

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



**DOTTORATO di RICERCA in SCIENZE PEDIATRICHE
CURRICULUM GENETICA (XXXII CICLO)**

Tesi di Dottorato

**“Verso un approccio personalizzato per il trattamento del difetto di
base in Fibrosi Cistica”**

Tutor: Dr. Federico Zara

Dottorando: Dr. Federico Cresta

Genova, 28/01/2020

Anno Accademico: 2018/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Fibrosi Cistica

1.1.1 Diagnosi

1.1.2 Caratteristiche cliniche

1.1.2.1 Malattia polmonare

1.1.2.2 Manifestazioni extrapolmonari

1.1.3 Trattamento

1.1.4 Prognosi

1.2 CFTR

1.2.1 Struttura della proteina CFTR

1.2.2 Funzioni della proteina CFTR

1.2.3 Classificazione delle mutazioni di CFTR

1.2.4 Espressione del fenotipo clinico

1.2.5 Modulatori CFTR

1.2.5.1 F508Del pazienti omozigoti

1.2.5.2 G551D e altre mutazioni di gating

1.2.5.3 Modulatori CFTR triplet

1.3 Gene therapy e editing genico

2. SCOPO DELLO STUDIO

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei dati

3.2 Raccolta dei campioni

3.3 Valutazione funzionale del flusso ionico

4. RISULTATI e DISCUSSIONE

4.1 Popolazione dello studio

5. CONCLUSIONI

6. BIBLIOGRAFIA

FC: Fibrosi Cistica
CFTR Regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica
IRT: Tripsinogeno immunoreattivo
BPCO: Broncopneumopatia cronica ostruttiva
PEx: Esacerbazioni polmonari
MRSA: *Staphylococcus aureus* *Meticillino-Resistente*
MSSA: *Staphylococcus aureus* *Meticillino-Sensibile*
PsA: *Pseudomonas aeruginosa*
OGTT: Test orale di tolleranza al glucosio
DIOS: Sindrome da ostruzione intestinale distale
NIV: Ventilazione non invasiva
PO: Somministrazione orale
FEV1: Volume espiratorio massimo nel I secondo
IVA: Ivacaftor
LUM: Lumacaftor
TEZ: Tezacaftor
BMI: Indice di massa corporea
FVC: Capacità vitale forzata
BC: Burkholderia cepacia

1. INTRODUZIONE

1.1 Fibrosi Cistica

La Fibrosi Cistica (FC) è la più frequente patologia genetica autosomica recessiva a prognosi severa, nella popolazione caucasica, con un'incidenza stimata di 1 su 2500-3300 sui nati vivi e con una frequenza di portatori di $1/25^1$ (dati del registro nazionale italiano aggiornati al 2014, incidenza 1-3500-4000). Il gene responsabile della FC è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 (Figura 1), e codifica per una proteina transmembrana, nota come Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)².

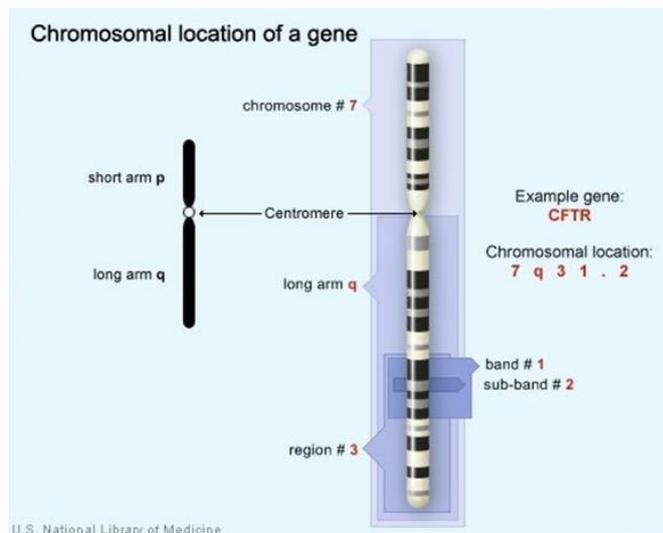


Figura 1: CFTR sul cromosoma 7

CFTR è un canale per il trasporto del cloro ATP-dipendente, espresso sulla membrana apicale cellulare in diversi organi, tra cui polmoni, ghiandole sudoripare, pancreas, tratto gastrointestinale e vasi deferenti. CFTR è inoltre coinvolto nella secrezione di bicarbonati e acqua attraverso il versante apicale della membrana cellulare, con conseguenze sul contenuto ionico delle secrezioni, sul loro pH e sulla densità delle secrezioni, caratteristici della patologia. La secrezione di cloro mediata da questo canale attraverso la cellula epiteliale è determinata sia dalla differente attività, sia dal numero totale di CFTR espressi sulla membrana plasmatica (Figura 2)³.

Ad oggi, sono riportate quasi 2000 mutazioni del canale CFTR, e tra queste, la più comune mutazione causa di malattia è la F508del⁴. In base alle conseguenze che la mutazione induce sul funzionamento e anche sulla quantità di proteina CFTR prodotta, si possono distinguere diverse classi note di mutazioni, come vedremo in seguito.

