenson
- Michael G Surette
- Mark J. Turner
- Miguel Valvano
- Valerie Waters
- Michael Wheeler
- Herman Yeger
- Jason C. Young
- Julian Zielensky

#### NEW ZEALAND

- Shyamal Das

#### EUROPE

##### AUSTRIA

- Thomas Eiwegger
- Peter Jacksch
- Robert Knobler

##### BELGIUM

- Karim Amighi
- Gilles Brackman
- Marianne Carlon
- Jean Jacques Cassiman
- Tom Coenye
- Pierre Cornelis
- Paul Cos
- Aurélie Crabbé
- Harry Cuppens
- Christiane De Boeck
- Sophie Gohy
- Ingeborg Liebaers

- Savvas Savvides
- Peter Vandamme
- Briec Van Nieuwenhuysse
- François Vermeulen

##### CZECH REPUBLIC

- Pavel Drevinek
- Jan Krejsek

##### DENMARK

- Thomas Bjarnsholt
- Oana Ciofu
- Clare Hawkins
- Niels Høiby
- Christian Koch
- Marie Johannesson
- Jette Elisabeth Kristiansen
- Søren Molin
- Peter E. Nielsen

##### FRANCE

- Emmanuel Andres
- Frederic Becq
- Frank Brouillard
- Mireille Claustres
- Christelle Coraux
- Celine Cougoule
- Laurent Debarbieux
- Laurence Delhaes
- Isabelle Durieu
- Alexander Edelman
- Brigitte Fauroux
- Claude Ferec
- Chantal Gauthier
- Jean-Marc Ghigo
- Florent Ginhoux
- Emmanuelle Girodon
- Vincent Goffin
- Aurélie Goyenville
- Genevieve Hery Arnaud
- Alexandre Hinzpeter



- Jacky Jaquot
- Eric Kipnis
- Laurent Kremer
- Jean Paul Latgé
- Frederic Laurent
- Rozenn Le Berre
- Fabien Lecaille
- Patricia Lemarchand
- Christine Linard
- Olivier Mignen
- Anne Munck
- Patrizia Paterlini-Brèchet
- Jean-Marc Rolain
- Marie Catherine Romey
- Juliet Royet
- Magali Taulan-Cadars
- Vinciane Saint-Criq
- Isabelle Sermet
- Virginie Scotet
- Olivier Tabary
- Lhousseine Touqui
- Pascal Trouvè
- Valerie Urbach
- Clarisse Vandebrouck
- Guillaume Van Niel

#### **GERMANY**

- Robert Bals
- Wolfgang H. Binder
- Michael De Vrese
- Jahn Dieter
- Gerd Döring
- Stephan Fischer
- Christoph Freiberg
- Matthias Griese
- Erick Gulbins
- Dominik Hartl
- Andreas Hector
- Jürgen Heesemann
- Barbara Kahl
- Winfried Kern
- Wolfgang Kuebler
- Karl Kunzelmann
- Peter Imming
- Nico Lachmann
- Jochen G. Mainz
- Frank-Michael Müller
- Mareike Müller
- Ruth Olmer
- Markus Pietsch
- Hermann Schillers
- Ursula Seidler
- Markus Sperandio
- Stefan Stamm
- Megan Stanifer
- Gratiana Steinkamp
- Olaf Sommerburg
- Burkhard Tuemmler
- Martin Ulrich
- Gerhild van Echten-Deckert
- Weber Wolf-Michael
- Christiane Wolz

#### **GREECE**

- George Makrydimas

#### **IRELAND**

- Judith Coppinger
- Colum Dunne
- Elena Fernandez Fernandez
- Emer Fitzpatrick
- Catherine Greene
- Patrick T. Harrison
- Brian Harvey
- Siobhán McClean
- Gerry McElvaney
- Irene Oglesby
- Cian O'Leary
- Emer P. Reeves

#### **ITALY**

- Marco Agostini
- Guido Antonelli
- Tiziano Bandiera
- Giovanna Batoni
- Flavia Bazzoni
- Alessandra Bragonzi
- Carlo Castellani
- Paola Catastini
- Antonio De Flora
- Lucia De Franceschi
- Fabrizio De Ponti
- Marco D'Andrea
- Luis Juan Vicente Galietta
- Silvio Garattini
- Alessandro Grottesi
- Marco Lucarelli
- Silvia Mandillo
- Giancarlo Mansueto
- Giuseppe Magazzù
- Sara Montagnese
- Oscar Moran
- Nicoletta Pedemonte
- Marco Trabucchi
- Paolo Vezzoni

#### **NORWAY**

- Kristina Xiao Liang

#### **POLONIA**

- Marta Rachel

#### **PORTUGAL**

- Margarida Amaral
- Luka Alexander Clarke
- Carlos Farinha
- Jorge Leitão
- Miqueias Lopes-Pacheco
- Raquel Sabino

#### **SPAIN**

- Raquel Barrio
- Jaume Bertranpetit
- Ana Bustamante-Aragones
- Rafael Cantón
- Xavier Estivill
- Gertrudis Horna
- Maria Milagro Montero
- Pedro Mondejar-Lopez
- Guillermo Mtz. de Tejada de Garaizábal
- Francisco Sanchez Madrid
- Jaime Esteban Moreno
- Roberto Quesada Pato

#### **SWEDEN**

- Gunnar C. Hansson
- Georgia Mitropoulou
- Lisa Pählman
- Ute Romling
- Birgitta Strandvik
- Craig Wheelock
- Peter Zygmunt

#### **SWITZERLAND**

- Marc Chanson
- Leo Eberl
- Lukas Ebner
- Dieter Haas
- Hans Peter Fisher
- Adin Ross-Gillespie
- Georgia Mitropoulou
- Bernard Rossier
- Peter Sander

#### **THE NETHERLANDS**

- Jeffrey Beekman
- Piet Cools
- Touw Daan
- Hugo De Jonge
- Peter Klijn
- Harry Heijerman

- Lidewji Henneman
- Harry Heijerman
- Erik Hulzebos
- Peter JFM Merkus
- Charlotte Robbroeks
- Bob Scholte
- Harm Tiddens
- Bernt Van Der Blink
- Kors van der Ent

