PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4
COMPONENTE 2 – INVESTIMENTO 1.1 – "Fondo per il Programma Nazionale di Ricerca e Progetti di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN)"

Titolo del Progetto:
"Varianti dei canali del potassio KCNT nelle epilessie gravi: identificazione di nuovi meccanismi patogenetici e valutazione di nuove strategie molecolari e farmacologiche come approcci di medicina di precisione"

Responsabile del Progetto: Prof.ssa Maria Virginia Soldovieri
Responsabile di Unità: Prof. Francesco Miceli

Il presente progetto di ricerca si è concentrato sulle **Encefalopatie dello Sviluppo ed Epilettiche (Developmental and Epileptic Encephalopathies, DEEs)** associate a varianti patogenetiche del canale del potassio **KCNT2**, con l'obiettivo di promuovere lo sviluppo di strategie di **medicina di precisione** per queste rare e gravi patologie neurologiche. Il progetto ha perseguito tre obiettivi principali:

1. **Caratterizzazione funzionale delle varianti di KCNT2** identificate in pazienti affetti da DEEs, al fine di determinare come specifiche mutazioni alterino l'espressione e l'attività del canale.
2. **Identificazione e validazione di terapie farmacologiche**, comprendenti la valutazione di farmaci già disponibili in ambito clinico e l'individuazione di nuovi modulatori di KCNT2 in grado di correggere le alterazioni funzionali indotte dalle mutazioni.
3. **Sviluppo di oligonucleotidi antisenso allele-specifici (ASO)** come approccio terapeutico innovativo, finalizzato a sopprimere selettivamente i trascritti mutati di KCNT2 preservando al contempo la normale funzione del gene.

Principali risultati conseguiti
Il progetto ha raggiunto con successo la maggior parte degli obiettivi scientifici prefissati, producendo importanti progressi verso lo sviluppo di terapie di precisione per le encefalopatie epilettiche correlate a **KCNT2**.
Tra i principali risultati ottenuti si evidenziano:

- **Generazione e caratterizzazione di sei varianti di KCNT2** derivate da pazienti, che hanno consentito approfondite analisi biochimiche, elettrofisiologiche e farmacologiche.
- **Classificazione funzionale delle varianti patogenetiche**, dimostrando che diverse mutazioni determinano un **guadagno di funzione (Gain-of-Function, GoF)**, una provoca una **perdita di funzione (Loss-of-Function, LoF)**, mentre altre si comportano come polimorfismi benigni. Tali risultati rappresentano una base fondamentale per la selezione di strategie terapeutiche personalizzate.
- **Identificazione di composti già disponibili in clinica con potenziale terapeutico**, evidenziando che:
  - la **fluoxetina** contrasta efficacemente gli effetti di diverse varianti GoF di KCNT2;
  - la **loxapina** ripristina l'attività del canale nella variante LoF studiata.
- **Scoperta e ottimizzazione di nuovi modulatori dei canali KCNT**, tra cui **CPK51**, caratterizzato da una marcata efficacia nei confronti delle varianti patogenetiche GoF e da un profilo di sicurezza più favorevole rispetto ai composti attualmente disponibili.
- **Sviluppo di strategie basate su ASO allele-specifici**, che hanno dimostrato la soppressione selettiva dei trascritti mutati di KCNT2, fornendo una prova di principio per terapie di precisione mirate al gene. Sebbene siano necessari ulteriori studi per ottimizzarne l'efficacia, il progetto ha posto solide basi per il futuro sviluppo traslazionale.

Il progetto è stato finanziato dall'**Unione Europea – NextGenerationEU** nell'ambito del **PNRR – Missione 4 "Istruzione e Ricerca"**, favorendo la collaborazione tra l'**Università degli Studi del Molise** e l'**Università degli Studi di Napoli Federico II**. L'investimento europeo ha contribuito in modo significativo ad accelerare la ricerca verso trattamenti innovativi per le epilessie genetiche rare, generando nuove conoscenze scientifiche e ponendo le basi per future applicazioni traslazionali e cliniche.

PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4
COMPONENTE 2 INVESTIMENTO 1.1 – "Fondo per il Programma Nazionale di Ricerca e Progetti di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN)"

Titolo del Progetto: "KCNT potassium channels variants in severe epilepsies: identification of new pathogenic mechanisms and assessment of novel molecular and pharmacological strategies as precision-medicine approaches"

Responsabile del Progetto: Prof.ssa Maria Virginia Soldovieri
Responsabile di Unità: Prof. Francesco Miceli

This research project focused on **Developmental and Epileptic Encephalopathies (DEEs)** associated with pathogenic variants in the **KCNT2 potassium channel**, with the objective of advancing precision medicine strategies for these rare and severe neurological disorders. The project pursued three main goals:

1. **Functional characterization of KCNT2 variants** identified in patients with DEEs, to determine how specific mutations alter channel expression and activity.
2. **Identification and validation of pharmacological therapies**, including the evaluation of clinically available drugs and the discovery of novel KCNT2 modulators capable of correcting mutation-induced functional abnormalities.
3. **Development of allele-specific antisense oligonucleotides (ASOs)** as an innovative therapeutic approach to selectively suppress mutant KCNT2 transcripts while preserving normal gene function.

Main Results Achieved

The project successfully met the majority of its scientific objectives and generated significant advances toward precision therapies for KCNT2-related epileptic encephalopathies.
Key achievements include:

- **Generation and characterization of six KCNT2 patient-derived variants**, allowing detailed biochemical, electrophysiological and pharmacological investigations.
- **Functional classification of disease-causing variants**, demonstrating that several mutations produce gain-of-function (GoF) effects, one induces loss-of-function (LoF), while others behave as benign polymorphisms. This provides an essential framework for personalized therapeutic selection.
- **Identification of clinically available compounds with therapeutic potential**, showing that:
  - **Fluoxetine** effectively counteracts multiple GoF KCNT2 variants;
  - **Loxapine** restores channel activity in the investigated LoF variant.
- **Discovery and optimization of novel KCNT channel modulators**, such as **CPK51**, with strong activity against pathogenic GoF variants and a favorable safety profile compared with existing compounds.
- **Development of allele-specific ASO strategies**, demonstrating selective suppression of mutant KCNT2 transcripts and providing proof-of-concept for gene-specific precision therapies. Although further optimization is still required to improve efficacy, the project established a solid platform for future translational development.

The project was supported through the **European Union – NextGenerationEU** framework under the **PNRR – Mission 4 "Education and Research"**, enabling collaboration between the **University of Molise** and the **University of Naples Federico II**. The European investment has substantially accelerated research toward innovative treatments for rare genetic epilepsies, creating valuable scientific knowledge and laying the foundations for future translational and clinical applications.