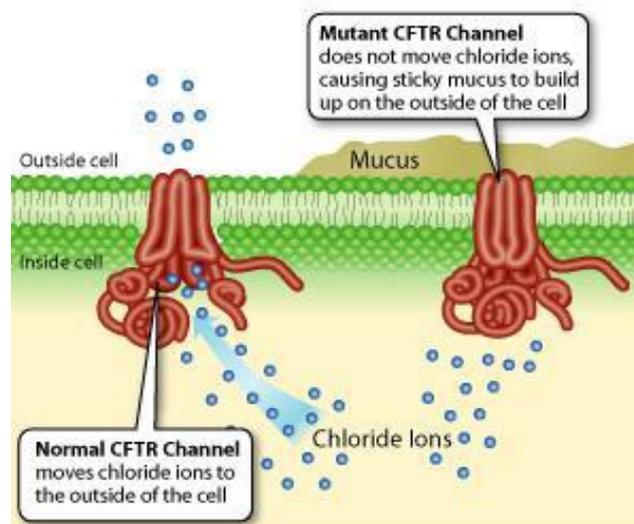


Figura 2: Canale CFTR normale e canale CFTR mutato

La correlazione genotipo-fenotipo in FC risulta molto labile ed è pertanto pressoché impossibile prevedere l'andamento prognostico unicamente in base al genotipo CFTR; il quadro fenotipico dipende anche inevitabilmente da fattori ambientali ed epigenetici, quali geni modificatori ed espressione di altri canali ionici non-CFTR.

1.1.1 Diagnosi

La diagnosi di FC classica si basa su sintomi clinici suggestivi associati ad un test del sudore positivo e/o genotipo CFTR conclusivo. Alla base del test del sudore, ancora considerato come il gold standard per la diagnosi, vi è un'anomalia nella secrezione ionica (Cl⁻) della membrana apicale delle ghiandole sudoripare. Il test misura la concentrazione di ioni Cl⁻ nel sudore, che risulta aumentato nei pazienti con FC: un risultato superiore a 60 mEq/L è considerato positivo, tra 30-60 mEq/L è considerato un valore limite, inferiore a 30 mEq/L è considerato negativo.

In Italia e in molti altri paesi si svolge un programma di screening neonatale per la FC, che consiste nella misurazione del tripsinogeno immunoreattivo (IRT), una proteina prodotta dal pancreas, su un campione di sangue prelevato dal tallone del neonato entro le prime 48h di vita⁵. I valori di IRT al di sopra del cut-off stabilito dal laboratorio attivano il processo di accertamenti diagnostici per sospetta FC.

Lo screening neonatale consente una diagnosi precoce della FC e avvio di interventi terapeutici che possono avere un impatto significativo sullo stato nutrizionale⁶. Recenti studi di imaging hanno riportato come già nei primi mesi di vita, in lattanti asintomatici, siano presenti segni di un danno polmonare precoce come: ispessimenti peribronchiali, air trapping e bronchiectasie (STUDIO AREST – Australia, 2009). La presa in carico tempestiva presso i centri specializzati con avvio di fisioterapia respiratoria e supporto nutrizionale può essere determinante nel migliorare l'outcome clinico a lungo termine.

1.1.2 Caratteristiche cliniche

1.1.2.1 Malattia polmonare

La malattia polmonare rappresenta la maggiore causa di morbilità e di mortalità nella FC. Il danno polmonare inizia precocemente ed è caratterizzato da compromissione della clearance mucociliare e dall'ostruzione da muco, con conseguenti infezioni polmonari croniche e infiammazione, che portano alla progressiva compromissione del parenchima. M Questo “circolo vizioso” di infiammazione e infezione con danno cronico alle vie aeree si traduce in danni anatomici e funzionali con comparsa di bronchiectasie, air trapping e alterazione degli scambi gassosi (con conseguenti ipossiemia e ipercapnia), che porta ad un quadro di insufficienza respiratoria cronica progressiva⁷. I polmoni dei bambini affetti da FC vengono colonizzati nel tempo da microrganismi che trovano un habitat a loro favorevole nelle secrezioni bronchiali dense tipiche della patologia.

Quanto descritto porta ad un progressivo declino della funzionalità polmonare, con episodi acuti di peggioramento della sintomatologia respiratoria, su base infettiva, indicati come esacerbazioni polmonari (PEx). A causa del difetto di base della FC, la riduzione quantitativa e qualitativa del liquido che ricopre gli epiteli respiratori determina una clearance mucociliare deficitaria, che porta all'ostruzione delle piccole vie aeree per formazione di mucoïd impactions .Per quanto premesso, le vie respiratorie non sono in grado di eliminare efficacemente batteri, virus, funghi e inquinanti atmosferici inalati.

Lo strato ispessito di muco che ricopre l'epitelio porta alla formazione di placche con aree ipossiche, che vengono colonizzate da batteri e altri agenti patogeni. I più rappresentati sono: *Staphylococcus aureus* Meticillino-Resistente (MRSA) e Meticillino-Sensibile (MSSA), *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus fumigatus* e micobatteri non tubercolari, con prevalenza dei singoli patogeni variabile in base all'età dei pazienti (Figura 3).