#### **U.K.**

- Charlotte Addy
- Lucy Allen
- Matthew Avison
- Deborah Baines
- Maria G. Belvisi
- Charlotte Billington
- James Birchall
- Marina Botto
- Steve Brocchini
- Malcolm Brodlie
- Alan Brown
- Andrew Bush
- Philip Calder
- Steven Conway
- Alan R. Cowley
- Ruxandra Dafinca
- Jane Davies
- Louise Donnelly
- Robert Dormer
- Alistair Duff
- Stuart Elborn
- Madeleine Ennis
- Glenda Esmond
- Thomas Evans
- Alain Filloux
- Andres Floto
- Paul Foster
- Jo Fothergill
- Peter Gahan
- Erol Gaillard
- Claire Glasscoe
- John Govan
- Michael Gray
- Robert Gray
- Andrew Greening
- Uta Griesenbach
- Katjia Hill
- Alexander Horsley
- Eshwar Mahenthiralingam
- Anil Mehta
- Maurice Hallett
- Andrew Jones
- Aras Kadioglu
- Daniel Neill
- Julian Parkhill
- Mauro Perretti
- Tyrone Pitt
- Daniela Riccardi
- Geraint Rogers
- Giovanni Satta
- Martin Savage
- Bettina C. Schock
- David Sheppard
- Nicholas Simmonds
- David Smith
- Liz Sockett
- Kevin Southern
- Giulia Spoletini
- Maurice Super
- Hui-leng Tan
- Tunney Michael
- Sabeel Valappil
- Ludovic Vallier
- Paola Vergani
- Rebecca Weiser
- John Widdicombe
- Craig Winstanley

#### **HUNGARY**

- Mónika Homa

#### **MEXICO**

- Paul Sujay

#### **SOUTH AMERICA**

##### **ARGENTINA**

- Tomás A. Santa Coloma

##### **BRAZIL**

- Margaret Cristina da Silva Boguszewski
- André Kipnis
- Veralice Meireles Sales de Bruin
- Luiz F Onuchic
- Mauro M. Teixeira

##### **CHILE**

- Carlos Alejandro Flores Pinilla

##### **COSTA RICA**

- Arturo Solis

##### **VENEZUELA**

- Juan Bautista De Sanctis

#### **U.S.A.**

##### **ALABAMA**

- Bakhrom K. Berdiev
- David Bedwell
- John Paul Clancy
- Jennifer Guimbellot
- Kim Keeling
- Stefanie Krick
- Sadis Matalon
- Camilla Margaroli
- Lisa Schwiebert
- Robert Wang

##### **CALIFORNIA**

- Myriam Amsallem
- William Balch
- Annelise Barron
- Carroll Cross
- Beate Illek
- Ryan Hunter
- Ronald Kopito
- Klaus Ley
- Terry Machen
- Richard Moss
- Malla M. Reddy
- Matthew Porteus
- Evan Powers
- Paul Quinton
- Minnie Sarwal
- David A. Stevens
- Charles M. Strom
- Alan Verkman
- Jeffrey Wine

##### **COLORADO**

- Frank Accurso
- Charles L. Daley
- Brian Day
- Brian Doctor
- Jonathan Harris
- Stacey Martiniano
- Jerry A. Nick
- Scott Sagel
- Herbert Schweizer
- Jeff Wagener
- Marty Zamora

##### **CONNECTICUT**

- Nadia Ameen
- Emanuela Bruscia
- Marie E. Egan
- Peter Glazer
- Diane Krause
- Joseph L. Kuti
- Curt Scharfe

- Mario Strazzabosco
- Li Tianbo

#### **FLORIDA**

- Alexander Cole
- Alexandra Quittner

#### **GEORGIA**

- Nael A McCarty
- Scott Grosse
- Rabindra M. Tirouvanziam

#### **ILLINOIS**

- John Christman
- Ann Harris
- Anver Kuliev
- Ajay Rana
- Susanna McColley
- Le Shen
- Ashvani Singh
- Lee Shulman
- Jerrold Turner

#### **INDIANA**

- Crislyn D'Souza-Schorey
- Roman Dziarski
- Won Kyoo Cho
- Irina Petrache

#### **IOWA**

- Xiaopeng Li
- Dwight C. Look
- Jonathan Paul M Mochel
- David Meyerholz
- Patrick Sinn
- Ziyang Yan
- Joseph Zabner

#### **KANSAS**

- John Gatti

#### **KENTUCKY**

- Stefan Stamm
- Jay Zwischenberger
- Joseph Zwischenberger

#### **LOUISIANA**

- Jay K. Kolls
- Guoshun Wang

#### **MAINE**

- Robert Owens

#### **MARYLAND**

- Biswas Roopa
- Gary Cutting
- Robert K. Ernst
- William Guggino
- Andy Kilianski
- Samuel Lai
- Gary Mansfield
- Martin Mense
- Christian Merlo
- Peter Mogayzel
- Amanda Oglesby-Sherrouse
- Kenneth N. Olivier
- Jonathan Orens

- Chris Penland
- Harvey Pollard
- Keith J. Slifer
- Neeraj Sharma
- Neeraj Vij
- Jerry Wright
- Pamela Zeitlin

#### **MASSACHUSETTS**

- Martin Joyce-Brady
- Terence Flotte
- Steven Freedman
- Anna Georgiopoulos
- Bryan Hurley
- Allan Jacobson
- Robert Kolter
- John Ladias
- Bruce Levy
- Stephen Lory
- Hongmei Mou
- Gerald Pier
- Melissa Putman
- Stefan Ryter
- Jared Silverman
- Gregory Sawicki
- Charles Serhan
- Susan Slaughaupt

#### **MICHIGAN**

- Lindsay Caverly
- Daniel Klionsky
- John J. LiPuma
- Mary O'Riodan
- Robert A. Quinn
- Kathleen Stringer
- Christopher Waters

#### **MINNESOTA**

- Robert C. Huebert
- Mark Kurth
- Antoinette Moran

#### **MISSOURI**

- Carolyn Cannon
- Tzyh-Chang Hwang
- Thalachallour Mohanakumar
- Stuart Sweet

#### **NEBRASKA**

- Bradley Britigan
- Channabasavaiah Gurumurthy
- Thalachallour Mohanakumar
- Yaping Tu

#### **NEW HAMPSHIRE**

- Dean Madden
- George A. O'Toole
- Bruce A. Stanton

#### **NEW YORK**

- Isabel Aznarez
- Nazzareno Ballatori
- Jue Chen
- Ville Friman
- David Goldfarb

- Cole Haynes
- John Lueck
- Lin L. Mantell
- Meghan R Pinezich
- Alice Prince
- Lisa Saiman
- Patricia Sime
- Stefan Worgall
- Tilla S. Worgall

