



VERONA
23-25
November 2023

**21ST
CONVENTION
OF INVESTIGATORS
IN CYSTIC FIBROSIS**
**XXI CONVENTION D'AUTUNNO
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA**

CENTRO CONGRESSI CAMERA DI COMMERCIO
Corso Porta Nuova, 96 · Verona



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

Risultati

124 (48,4% maschi) persone con FC con malattia polmonare severa sono state trattate con ETI per 2 anni: età media (SD) di 32,5 (10,5) anni, FEV1 medio 36,2 (12,0)% predetto. La variazione assoluta in punti di percentuale predetta del FEV1 alla fine del primo e del secondo anno di trattamento è stata, rispettivamente, +15 (13,9) e +172 (13,0) rispetto al basale. Due persone hanno sospeso ETI dopo 11 e 14 mesi di trattamento perché sottoposte a trapianto polmonare. In 5 persone ETI è stato sospeso temporaneamente (2 per rash cutaneo e 3 per l'elevazione delle aminotrasferasi). Un aumento di più di tre volte la soglia delle aminotrasferasi è stato registrato in 6 persone (4,8%).

Conclusioni

Studi di breve durata (3-12 mesi) hanno riportato una significativa variazione assoluta nel FEV1 dopo avvio di ETI in persone con FC e malattia polmonare avanzata. Il nostro studio ha mostrato un aumento prolungato della percentuale predetta del FEV1 di circa 15 punti nell'arco dei 24 mesi di follow-up.

Investigation of Kaftrio secondary effects on sphingolipid synthesis in the cells of the Kaftrio study in obese patients



Clockwise: Left to right, Dinu Ciobanu, Nara Liessi, Andrea Armitrotti, Valeria Capurro, Valeria Tomati, Nicoletta Pedemonte. In the picture below, from left to right, Nicoletta Loberto, Massimo Aureli, Rosaria Bassi, Dorina Dobi, Mar Garcia, Pietro Franceschi Aloy

51

Andrea Armitrotti¹, Nara Liessi¹, Dinu Ciobanu¹, Valeria Tomati², Valeria Capurro², Nicoletta Pedemonte², Rosaria Bassi³, Nicoletta Loberto³, Dorina Dobi³, Massimo Aureli³, Mar Garcia Aloy⁴, Pietro Franceschi⁴

¹ Analytical Chemistry Facility; Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genoa, Italy - ² UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genoa, Italy - ³ Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Italy - ⁴ Fondazione Edmund Mach, Trento, Italy (FFC#I/2021, concluded; FFC#I/2023, new)

Background and rationale

The role of lipids in many processes related to CTRR trafficking has been extensively documented. We have carried out a lipidomic investigation on F508del-CTFR CFBE41o- cells treated with CF drugs and we highlighted alterations in the sphingolipids metabolism. In another study, we used the same model to assess changes in expression levels and in the subcellular localization of around 5000 proteins of the human bronchial epithelium (BE) treated with VX-809. We discovered an extensive structural reorganization of mitochondria and peroxisomes associated with CTRR rescue and we validated our findings in primary cells.

Hypothesis and objectives

We performed a multi-omic investigation, focused on F508del-CTFR vs wild-type primary cells treated with ETI (elezactor, tezactor and vacactor) or control (DMSO) to identify changes in the lipidome and proteome of the BE associated with CTRR rescue. Data from BE from subjects carrying compound heterozygous minimal function mutations (MEMF) allowed us to discriminate between specific effects (related with CTRR rescue) and non-specific effects (related to the drug).

Essential methods

We analysed the lipidome and the proteome of BE cells from 10 subjects homozygous for F508del, 10 non-CF and 4 MEMF subjects treated with DMSO and ETI, for a total of 240 individual samples. On these samples, we have conducted the following studies: i) targeted quantification of sphingolipids; ii) investigation of GMI metabolism, enabled by the incorporation of 3H-sphingosine; iii) quantification of several hundred lipid species and iv) proteome-wide expression proteomics experiment.

Results

We demonstrated that an off-target effect of ETI is the alteration of the dihydroceramides/ceramides balance. Moreover, all untargeted data we collected so far, while showing a limited alteration of protein expression profiles, highlight very significant and diversified changes of the BE lipidome. These changes confirm and extend our previous findings and allowed us to clearly discriminate between specific and off-target effects of ETI.

Conclusions

We have conducted the most detailed multi-omic investigation of the F508del-CTFR BE undertaken so far and we specifically discriminated the alterations related to CTRR rescue from those related to non-specific effects of the drug. These results will hopefully lead to the development of new drugs and to the elucidation of the mechanisms behind adverse effects of ETI.

Appendix Project FFC#I/2023

We hypothesize that ETI is either a direct inhibitor of DEGSx or that it might impact on its levels of expression. DEGSx enzymes convert dihydroceramides (dhCer) into ceramides (Cer), thus controlling the homeostasis of dihydrosphingolipids in the cell. We want to investigate this hypothesis, with the aim to understand the mechanisms lying behind our observation. In the light of our data, we also want to investigate the impact of the drug on the liver, by searching for biomarkers of Kaftrio action on human hepatocytes.