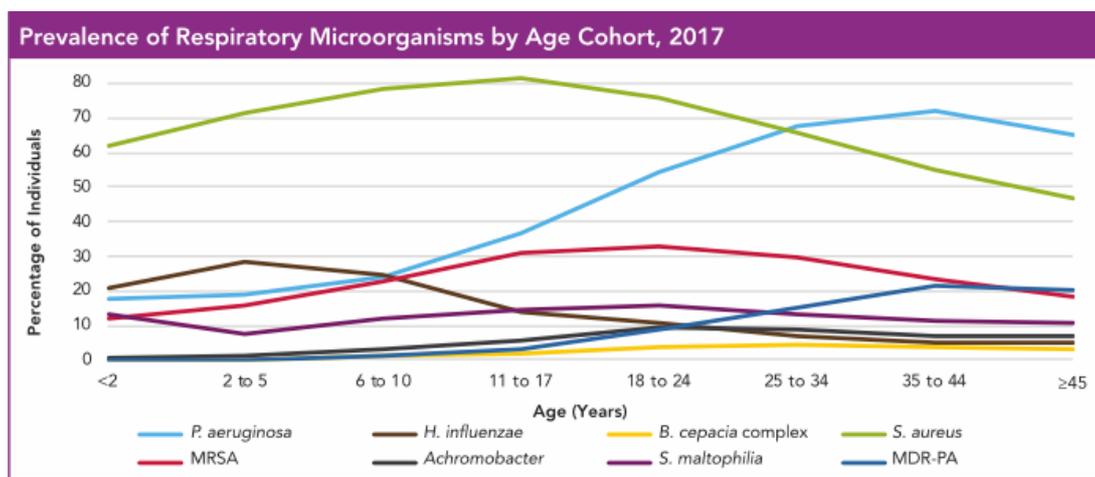


Figura 3: Prevalenza di microrganismi patogeni in base all'età, dati della Cystic Fibrosis Foundation, registro americano

1.1.2.2 Manifestazioni extrapolmonari

- Coinvolgimento pancreatico: l'insufficienza pancreatica esocrina è presente nell'85-90% dei pazienti, nella maggior parte dei casi già alla nascita⁸. Per quanto riguarda il coinvolgimento del pancreas endocrino è noto che il diabete correlato a FC (CFRD) è una frequente complicanza soprattutto nel paziente adulto, ed è prevalentemente secondario ad un deficit insulinico legato alla progressiva compromissione delle Isole di Langerhans; con prevalenza del 30-40% nella quarta decade di vita⁹. Il test orale di tolleranza al glucosio (OGTT) è il gold standard per la diagnosi del CFRD.
- Ileo da Meconio: nel 10% dei neonati affetti da FC è la prima manifestazione clinica che si verifica. La presentazione vede il combinarsi di distensione, vomito biliare e incapacità di emettere il meconio entro 48 ore dalla nascita.
- Sindrome da ostruzione intestinale distale (DIOS): è una complicanza rara negli adolescenti e negli adulti, caratterizzata dall'accumulo di materiale fecale viscoso nell'ileo terminale e/o nel colon destro.
- Malattia epatica: è nota la presenza di epatopatia FC correlata, ma meno del 10% dei pazienti ha malattia epatica clinicamente manifesta con ipertensione portale¹⁰. L'epatopatia si manifesta prevalentemente nei primi due decenni di vita. Frequenti i calcoli biliari colesterinici o di bilirubinato di calcio, come conseguenza della perdita cronica di sali biliari e dell'aumento della bilirubina non coniugata nel colon, che ne compromette il riassorbimento a questo livello.
- Infertilità: il 99%¹¹ dei maschi con FC sono infertili e l'anomalia più comune presente è l'assenza congenita dei vasi deferenti (CBAVD). Istologicamente, i testicoli sono normali e si verifica una spermatogenesi attiva. I maschi affetti da FC vengono inseriti nei programmi di procreazione medicalmente assistita come altri soggetti. Le femmine con FC hanno un normale tratto riproduttivo, sebbene la cervice possa essere funzionalmente compromessa¹².
- Rischio di disidratazione e alcalosi ipocloremica: in particolare nei primi anni di vita, a causa della perdita di cloruro e sodio nel sudore.
- Osteoporosi: condizione legata al malassorbimento della patologia di base.
- Malattia sinusale (rinosinusite cronica, poliposi, anosmia/iposmia): la prevalenza della rinosinusite nella popolazione con FC si aggira attorno al 90-100%^{13,14}. La rinosinusite cronica (CRS) è definita come¹⁵:
 - 1. infiammazione della mucosa nasale e dei seni paranasali caratterizzata da due o più sintomi, uno dei quali deve essere necessariamente ostruzione o secrezione nasale (gocciolamento nasale anteriore/posteriore): dolore alla compressione dei seni paranasali ± riduzione o perdita dell'olfatto ± tosse nei bambini

- 2. evidenza fibroscopica di:
 - polipi nasali e / o
 - secrezioni mucopurulente principalmente nel meato medio
 - edema/ostruzione delle mucose principalmente nel meato medio
- 3. Alterazioni alla TC dei seni paranasali: alterazioni tomodensitometriche a carico della mucosa all'interno del complesso ostiomeatale e / o dei seni.

1.1.3 Trattamento

Il management del paziente FC prevede l'intervento di un team multidisciplinare, comprendente medici, fisioterapisti, psicologi, dietologi, infettivologi, gastroenterologi.