#### **NORTH CAROLINA**

- Adler Kenneth B.
- Robert Aris
- Michael Boyle
- Douglas Cyr
- Charles Esther
- Martina Gentzsch
- Andrew Ghio
- Anthony Hickey
- Mehmet Kesimer
- Michael Knowles
- Alessandra Livraghi-Butico
- Marianne Muhlebach
- Carla Ribeiro
- John Riordan
- Gabriel Sherif
- Robert Tarran

#### **OHIO**

- Amal Amer
- Melvin Berger
- Tracey L. Bonfield
- Robert A. Bonomo
- Maria Britto
- James Chmiel
- Estelle Cormet-Boyaka
- Mitchell Drumm
- Dana S. Hardin
- Ann Harris
- Daniel Hassett
- Scott Herness
- Craig Hodges
- Lloyd Horrocks
- Valerie Hudson
- Christopher Karp
- Thomas J. Kelley
- Michael Konstan
- Benjamin Kopp
- Matthew Long
- Sanjay Rajagopalan
- Adriano Tonelli
- Donald VanDevanter
- Haitao Wen
- Daniel Wozniak

#### **OREGON**

- David C. Dawson
- Bruce L. Geller
- Xuehong Liu

#### **PENNSYLVANIA**

- Jennifer Bomberger
- Robert Bucki

- Rebekah Marie Dedrick
- Raymond Frizzell
- Andrea Kelly
- David Orenstein
- Paul J. Planet
- Ibrahim Tarik Ozbolat
- Keven Mara Robinson
- Ronald Rubenstein
- Douglas Wilson

#### **SOUTH CAROLINA**

- Patrick Flume

#### **TENNESSEE**

- John Christman
- Michael Laposata
- Vasilij V. Polosukhin

#### **TEXAS**

- Carolyn Cannon
- Brian R Davis
- Tawanda Gumbo
- Raksha Jain
- Sunhee Lee
- Sergey Shevkopyas
- Philip Thomas

#### **UTAH**

- My N. Helms
- Valerie Hudson
- Guy Zimmerman

#### **VERMONT**

- Daniel J. Weiss

#### **VIRGINIA**

- Joanna Goldberg
- Apparao Kummarapurugu
- Dennis E. Ohman
- Bruce Rubin
- Brian Wattenberg

#### **WASHINGTON**

- Moira Aitken
- Jane Burns
- Chris Goss
- E. Peter Greenberg
- Lucas Hoffmann
- Samuel I. Miller
- Matt Parsek
- Margaret Rosenfeld
- Sina Tavakoli

#### **WISCONSIN**

- Philip Farrel
- Krishanu Saha
- Don Sanders

## **Aknowledgment**

The Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (FFC Ricerca) wishes to thank all the reviewers who have so far contributed to evaluate research proposals submitted annually to the Foundation. Their strong commitment to critical analysis and targeted suggestions have helped to optimally qualify the activities of the FFC Ricerca research network.

# Appendix 4

FFC Ricerca Projects (2022-2024) adopted by Supporters

*Progetti FFC Ricerca (2022–2024) adottati da Sostenitori FFC Ricerca*

## **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2024-2026. GENDEL-CF. STRATEGIE DI TRASFERIMENTO GENICO NEI POLMONI PER IL TRATTAMENTO DELLA FIBROSI CISTICA**

Responsabile: **Anna Cereseto** (Dipartimento CIBIO dell'Università di Trento)

Finanziamento: 1.870.207 €

Adottato da: **Lascito Anna Cantelli** (€ 490.000); **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna** (€ 100.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Insieme per Giulia Sofia"** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello** (€ 30.000), **Delegazione FFC Ricerca di Torino** (€ 30.000), **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000), **Doniamoci - Fundraising Dinner** (€ 42.000), **Delegazione FFC Ricerca di Reggello Firenze** (€ 30.000), **Associazione Fibrosi Cistica Alto Adige ODV** (€ 35.000), **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 50.000), **Loifur Srl** (€ 14.000), **Lega Italiana Fibrosi Cistica Emilia - Onlus** (€ 20.000), **Project Hope - Rosa Pastena** (€ 12.000), **Delegazione FFC Ricerca Val d'Alpone** (€ 60.000), **MinervaHub per la ricerca** (€ 10.000), **Parker** (€ 27.650), **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani** (€ 50.000), **Delegazione FFC Ricerca di Bolzano** (€ 20.000), **Imprese unite per la ricerca** (€ 30.000), **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 30.000), **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna** (€ 100.000), **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 45.000), **Antonio Guadagnin & Figlio srl** (€ 10.000), **Delegazione FFC Ricerca di Verbania** (€ 14.000), **Delegazione FFC Ricerca di Napoli con il Gruppo di Sostegno FFC Ricerca di Vitulazio** (€ 50.000), **Associazione Trentina "Dedicato a Efreim Gottoli"** (€ 60.000), **Delegazione FFC Ricerca di Messina** (€ 15.000)

Adottabile per € 466.207

## **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2024. 1 SU 30 E NON LO SAI. FASE 3 UNA CAMPAGNA DI INFORMAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE SUL TEST DEL PORTATORE SANO DI FIBROSI CISTICA**

Responsabile: **Valeria Merighi** (Comunicazione e Pubbliche Relazioni FFC Ricerca), **Carlo Castellani** (Centro Fibrosi Cistica, Istituto Giannina Gaslini, Genova)

Adottato da: **Roberto 50** (€ 8.000); **Armitoteatro** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cecina e Rosignano** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Crotona "Vita in te ci credo"** (€ 10.000).

Adottabile per € 192.000.

## **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2021-2023.**

### **MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA. FASE 3. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA**

Responsabile: **Paola Barraja** (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo); **Luis J. V. Galiotta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: € 187.200.

Adottato totalmente da: **Rotary Club di Verona e Provincia** (€ 28.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bologna** (€ 114.700); **Delegazione FFC Ricerca Fibrosirun Monza Brianza** (€ 40.000).

### **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2023-2025. MOLECOLE 3.0 PER LA FIBROSI CISTICA. FASE 4. NUOVI MODULATORI FARMACOLOGICI PER IL RECUPERO DELLA PROTEINA CFTR MUTATA**

Responsabili: **Paola Barraja** (STEBICEF - Laboratorio di sintesi degli eterocicli, Università di Palermo); **Luis Galiotta** (Istituto Telethon di Genetica e Medicina - TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani** (€ 50.000); **Delegazione di Palermo** (€ 50.000); **Rotary Distretto 2060** (€ 28.000)

Adottabile per € 62.050.