Razionale dello studio

Il ruolo dei grassi in molti processi legati a CFTR è stato ampiamente documentato. Abbiamo effettuato un'analisi su cellule F508del-CFTR trattate con farmaci FC e abbiamo evidenziato alterazioni in alcuni tipi di grassi. In un altro studio abbiamo usato lo stesso modello per valutare i cambiamenti nella localizzazione di circa 5000 proteine nell'epitelio bronchiale umano (BE). Abbiamo scoperto una riorganizzazione strutturale dei mitocondri e dei perossisomi associata al recupero di CFTR e abbiamo convalidato i nostri risultati in cellule primarie.

Ipotesi e obiettivi

Abbiamo condotto esperimenti su cellule primarie ottenute da soggetti con FC e non-FC trattate con ETI (*elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor*) per identificare i cambiamenti nel lipidoma e nel proteoma del BE associati al recupero di CFTR. I dati provenienti da BE di soggetti portatori di mutazioni a funzione minima (MF/MF) ci consentono di discriminare tra effetti specifici (correlati al recupero di CFTR) ed effetti non specifici (correlati al farmaco).

Metodi

Abbiamo analizzato il lipidoma e il proteoma delle cellule BE di 10 soggetti con la mutazione F508del, 10 soggetti non FC e 4 soggetti MF/MF trattati con DMSO ed ETI, per un totale di 240 campioni. Su questi campioni, abbiamo condotto i seguenti studi: i) quantificazione mirata degli sfingolipidi; ii) studio del metabolismo di GML; iii) quantificazione di diverse centinaia di specie lipidiche e iv) analisi dei livelli di espressione proteica.

Risultati

Abbiamo dimostrato che un effetto non-specifico di ETI è l'alterazione dell'equilibrio tra due tipi di grassi (diidroceramidi e ceramidi). Inoltre, tutti gli altri dati che abbiamo raccolto finora, pur mostrando una limitata alterazione dei profili di espressione proteica, evidenziano cambiamenti molto significativi e diversificati del lipidoma. Questi cambiamenti confermano ed estendono i nostri risultati precedenti e ci hanno permesso di discriminare chiaramente tra gli effetti specifici e quelli non-specifici di ETI.

Conclusioni

Abbiamo condotto l'indagine molecolare più dettagliata intrapresa finora del F508del-CFTR BE e abbiamo discriminato in modo specifico le alterazioni legate al recupero di CFTR da quelle legate agli effetti non specifici del farmaco. Si spera che questi risultati portino allo sviluppo di nuovi farmaci e alla delucidazione dei meccanismi alla base degli effetti avversi dell'ETI.

Ipotizziamo che ETI sia un inibitore diretto di DEGS o che possa alterare la sua abbondanza nella cellula. DEGS è un enzima che converte le diidroceramidi (dhCer) in ceramidi (Cer). Vogliamo indagare questa ipotesi, con l'obiettivo di comprendere i meccanismi che stanno alla base della nostra osservazione. Alla luce dei nostri dati, vogliamo anche capire l'impatto del farmaco sul fegato, studiando possibili alterazioni del rapporto dhCer/Cer e ottenere indicazioni su potenziali effetti tossici.

Appendice Progetto FCC#1/2023

Linking *elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor* to infections in cystic fibrosis lung disease

Valutazione delle proprietà antibatteriche del Kaftrio



From the left, Cristina Giganà, Daniela Girelli, Ersilia Fiscarelli

Cristina Giganà¹, Daniela Girelli², Ersilia Fiscarelli³

¹ Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy - ² Cystic Fibrosis Microbiology Laboratory, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy - ³ Pediatric Hospital "Bambino Gesù", Rome, Italy
(FCC#16/2021, ongoing)

52

Background and rationale

Hypothesis and objectives

Essential methods

The CFTR modulator Kaftrio shows great promise. While it has the potential to greatly improve outcomes in people with cystic fibrosis (pwCF), marked variability in the response to treatment was reported in clinical studies.

We hypothesized that Kaftrio alters the nature of *Pseudomonas aeruginosa* infection by directly affecting bacterial off-targets. We aim to identify specific bacterial genetic and phenotypic changes associated with Kaftrio treatment, which may affect antibiotic resistance and/or host response, thereby affecting the effectiveness of this new therapy.

Longitudinal clonally-related isolates of *P. aeruginosa*, collected from pwCF before and after Kaftrio treatment, were characterized for relevant phenotypes (mucoidy, motility, pyocyanin, protease and biofilm production) and tested for susceptibility to antibiotics by minimum inhibitory concentration assay. The impact of clonal isolates at specific stages of treatment on inflammation was evaluated using bronchial epithelial wt- and F508del-CFTR cells by ELISA. Whole genome sequencing (WGS) was performed on isolates grown for 10 days in an artificial sputum medium.