I pazienti con FC seguono una terapia regolare e continuativa per prevenire il graduale deterioramento della funzionalità polmonare e per mantenere un buono stato nutrizionale.

Il programma di trattamento deve essere pianificato e avviato immediatamente dopo la presa in carico del paziente e include la terapia sostitutiva con estratti pancreatici nei pazienti con insufficienza pancreatica esocrina, la supplementazione con vitamine liposolubili e l'avvio di una dieta ipercalorica (intake calorico giornaliero pari al 150-200% rispetto a quello previsto per i soggetti sani di pari età e sesso). La terapia insulinica deve essere avviata nei pazienti con OGTT patologico, indicativo per intolleranza glucidica o quadro di CFRD.

La funzionalità polmonare è il determinante per definire la prognosi ed è strettamente correlata alle condizioni nutrizionali.

L'obiettivo principale della terapia FC è quello di facilitare la clearance delle secrezioni bronchiali, al fine di minimizzare il quadro flogistico ed infettivo a livello polmonare¹⁶.

Molteplici strategie terapeutiche sono impiegate a tal fine¹⁷:

- **Tecniche di drenaggio bronchiale.** Tali tecniche di fisioterapia respiratoria includono il drenaggio posturale, vibrazione e percussione, cicli attivi di respirazione e drenaggio autogeno (serie di respiri e colpi di tosse progettati per spostare il muco dalle vie aeree distali a quelle prossimali in modo da poter essere espulso)¹⁸.
- **Antibiotici per via inalatoria e sistemica.** Gli antibiotici sono il cardine della terapia contro le infezioni polmonari. Il trattamento varia da brevi cicli intermittenti di antibiotici orali ad un trattamento continuativo con uno o più antibiotici orali o inalati. Il trattamento con azitromicina continua orale (PO), che ha sia effetti immunomodulanti che antinfiammatori, viene spesso avviato al fine di migliorare la funzionalità polmonare e per ridurre la frequenza delle PEx. Gli antibiotici per via endovenosa (EV) sono indicati per i pazienti che hanno una riacutizzazione infettiva polmonare o una funzione polmonare in calo, nonostante un'intensa terapia domiciliare. L'antibiogramma delle colture espettorato viene eseguito anche per guidare la scelta degli antibiotici sulla base della sensibilità alle varie classi e solitamente, in particolare nei pazienti con colonizzazione polmonare cronica da *P. aeruginosa*, si preferisce intraprendere una terapia antibiotica combinata.

- **Mucolitici.** sono una terapia di prima linea nel paziente FC.
 - Pulmozyme® [Dornase alpha]: il razionale dell'utilizzo di questo enzima si basa sul fatto che la natura viscosa del muco nella FC è in gran parte dovuta alle catene di DNA che si liberano dall'apoptosi dei neutrofili presenti in gran numero nelle vie aeree. L'inalazione di DNasi umano ricombinante contribuisce a ridurre la viscosità del muco e l'utilizzo in cronico è associato ad un miglioramento della funzionalità polmonare e ad una riduzione delle PEx¹⁹.
 - Soluzione ipertonica: agisce come agente iperosmolare e conseguentemente reidrata lo strato liquido superficiale delle vie aeree, migliorando la clearance mucociliare. Solitamente si utilizza una soluzione salina ad una concentrazione del 6-7%, e in genere è ben tollerata²⁰.

- **Ossigenoterapia e assistenza ventilatoria non invasiva (NIV).** La NIV si basa sull'insufflazione e desufflazione meccanica dei polmoni utilizzando come interfaccia una maschera nasale o facciale, al fine di ridurre il lavoro respiratorio e migliorare gli scambi gassosi. Si dimostra essere la modalità ventilatoria più efficace nel trattamento dell'insufficienza respiratoria della FC. I dati della letteratura concordano nell'affermare che la NIV in FC migliora gli scambi gassosi, la tolleranza all'esercizio fisico e la dispnea²¹.
 In caso di ipossiemia cronica, l'utilizzo di ossigenoterapia è in grado di migliorare la sopravvivenza, l'emodinamica polmonare, la tolleranza allo sforzo e le prestazioni neuropsicologiche. L'ossigenoterapia è largamente utilizzata per alleviare i sintomi di dispnea e ritardare il possibile sviluppo di *cuore polmonare*²².

- **Il trapianto polmonare** è l'opzione terapeutica finale. Esistono linee guida internazionali per individuare il momento più adatto per l'invio del paziente al trapianto, ma rimane ancora incerta la tempistica secondo cui inserire il paziente in lista di attesa²³. I criteri considerati più importanti sono:
 - FEV1 al di sotto del 30% o in rapido declino, in particolare nelle giovani donne
 - Esacerbazione della malattia polmonare che richieda il ricovero in UTI
 - Aumento della frequenza delle esacerbazioni che richiedano terapia antibiotica
 - Pneumotorace refrattario e/o ricorrente
 - Emottisi ricorrente non controllata dall'embolizzazione delle arterie bronchiali²⁴

1.1.4 Prognosi

L'aspettativa di vita per i pazienti affetti da FC è aumentata negli ultimi decenni ed è attualmente (dati del registro americano) di circa 39,3 anni (Figura 4) (intervallo di confidenza del 95%: 37,3-41,4 anni)²⁵.