## **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2023-2024.**

### **ESPERTI INSIEME. MIGLIORARE L'INTEGRAZIONE E LA CONDIVISIONE DEGLI OBIETTIVI FRA LA COMUNITÀ FC E IL MONDO DELLA SCIENZA E DELLA RICERCA**

Responsabile: **Michele Gangemi** (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

Finanziamento: 45.000 €.

Adottato totalmente da: **UniCredit** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 10.000); **Latteria Montello S.p.A.** (€ 15.000)

## **PROGETTO STRATEGICO FFC RICERCA 2023-2025.**

### **KAFTRIO NELLA VITA REALE. EFFICACIA E SICUREZZA DI KAFTRIO NELLA VITA REALE: STUDIO ITALIANO OSSERVAZIONALE E MULTICENTRICO**

Responsabile: **Cesare Braggion** (Direzione Scientifica, Area Ricerca Clinica FFC Ricerca)

Ricercatore principale: **Maria Cristina Lucanto** (Centro Regionale di Riferimento per la Fibrosi Cistica di Messina)

Finanziamento: € 328.000.

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo - Ospedaletti** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Genova** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Brindisi Torre** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 52.000); **Delegazione FFC Ricerca Cosenza Sud** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia** (€ 8.000)

#### **► FFC#16/2021 - Valutazione delle proprietà antibatteriche del Kaftrio**

Responsabile: **Cristina Cigana** (Unità Infezioni e Fibrosi Cistica, divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto San Raffaele Milano)

Finanziamento: 104.000 €. Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma Vaticano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa Siracusa** (€ 19.500); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 19.500).

#### **► GMSG#1/2022 - Sviluppo di sistemi di trasporto per la tecnologia CRISPR-Cas per la cura della fibrosi cistica**

Responsabile: **Giulia Maule** (Dip. di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata CIBIO, Università di Trento)

Finanziamento: 149.00 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Val d'Alpone** (€ 80.000); **Together for Life** (€ 69.000)

#### **► FFC#1/2022 - Strategie terapeutiche basate sui lipidi per il recupero di CFTR con mutazioni orfane di terapia e per contrastare le infezioni batteriche in fibrosi cistica**

Responsabile: **Massimo Aureli** (Università di Milano, Dip. Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale)

Finanziamento: 130.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Crevalcore** (€ 60.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 70.000)

#### **► FFC#2/2022 - Caratterizzazione del meccanismo di azione di modulatori di CFTR attraverso tecniche di analisi chimica, come la marcatura indotta da foto-attivazione**

Responsabile: **Fabio Bertozzi** (Istituto Italiano di Tecnologia IIT Genova)

Finanziamento: 63.000 €.

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Bolzano** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 23.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Insieme per Giulia Sofia"** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 10.000).

#### **► FFC#3/2022 - Ripristino dell'attività di CFTR con mutazioni rare attraverso un peptide derivato dall'enzima PI3Kγ**

Responsabile: **Emilio Hirsch** (Dip. di Biotecnologia Molecolare e Scienze della Salute, Università di Torino)

Finanziamento: 128.000 €



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Messina** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cerea “Il sorriso di Jenny”** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Chivasso** (€ 15.000); **“Un fiore per Valeria” Assemini Cagliari** (€ 12.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Seregno** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Olbia** (€ 21.000); **Delegazione FFC ricerca di Manciano Grosseto e famiglia Catalano** (€ 12.000).

► **FFC#4/2022 - Derivati del peptide esculentina come agenti terapeutici con attività antimicrobica e potenziatrice di CFTR per il trattamento della patologia polmonare della fibrosi cistica**

Responsabile: **Maria Luisa Mangoni** (Dip. Scienze Biochimiche, Università La Sapienza, Roma)  
Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Roma** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 65.000)

► **FFC#5/2022 - Sviluppo di inibitori dell'assorbimento del ferro come farmaci innovativi per il trattamento di infezioni resistenti da *M. abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica**

Responsabile: **Laurent Robert Chiarelli** (Laboratorio di Microbiologia molecolare, Dip. Biologia e Biotecnologia “Lazzaro Spallanzani”, Università di Pavia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca Miriam Colombo – Ospedaletti** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Grado – Gorizia** (€ 10.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Benevento** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Monterotondo Roma** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Trieste** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sassari Castelsardo** (€ 58.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vigevano** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecce** (€ 8.000).

► **FFC#6/2022 - Ricerca di combinazioni di farmaci capaci di eliminare *Mycobacterium abscessus* nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Federico Giannoni** (ISS, Dip. Malattie Infettive)

Finanziamento: 70.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli**

► **FFC#7/2022 - Identificazione dei tipi di *Mycobacterium abscessus* presenti in Italia e dei biomarcatori dell'ospite per caratterizzare l'infezione da micobatteri in fibrosi cistica**

Responsabile: **Nicola Ivan Lorè** (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Finanziamento: 128.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 25.000); **Kymos Srl SB** (€ 9.000); **Antonio Guadagnin & Figlio Srl** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Martinsicuro Teramo** (€ 22.000); **LIFC Toscana Onlus** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cecina e Rosignano** (€ 54.000)

► **FFC#8/2022 - Usare la proteina STING come bersaglio specifico per combattere le infezioni batteriche nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mauro Piacentini** (Dip. Biologia, Università Roma Tor Vergata)

Finanziamento: 68.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Imola e Romagna**

► **FFC#9/2022 - L'effetto degli stimoli infiammatori sul trasporto degli ioni nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica**

Responsabile: **Luis J. V. Galletta** (Telethon Institute of Genetics and Medicine - TIGEM, Pozzuoli, NA)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria, Ragusa e Siracusa** (€ 65.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Masciacchia** (€ 65.000).

► **FFC#10/2022 - Verso lo sviluppo del composto GY971a come farmaco antinfiammatorio per la fibrosi cistica**

Responsabile: **Ilaria Lampronti** (Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)

Finanziamento: 117.750 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pesaro con Delegazione FFC Ricerca di Rivarolo Canavese e Delegazione FFC Ricerca di Parma Fidenza** (€ 87.750)

► **FFC#11/2022 - Inibire il meccanismo di attivazione piastrinica come strategia per spegnere l'infiammazione polmonare in fibrosi cistica**

Responsabile: **Domenico Mattoscio** (Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Univ. Chieti-Pescara)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Cuneo Alba**

► **FFC#12/2022 - Valutazione delle interazioni tra i batteriofagi e il sistema immunitario dell'ospite in modelli di fibrosi cistica: un passo verso l'applicazione della terapia fagica**

Responsabile: **Anna Silvia Pistocchi** (Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale Biometra, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 59.400 €

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica ODV “In ricordo del Professor Gianni Mastella”**

► **FFC#13/2022 - Una strategia terapeutica combinata di liposomi/Kaftrio/antibiotico per il trattamento di infezioni da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maurizio Fraziano** (Dip. di Biologia, Università di Roma “Tor Vergata”)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Saviano** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Padova** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Latina** (€ 25.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Genova “Mamme per la ricerca”** (€ 22.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 22.000).

► **FFC#14/2022 - Sfruttare l'effetto mucolitico di un enzima DNase perfezionato per il trattamento della malattia polmonare nella fibrosi cistica**

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

Finanziamento: 96.400 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 14.000); **Intesa Sanpaolo** (€ 17.500); **Donazione in memoria** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca Altomilanese – Legnano** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecco Valsassina** (€ 26.900).

► **FFC#15/2022 - Usare gli anticorpi come potenziali biomarcatori per la diagnosi e la terapia dell'aspergillosi broncopolmonare allergica nei bambini con fibrosi cistica**

Responsabile: **Teresa Zelante** (Dip. di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia)

Finanziamento: 130.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Verbania e V.C.O.** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fermo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Fabriano Ancona** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valpolicella** (€ 36.000); **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 60.000).

► **GMSG#1/2023 - Messa a punto di un modello 3D di tessuto respiratorio per studiare l'infiammazione in fibrosi cistica**

Responsabile: **Roberto Plebani** (Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università G. d'Annunzio di Chieti-Pescara)

Finanziamento: 159.162 €

Adottato totalmente da: **Together for life**

► **GMR#1/2023 - Espianti di polmone di maiale come nuovo modello per testare la terapia fagica contro infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica**

Responsabile: **Marco Cafora** (Dip. Biotecnologie mediche e Medicina traslazionale, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 105.000 €

Adottato da: **Donatori regolari FFC Ricerca** (€ 70.000), **Delegazione FFC Ricerca di Novara** (€ 8.000), **Delegazione FFC Ricerca di Belluno** (€ 27.000).

► **FFC#1/2023 - Studio degli effetti secondari del Kaftrio sui grassi che compongono le cellule**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Istituto Italiano di Tecnologia - IIT Genova)

Finanziamento: 73.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 53.500); **Gruppo di Sostegno FFC Ricerca Palo del Colle** (€ 20.000)

► **FFC#2/2023 - Esplorare i percorsi cellulari della proteina CFTR mutata per potenziarne il recupero**

Responsabile: **Carlos M. Farinha** (BioISI - Biosystems and Integrative Sciences Institute, University of Lisboa, Portugal)

Finanziamento: 136.465 €

Adottato totalmente da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Vimerate - in ricordo di Gloria** (€ 94.000); **Armito Teatro - Delegazione FFC Ricerca di Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Nichelino e Moncalieri** (€ 30.465)

► **FFC#3/2023 - Studio dei meccanismi alla base della variabilità di risposta ai modulatori di CFTR della mutazione N1303K su cellule nasali primarie**

Responsabile: **Renata Bocciardi** (Dip. di neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili - DINOGMI, Università degli Studi di Genova)

Finanziamento: 135.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Genova "Mamme per la ricerca"** (€ 60.000); **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 76.500)

► **FFC#4/2023 - Strategia del cavallo di Troia per migliorare il trattamento delle infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Andrea Battistoni** (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 73.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"** (€ 35.000); **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Luciano Rossi** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 18.500)

► **FFC#5/2023 - Oltre il polmone: studiare il ruolo dell'intestino nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Alessandra Bragonzi** (Unità Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Palermo e Trapani - #8maggioèpersempre2023 in memoria di Costanza** (8.000€)

► **FFC#6/2023 - Individuare nuovi farmaci contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* mediante l'approccio di screening virtuale**

Responsabile: **Silvia Buroni** (Dip. Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani", Università di Pavia)

Finanziamento: 210.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Campiglione Fenile** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vigevano** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Boschi Sant'Anna Minerbe "Alla fine esce sempre il sole"** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lecco Valassina** (€ 59.000); **Delegazione FFC Ricerca di Padova** (€ 25.000).

► **FFC#7/2023 - Valutazione del potenziale dell'antibiotico cefiderocol su *Pseudomonas aeruginosa* per il trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica**

Responsabile: **Barbara Citterio** (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche, Università di Urbino)

Finanziamento: 126.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Belluno** (€ 12.000); **Adare Pharma Solutions** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cecina e Rosignano** (€ 24.000); **Amici della ricerca** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Prato** (€ 28.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pavia** (€ 20.000).

► **FFC#8/2023 - Nanoparticelle inalabili per la somministrazione di combinazioni di molecole antimicrobiche nel trattamento delle infezioni polmonari in fibrosi cistica**

Responsabile: **Eugenio Notomista** (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli** (€ 32.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Vitulazio** (€ 8.000); **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Maria Gardumi e Alba Leveghi** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa e Siracusa** (€ 76.500)

► **FFC#9/2023 - Valutazione dell'efficacia del nuovo antibiotico "VOMG" contro *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Maria Rosalia Pasca** (Dip. di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, Università degli Studi di Pavia)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato totalmente da: **Donazione Carolina Sabatini** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Siniscola Nuoro** (€ 50.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Casale Monferrato** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca della Valdadige** (€ 18.000); **Delegazione FFC Ricerca di Crevalcore** (€ 25.500).

► **FFC#10/2023 - Riposizionamento di farmaci per inibire l'adattamento di *Pseudomonas aeruginosa* all'ambiente polmonare nelle persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Giordano Rampioni** (Dip. di Scienze, Università Roma Tre, Roma)

Finanziamento: 66.150 €

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Otello Pegoretti** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Morbegno** (€ 36.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 10.150)

► **FFC#11/2023 - Risoluzione delle infezioni da *Mycobacterium abscessus* con una terapia ispirata ai fagi**

Responsabile: **Loris Rizzello** (Istituto Nazionale Genetica Molecolare - INGM, Milano)

Finanziamento: 73.500 €

Adottato da: **Associazione Trentina Fibrosi Cistica Odv - In ricordo di Silvio Pellegrini** (€ 20.000)

Adottabile per 53.500 €

► **FFC#12/2023 - Rieducare il sistema immunitario dell'ospite a neutralizzare l'infezione da *Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Edoardo Scarpa** (Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Firenze** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 30.000)