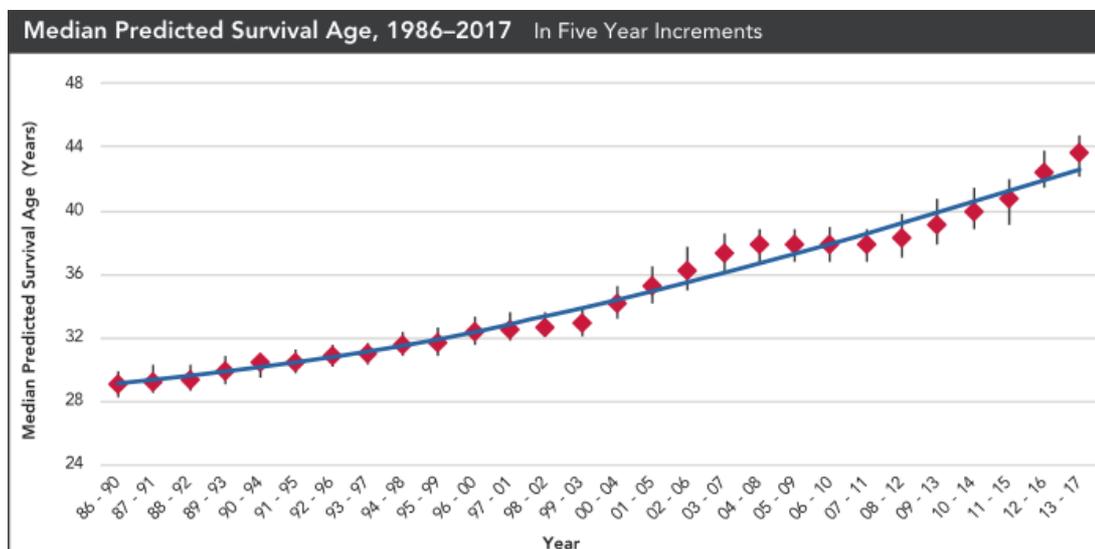


Figura 4: Aspettativa di vita²⁶

Infezioni polmonari croniche e malattia polmonare ostruttiva, che portano all'insufficienza cardiorespiratoria e al trapianto, sono le principali cause di morte (80%) (Figura 5).

Cause	Number of Individuals	Percent
Respiratory/cardiorespiratory	239	62.9
Transplant-related	61	16.1
Other	38	10.0
Unknown	24	6.3
Liver Disease/Liver Failure	13	3.4
Suicide or Trauma	5	1.3

Figura 5: Cause di morte

Tra i germi colonizzanti le vie respiratorie in FC, lo *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), batterio ambientale ubiquitario, è il patogeno più importante e prevalente, correlato ad incremento della frequenza delle PEX e riduzione della sopravvivenza²⁷.

L'età media alla morte di 448 persone con FC segnalate nel Registro americano nel 2015, era di 29,1 anni. Complessivamente, il 5% dei decessi si è verificato in soggetti di età inferiore a 13 anni. La metà dei decessi si è verificata tra 22 e 39 anni. Nel tempo, l'aumento dell'età media alla morte è stato più modesto di quello osservato nell'aspettativa di vita, ma è aumentato costantemente passando da un'età media alla morte di 22 anni nel 1995 a 25

anni nel 2005. Come detto in precedenza, l'età media della morte non può essere utilizzata per predire la sopravvivenza nell'intera popolazione (Figura 6).