Adottabile per 91.500 €

► **FFC#13/2023 - Costruire strutture derivate da *Pseudomonas aeruginosa* per stimolare il sistema immunitario dell'ospite contro il batterio**

Responsabile: **Marco Sette** (Dip. di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata")

Finanziamento: 210.000 €

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca del Lago di Garda**

► **FFC#14/2023 - Identificazione dei meccanismi molecolari che portano all'attivazione delle cellule immunitarie Th1/17 patogeniche in fibrosi cistica**

Responsabile: **Maira Paroni** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 210.000 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vercelli** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 50.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Ghedi** (€ 40.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca "Il Sogno di Aiden"** (€ 40.000); **Amici della Ritty** (€ 40.000)

► **FFC#15/2023 - Melanocortine per controllare l'infiammazione nella fibrosi cistica**

Responsabile: **Mario Romano** (Dip. di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università G. d'Annunzio di Chieti-Pescara)

Finanziamento: 136.500 €

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pesaro - Delegazione FFC Ricerca di Parma Fidenza - Delegazione FFC Ricerca di Torino Rivarolo Canavese** (€ 80.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pescara - Gruppo di sostegno FFC Ricerca della Valle Peligna e della Marsica** (€ 10.000); **LIFC Abruzzo** (€ 16.5000)

► **FFC#16/2023 - Affrontare la resistenza alla terapia fagica di batteri *Pseudomonas aeruginosa* isolati da persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Federica Briani** (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Finanziamento: 113.085 €

Adottato da: **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Saviano** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 43.085).

► **FFC#1/2024 - Ottimizzazione di nuovi potenziatori attivi su mutazioni (ultra)rare di CFTR che non rispondono alle terapie farmacologiche disponibili**

Responsabile: **Giovanni Marzaro** (Dip. di Scienze del farmaco, Università di Padova)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Acqui Terme** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 36.500).

► **FFC#2/2024 - Studio sulla sicurezza di Kaftrio in gravidanza e in giovane età**

Responsabile: **Andrea Armirotti** (Analytical Chemistry Facility, Istituto italiano di tecnologia, Genova)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Miriam Colombo Ospedaletti – Imperia** (€ 15.000); **Delegazione FFC Ricerca di Genova “Mamme per la ricerca”** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca di Rovigo** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Paternò** (€ 33.425).

► **FFC#3/2024 - Promuovere il corretto ripiegamento della proteina CFTR mutata per potenziare l'azione dei correttori**

Responsabile: **Mauro Salvi** (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Padova)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Fibrosirun Monza Brianza** (€ 63.525).

► **FFC#4/2024 - Un approccio di terapia personalizzata con antinfiammatori e antiossidanti per aumentare l'efficacia dei modulatori di CFTR**

Responsabile: **Onofrio Laselva** (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Foggia)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca Valle Scrivia Alessandria** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Roma Pomezia** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vicenza** (€ 45.500); **Delegazione FFC Ricerca di Alberobello con volontari di Noci** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Latina** (€ 25.000).

► **FFC#5/2024 - Sviluppo di terapie non tradizionali contro *Pseudomonas aeruginosa* agendo su piccoli RNA batterici**

Responsabile: **Giovanni Bertoni** (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Val Camonica** (€ 73.290).

► **FFC#6/2024 - Avanzamenti della terapia fagica per il trattamento di infezioni batteriche polmonari da *Mycobacterium abscessus* in persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Mariagrazia Di Luca** (Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Pisa)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Napoli con Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Vitulazio** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Saviano** (€ 30.000); **Iniziativa #CorrerePerUnRespiro promossa dalla Delegazione FFC Ricerca di Milano** (€ 75.450).

► **FFC#7/2024 - Interrompere la comunicazione tra batteri, o quorum sensing, per contrastare le infezioni di *Pseudomonas aeruginosa***

Responsabile: **Sandra Gemma** (Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Siena)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Manciano Grosseto** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Verona** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Moncalvo Asti** (€ 35.000); **Delegazione FFC Ricerca di Crevalcore** (€ 28.450); **Delegazione FFC Ricerca di Fermo** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Milano - Milano Marathon** (€ 30.000).

► **FFC#8/2024 - Una terapia combinata contro le co-infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* in fibrosi cistica**

Responsabile: **Annalisa Guaragna** (Dipartimento Scienze Chimiche, Università Federico II, Napoli)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Tradate Gallarate** (€ 100.000); **Delegazione FFC Ricerca “Un fiore per Valeria” Assemini – Cagliari** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Montecitorio Roma** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Benevento** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Cosenza Sud** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Seregno** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Altamura** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Isili – Cagliari** (€ 23.300).

► **FFC#9/2024 - Il contributo di Kaftrio alle terapie contro i micobatteri non tubercolari in fibrosi cistica**

Responsabile: **Santiago Ramón García** (ARAID Foundation, Dipartimento di microbiologia, Università di Zaragoza, Spagna)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca “Il sogno di Aiden”** (€ 50.000); **Amici della ricerca** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Vittoria Ragusa** (€ 35.250); **Delegazione FFC Ricerca di Catania Mascalucia** (€ 35.250).

► **FFC#10/2024 - Approcci chimico-farmaceutici per identificare nuovi agenti anti-*Mycobacterium abscessus***

Responsabile: **Stefano Sabatini** (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Alba Cuneo** (€ 89.250).

► **FFC#11/2024 - GY971 come agente anti-infiammatorio 2.0**

Responsabile: **Ilaria Lampronti** (Dipartimento di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Treviso Montebelluna “Bottega delle donne”** (€ 40.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ferrara** (€ 10.000); **Delegazione FFC Ricerca di Torino** (€ 20.000); **Delegazione FFC Ricerca di Massafra** (€ 66.500).

► **FFC#12/2024 - Agire sul sistema immunitario per spegnere l'infiammazione delle vie aeree in fibrosi cistica**

Responsabile: **Domenico Mattosio** (Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università degli Studi “G. d'Annunzio” Chieti - Pescara).

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Como Dongo** (€ 80.000); **Delegazione FFC Ricerca di Codogno e Piacenza** (€ 20.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Martinsicuro Teramo** (€ 12.000); **Delegazione FFC Ricerca di Novara** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Pavia** (€ 8.000); **Delegazione FFC Ricerca di Ascoli Piceno** (€ 20.000).

Adottabile per 62.000 €.

► **FFC#13/2024 - Comprendere il ruolo dei modulatori di CFTR sulla risoluzione dell'infiammazione e delle infezioni nelle persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Antonio Recchiuti** (Università degli Studi “G. d'Annunzio” Chieti - Pescara, Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche)

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Cerea “Il sorriso di Jenny”** (€ 8.000); **Gruppo di sostegno FFC Ricerca di Grado – Gorizia** (€ 8.000).

Adottabile per € 104.500.

► **FFC#14/2024 - Conseguenze a lungo termine della carenza di secrezione di insulina ed effetti dei modulatori di CFTR**

Responsabile: **Alberto Battezzati** (Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Università degli Studi di Milano)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Palo del Colle** (€ 42.000).

► **FFC#15/2024 - Analisi dell'evoluzione dei fattori di virulenza e della resistenza antimicrobica di *Pseudomonas aeruginosa* in persone con fibrosi cistica**

Responsabile: **Martina Rossitto** (IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma)

Adottato da: **Delegazione FFC Ricerca di Belluno** (€ 90.000); **Delegazione FFC Ricerca di Roma** (€ 30.000); **Delegazione FFC Ricerca di Sondrio Valchiavenna** (€ 30.000).

Adottabile per € 60.000

► **GMSG#1/2024 - Studio di bersagli terapeutici alternativi per ripristinare la clearance mucociliare delle vie aeree FC**

Responsabile: **Michele Genovese** (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC Ricerca di Siniscola Nuoro** (€ 50.000); **Delegazione FFC Ricerca di Lodi** (€ 16.000); **Delegazione FFC Ricerca di Bologna** (€ 123.000).

► **GMRF#1/2024 - La superficie delle vie aeree come campo di battaglia contro i batteri**

Responsabile: **Daniela Guidone** (TIGEM, Pozzuoli, Napoli)

Adottato totalmente da: **La Mano Tesa Onlus** (€ 52.500)





### Presidenza

Matteo Marzotto  
Segreteria di presidenza: Gabriella Cadoni  
Tel. 045 8123597 - presidenza@fibrosicisticaricerca.it

### Consiglio di Amministrazione

**Presidente:** Matteo Marzotto  
**Presidente emerito:** Vittoriano Faganelli  
**Vicepresidenti:** Paolo Faganelli, Michele Romano  
**Consiglieri:** Riccardo Boatto, Raffaele Boscaini, Callisto Marco Bravi, Paolo De Capitani, Maurizio Sedgh Giuseppe Lauria Pinter, Patrizia Volpato

### Direzione scientifica

**Direttore:** Carlo Castellani  
**Vicedirettore:** Nicoletta Pedemonte  
**Segreteria scientifica:** Federica Lavarini  
Tel. 045 8127037 - federica.lavarini@fibrosicisticaricerca.it

### Gestione e promozione attività di ricerca clinica

Cesare Braggion  
cesarebraggion.133@gmail.com

### Gestione bandi e progetti di ricerca

Ermanno Rizzi  
Tel. 344 0221751 - ermanno.rizzi@fibrosicisticaricerca.it

### Comunicazione scientifica

Responsabile: Luisa Alessio  
luisa.alessio@fibrosicisticaricerca.it

### Comitato scientifico

**Presidente:** Paolo Bernardi  
**Consulenti:** Cesare Braggion, Paola Bruni, Roberto Buzzetti, Giulio Cabrini, Emilio Clementi, Antonella Mencacci, Michael Pusch, Gian Maria Rossolini

### Direzione di gestione

Giuseppe Zanferrari  
Tel. 045 8123597 - 333 3665597  
giuseppe.zanferrari@fibrosicisticaricerca.it

### Amministrazione

Responsabile: Gabriella Cadoni  
M. Bergamaschi, F. Morbioli, S. Sorio  
Tel. 045 8123597 - 7034 - 7025 - 3599  
gabriella.cadoni@fibrosicisticaricerca.it  
michela.bergamaschi@fibrosicisticaricerca.it  
francesca.morbioli@fibrosicisticaricerca.it  
silvia.sorio@fibrosicisticaricerca.it

### Comunicazione

Responsabile: Valeria Merighi  
J. Boarato, J. Bombana, S. Prando, G. Vrenna  
Tel. 045 8123567 - 7026  
valeria.merighi@fibrosicisticaricerca.it  
isabella.boarato@fibrosicisticaricerca.it  
jara.bombana@fibrosicisticaricerca.it  
silvia.prando@fibrosicisticaricerca.it  
giulia.vrenna@fibrosicisticaricerca.it

### Bilancio Sociale:

Marina Zanolli  
marina.zanolli@fibrosicisticaricerca.it

### Ufficio stampa scientifico:

SEC Newgate  
Federico Ferrari, Pietro Marciano  
ffricerca@secnewgate.it

### Ufficio stampa sociale:

Patrizia Adami, Carlotta Bergamini  
Tel. 333 3300469 - press@fibrosicisticaricerca.it

### Raccolta fondi e rapporti con il territorio

**Responsabile:** Fabio Cabianca  
L. Andreoli, A. Boni, G. Buemi, L. Fratta, C. Novaria  
Tel. 345 7423436; 045 8123605 - 7032 - 7033 - 7029 - 3604  
fabio.cabianca@fibrosicisticaricerca.it  
laura.andreoli@fibrosicisticaricerca.it  
anastasia.boni@fibrosicisticaricerca.it  
giusy.buemi@fibrosicisticaricerca.it  
laura.fratta@fibrosicisticaricerca.it  
caterina.novaria@fibrosicisticaricerca.it

### Corporate relations:

G. Bovi - Tel. 045 8127028  
giulia.bovi@fibrosicisticaricerca.it

### Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

c/o Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata  
Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona  
Tel. 045 8123438 - fondazione.ricerca@oavv.veneto.it

## DELEGAZIONI FFC RICERCA

### ABRUZZO

Pescara 3470502460  
3891384125

### BASILICATA

Montescaglioso 3343477508

### CALABRIA

"Vita in te ci credo" Crotona 3286146195  
Cosenza Nord 3490519433  
Cosenza Sud 3479041138  
Reggio Calabria 3425618929  
San Costantino Calabro 3887767773  
Soverato 3475283975

### CAMPANIA

Avellino 3493940749  
Napoli 3387032132  
Napoli e Pompei 081679151  
Saviano 3393185405

### EMILIA ROMAGNA

Bologna 3481565099  
Crevalcore 3806570161  
Ferrara 3474468030  
Fidenza 3346994359  
Imola e Romagna 3479616369  
Parma 0521386303