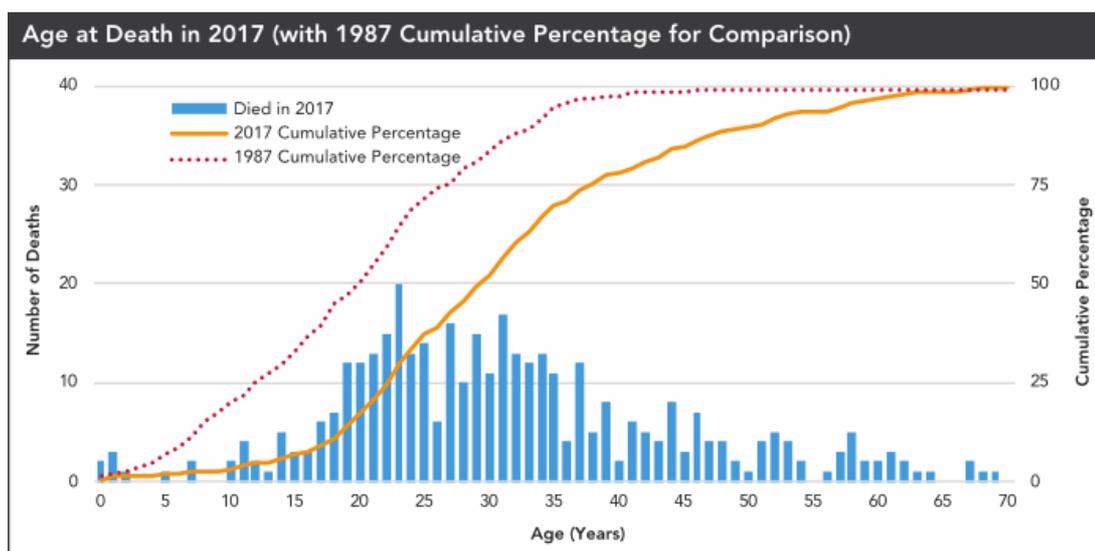


Figura 6: Età media alla morte

1.2 CFTR

1.2.1 Struttura della proteina CFTR

CFTR è un canale per il cloruro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) regolato da cAMP e cGMP, espresso principalmente sulle superfici apicali (luminali) delle cellule epiteliali che rivestono le vie respiratorie, l'intestino e le ghiandole esocrine, responsabile del trasporto transepiteliale di acqua e sali^{28,29,30}. CFTR è una proteina membro della superfamiglia delle ATP-binding cassette transporter e consiste di 1480 amminoacidi. CFTR è composto da due domini transmembrana (MSD1 e MSD2), due domini leganti nucleotidi (NBD1 e NBD2) e un dominio regolatore (R). Entrambe le estremità terminali, amminica (NH_2) e carbossilica (COOH), di CFTR mediano le sue interazioni con un'ampia varietà di proteine interattrici³¹. Il canale CFTR può essere attivato attraverso la fosforilazione del dominio R da varie protein-chinasi (ad esempio, protein-chinasi A cAMP-dipendente), dal legame con ATP e dall'idrolisi da parte degli NBD. L'attività del canale CFTR è determinata dalla quantità, dalla probabilità di apertura (P_o) dei canali sulla superficie della cellula e, dalla conduttanza del singolo canale. Le mutazioni nel gene CFTR alterano uno o più di questi parametri, causando l'alterazione o la perdita dell'attività del canale. Più di 2000 mutazioni sono state identificate per il gene CFTR, che vengono raggruppate da un punto di vista funzionale in cinque classi note; recentemente si è aggiunta una sesta classe di mutazioni³².

1.2.2 Funzioni della proteina CFTR

CFTR funziona come un canale i cui cambiamenti conformazionali ATP-dipendenti aprono e chiudono il passaggio per consentire un flusso transmembrana di anioni secondo il loro gradiente elettrochimico³³. Dati in letteratura suggeriscono che la malattia polmonare da FC sia ulteriormente aggravata dalla perdita di regolazione del canale trasportatore del

sodio a livello epiteliale (ENAC) come conseguenza del difetto di attività di CFTR, e non solo dalle anomalie nel trasporto del cloruro^{34,35}. Nella FC, la proteina CFTR disfunzionale porta ad una secrezione di cloruro assente o ridotta, aumento dell'assorbimento di sodio e acqua e deplezione di liquidi sulla superficie delle vie aeree. Ciò provoca la formazione di secrezioni viscosi e compromette la clearance mucociliare, causando le manifestazioni classiche della FC: infezioni, infiammazione ed eventuali bronchiectasie con graduale compromissione della funzionalità polmonare. I livelli di cloruro nel sudore sono solitamente elevati (> 60 mmol/L) nei pazienti con FC³⁶.

1.2.3 Classificazione delle mutazioni di CFTR

Le mutazioni CFTR sono state divise in sei diverse classi, sulla base del meccanismo col quale determinano la perdita di attività della proteina CFTR (Figure 7 e 8).

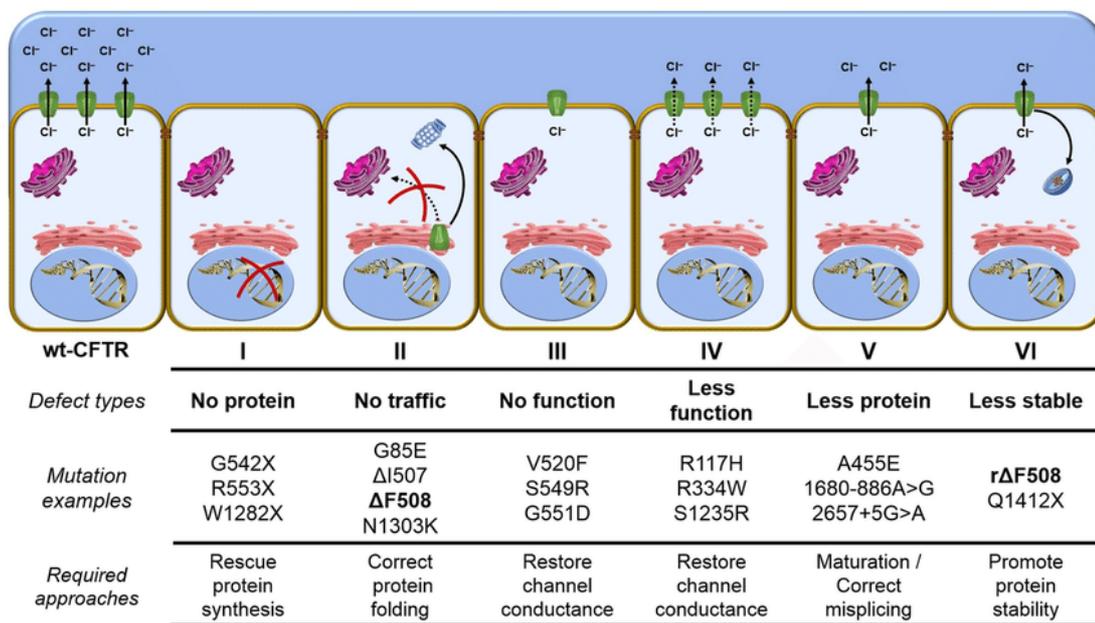


Figura 7: Classificazione mutazioni CFTR

Le mutazioni di **classe I** influenzano la biosintesi di CFTR. Queste mutazioni infatti determinano la produzione di un mRNA con un codone di stop prematuro, che porta alla sintesi di una proteina tronca, che viene riconosciuta dai meccanismi di controllo qualità del reticolo endoplasmatico e inviata alla degradazione via proteasoma. Oltre al difetto di sintesi proteica, nelle cellule è presente un altro meccanismo di sorveglianza, chiamato nonsense-mediated decay (NMD), caratterizzato da una elevata variabilità individuale. L'NMD è in grado di riconoscere, nelle molecole di mRNA, la presenza di codoni di stop prematuri, determinando la degradazione dell'mRNA stesso prima che possa iniziare l'eventuale sintesi proteica. Le mutazioni di classe I includono i fenotipi più gravi. Questo tipo di mutazioni è presente nel 5% -10% dei cromosomi di pazienti con FC in tutto il mondo, ma rappresenta circa il 60% delle mutazioni nei pazienti FC di etnia ebraica³⁷. La definizione per la mutazione nonsense termina con una X e gli esempi sono Trp1282X (in precedenza W1282X) e Gly542X (G542X).

Le mutazioni **di classe II** influenzano la maturazione di CFTR. La proteina mutata non riesce a ripiegarsi correttamente. Come conseguenza, viene riconosciuta dai meccanismi di controllo qualità del reticolo endoplasmatico e inviata alla degradazione via proteasoma, determinando una ridotta espressione di proteina CFTR sulla membrana apicale cellulare. Inoltre, in alcuni casi, la proteina mutata che riesce ad arrivare fino alla membrana plasmatica può presentare un difetto di attività (ad esempio, di classe III). La delezione F508del, la più frequente nei pazienti FC, appartiene a questo gruppo. Circa il 90% degli individui con FC sono eterozigoti e il 40% -50% è omozigote per F508del^{38,39}.

Le mutazioni di **classe III** influiscono sulla regolazione dell'apertura e chiusura (gating) del canale. La produzione e il traffico fino alla membrana della proteina CFTR mutata sono normali, ma quando la proteina arriva sulla superficie cellulare non risponde agli stimoli fisiologici (aumento dei livelli di cAMP) di attivazione, rimanendo chiusa per la maggior parte del tempo. La mutazione missenso Gly551Asp (precedentemente definita G551D) è la terza più comune mutazione di questa classe e causa una sostituzione glicina-aspartato al residuo 551⁴⁰. Circa il 4% -5% di tutti i pazienti con FC hanno la mutazione Gly551Asp in almeno un allele^{38,39}, sebbene questa mutazione sia più frequente nelle popolazioni di origine celtica (scozzese, irlandese, inglese)⁴¹.

Le mutazioni di **classe IV** influenzano la conduttanza del canale. La proteina CFTR raggiunge la superficie cellulare, ma la conformazione anomala del poro porta a una compromissione della conduttanza per gli ioni cloruro e/o bicarbonato, che determina un ridotto trasporto. Arg117His (in precedenza definita R117H) è la mutazione di classe IV più comune, con una frequenza del 2-4%^{38,39}. In questi casi si ha un'attività CFTR sufficientemente ridotta per sviluppare una malattia significativa, ma anche una quantità sufficiente di canali espressi sulla superficie della cellula per beneficiare della monoterapia con modulatori.

Le mutazioni CFTR di **classe V** influenzano la stabilità dell'mRNA. Lo splicing del messaggero è alterato, con conseguente generazione sia di mRNA normale, sia di mRNA anomalo. Ciò porta ad un numero ridotto di proteine CFTR funzionanti sulla membrana plasmatica, come è stato dimostrato per la mutazione di C.T 3849 + 10 kb⁴². Meno dell'1% dei pazienti con FC hanno mutazioni di classe V. Il livello di CFTR funzionante può variare tra i diversi pazienti e anche tra i diversi organi dello stesso paziente; frequentemente si traduce in un fenotipo clinico più lieve.

Le mutazioni CFTR di **classe VI** influenzano la stabilità del CFTR. Queste mutazioni, che spesso determinano il troncamento del terminale carbossilico di CFTR, producono una proteina funzionale che è instabile sulla superficie della membrana apicale, da cui viene quindi rimossa e inviata alla degradazione via lisosomiale. Un esempio è Gln1412X (precedentemente denominata Q1412X).

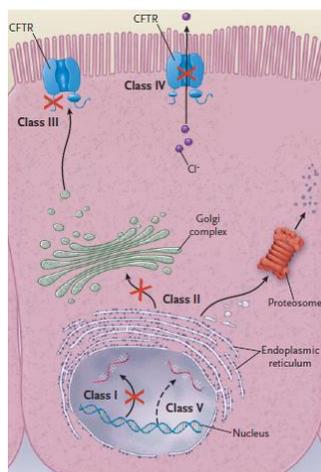


Figura 8: Classi di mutazioni CFTR

1.2.4 Espressione del fenotipo clinico

Il fenotipo è altamente eterogeneo tra i singoli pazienti FC e anche tra fratelli con medesimo genotipo CFTR. Le relazioni genotipo-fenotipo sono complesse e sono influenzate da molti fattori, tra cui geni modificatori e fattori esterni come inquinamento, fumo, infezioni batteriche, malnutrizione e alcuni farmaci⁴³. Tra i vari fenotipi clinici della FC, solo la funzione pancreaticca è ben correlata al genotipo CFTR⁴⁴. In particolare, si riscontra una variabilità fenotipica sostanziale per la malattia polmonare e spesso esiste una scarsa correlazione genotipo-fenotipo nei singoli pazienti.