### FRIULI VENEZIA GIULIA

Trieste 3497246586

### LAZIO

Latina 3288042186  
Monterotondo 3496500536  
Pomezia 3491538838  
Roma 3318655610  
Vaticano 3282442701  
Viterbo 3392107950

### LIGURIA

"Mamme per la ricerca" Genova 3394195260  
"Miriam Colombo" Ospedaletti 3355881657  
Genova 3481634818

### LOMBARDIA

"Il Sogno di Aiden" Brescia 3389610601  
Codogno e Piacenza 3481113384  
Dongo 3343081368  
Fibrosirun 3338669217  
Franciacorta e Val Camonica 3406589530  
Gheddi 3336743788

### Legnana Altomilanese

Legnana Altomilanese 3468515264  
Lodi 3470969534  
Milano 335456809  
Morbegno 3496852688  
Pavia 3383950152  
Tradate Gallarate 3472441141  
Trescore Balneario 3384276716  
Valchiavenna 3337063142  
Valsassina 3389993582  
Vigevano 3392001843  
Villa D'Almè 3358369504  
Vimercate 339 6533050

### MARCHE

Ascoli Piceno 3204792114  
Fabriano 3478638704  
Fermo 3394758897  
Pesaro 3470191092

### PIEMONTE

"Insieme per Giulia Sofia" Cuneo 3334478856  
Acqui Terme 3661952515  
Alba 3336301943  
Biella 3319028525  
Campiglione Fenile 3496250546  
Moncalvo 3395819218

Novara 3317287449  
Nichelino e Moncalieri 3332923955  
Rivarolo Canavese 3479672344  
Torino 3288352087  
Valle Scrivia 3473095778  
Verbania e V.C.O. 3382328074  
Vercelli 3351264091

### PUGLIA

"A Carmen La Gioia" Taranto 3208715264  
Alberobello 3292113764  
Altamura 3347295932  
Foggia 3204848190  
Lecce 3883498587  
Massafra 3292025039  
Palo del Colle 3275527386  
Torre Santa Susanna 3272056244

### SARDEGNA

"Un fiore per Valeria" Assemini 3404046067  
Castelsardo 3388437919  
Olbia 3346655844  
Riola Sardo 3425133252  
Siniscola 3207953209  
Villasimius 3487162291

### SICILIA

Mascalucia 3331909983  
Melilli 3332005089  
Messina 3497109375  
Palermo e Trapani 3384124077  
Paternò 3487237760  
Vittoria, Ragusa e Siracusa 3386325645

### TOSCANA

Cecina e Rosignano 3406113886  
Firenze 3336485308  
Lucca 3403436289  
Manciano 3338221877  
Prato 3289076797  
Reggello 3287043136  
Siena 3485435913

### TRENTINO ALTO ADIGE

Bolzano 3279151521

### UMBRIA

Perugia 3711464395  
Umbertide Città di Castello 3209273469

### VENETO

"Alla fine esce sempre il sole" Boschi Sant'Anna Minerbe 3287140333  
"Il sorriso di Jenny" Cerea 3394312185  
"La bottega delle Donne" Montebelluna 3358413296  
Belluno 3735042705  
Bovolone 3483395278  
Lago di Garda 3487632784  
Monselice 3356035611  
Padova 3339304431  
Rovigo 3491252300  
Trevignano 3406749202  
Val d'Alpone 3289688473  
Valdadige 3406750646  
Valpolicella 3393316451  
Verona 3478480516  
Vicenza 3338877053

## GRUPPI DI SOSTEGNO FFC RICERCA

### ABRUZZO

Martinsicuro 3889400461  
Valle Peligna e della Marsica 3319351590

### BASILICATA

Tolve 3472306432  
Matera 3284546062

### CALABRIA

"In cammino con Francesco" Cassano allo Jonio 3463553586

### CATANZARO

Crotone 3407784226

### CAMPANIA

"Insieme per Costantino e Francesco" Serino - Avellino 3806592468  
Benevento 3474722532  
Golfo di Policastro 3288660690  
Vitulazio 3382230707

### EMILIA ROMAGNA

Comacchio 3396511817  
Faenza 3332531483  
Sassuolo 3335862932

### FRIULI VENEZIA GIULIA

Grado 3286523404

### LAZIO

Latina 3288042186  
Monterotondo 3496500536  
Pomezia 3491538838  
Roma 3318655610  
Vaticano 3282442701  
Viterbo 3392107950

### LIGURIA

"Natalina" Sarzana 3497665757  
Imperia 3395073139  
Spotorno 3343368141

### LOMBARDIA

"In ricordo di Teresa" Tresivio Ponte 3667338007  
Casarile 3392055787  
Cremona 3891191703  
Genivolta 3479345030  
Isola Bergamasca 3495002741  
Lainate 3483807009  
Magenta 3394887552  
Seregno 3384848262  
Val Seriana 3931462537

### MARCHE

Civitanova Marche 3493746720  
Falconara 3473329883

### MOLISE

Campobasso 3468744118

### PIEMONTE

Asti 3391295628  
Casale Monferrato 3926657566  
Chivasso 3396102082  
Ivrea 3357716637

### PUGLIA

Barletta 0883519569  
Bitritto 3401618950  
Grottaglie 3382493210  
Latiano 3476350915  
Manfredonia 3475012570  
San Giovanni Rotondo 3408789661  
Santeramo in Colle 3510515126

### SARDEGNA

Alghero 3478650806  
Isili 3888925391

### SICILIA

Medio Campidano 3497829841  
Agrigento 3290165039  
Capo D'Orlando 3319564678  
Marsala 3384116412  
Taormina 3474222790  
Tremestieri 3427197671

### TOSCANA

Arezzo 3807784658

Montecatini Terme 3277054157

### TRENTINO ALTO ADIGE

Ass.ne Trentina Fibrosi Cistica ODV 3405228888

Val Badia 3336911430

### VENETO

Adria 3772077527

Mirano 3401668645

**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica**

**fondazioneffricerca**

**Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica**

**fibrosicisticaricerca.it**



Tamberi ha  
affrontato nella  
sua carriera tante  
difficoltà, non  
arrendendosi mai.

E noi, con lui al  
nostro fianco,  
facciamo lo  
stesso.



Emma, ragazza con la fibrosi cistica e Gianmarco Tamberi, campione olimpico di salto in alto



Sostieni la ricerca per i malati  
ancora senza cura.

**A NATALE SCEGLI I DONI  
SOLIDALI FFC RICERCA**  
su [fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)



*Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - ETS*  
[fibrosicisticaricerca.it](http://fibrosicisticaricerca.it)