Le mutazioni CFTR omozigoti o eterozigoti composte di classe I-III sono associate ad un'assenza o a una produzione gravemente ridotta di CFTR funzionale. In generale, questo si correla bene con un fenotipo più grave che comporta insufficienza pancreaticca (95% dei casi), epatopatia cronica (3% -5% dei casi), diagnosi precoce (in genere meno di un anno), alti livelli di cloruro nel sudore (80 mmol / L) e ileo meconio (circa il 20% dei casi)^{45,46,47,48}. Le mutazioni della classe IV, V e VI sono solitamente associate a una funzione residua di CFTR e una malattia più variabile e talvolta più lieve, con sufficienza pancreaticca (70% -80% dei casi), livelli inferiori di cloruro nel sudore, assenza di ileo meconio e malattia polmonare più lieve⁴⁸.

Il sistema di classificazione CFTR ha una serie di limitazioni. Molte delle mutazioni identificate rimangono non classificate⁴⁹. In particolare, le conseguenze funzionali di molte rare mutazioni (in particolare mutazioni missenso) rimangono sconosciute e le loro conseguenze fenotipiche non sono al momento prevedibili⁵⁰. Lo studio CFTR2 è un'iniziativa internazionale che si pone l'obiettivo di risolvere questa problematica fornendo informazioni funzionali e cliniche sulle mutazioni di CFTR, grazie ad un processo di review da parte di un panel di esperti⁵¹.

1.2.5 Modulatori CFTR

I modulatori di CFTR sono piccole molecole (composti chimici farmaco-simili) che mirano a migliorare la funzione delle proteine CFTR mutate, mediante approcci diversi⁵². Gli esempi includono:

- i potenziatori che promuovono il passaggio di ioni attraverso il canale CFTR (aumentando la probabilità di apertura del canale);
- i correttori che aumentano il ripiegamento, il processamento e il traffico alla membrana plasmatica della proteina CFTR mutata;
- gli stabilizzatori che aumentano il tempo di permanenza della variante CFTR sulla membrana plasmatica;
- gli amplificatori che aumentano la quantità di proteina mutata che viene prodotta, probabilmente stabilizzando la forma immatura, rendendola quindi disponibile per la successiva modulazione da parte dei modulatori di CFTR
- gli agenti che promuovono il superamento dei codoni di terminazione prematura in frame (PTC), di fatto sopprimendoli, permettendo la successiva sintesi proteica a livello dei ribosomi, con la produzione di una proteina CFTR di lunghezza completa (che ha però generalmente un aminoacido errato al livello del codone di stop soppresso).

Due classi di modulatori CFTR sono attualmente disponibili:

1) **Potenziatori** (approvati per individui con FC che hanno mutazioni che causano un difetto di attività di CFTR, attribuibili ad anomala apertura/chiusura e/o conduttanza, e varianti con funzione residua che dimostrano una migliore attività dopo il potenziamento). Il difetto di attività del canale CFTR mutato può essere trattato con piccole molecole di sintesi chiamate potenziatori (Figura 9). Con questo meccanismo d'azione agiscono composti chimici appartenenti alle classi dei flavonoidi, delle xantine e dei benzimidazoloni. A concentrazioni micromolari, tali composti aumentano l'attività del canale CFTR, sia selvatico che mutato. Negli ultimi anni la lista dei potenziatori è stata notevolmente ampliata attraverso lo screening su vasta scala di composti chimici. In questo modo sono state scoperte le fenilglicine, le sulfonamidi e le 1,4-diidropiridine che agiscono a concentrazioni nano molar^{53,54,55}. I potenziatori non sono utili solo per la mutazione F508del ma sono particolarmente efficaci sulle cosiddette mutazioni di classe 3, ad esempio G551D, in cui si osserva solo difetto di *gating*⁵⁶.

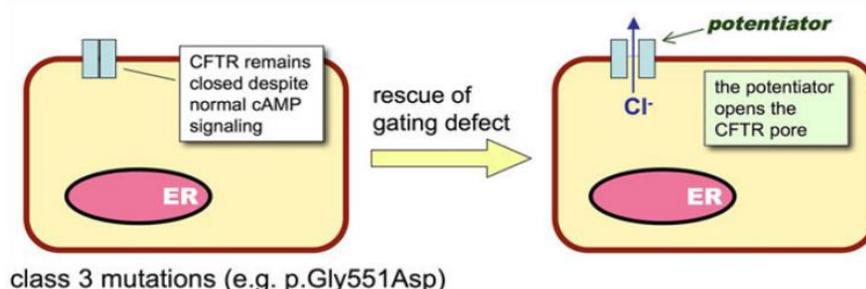


Figura 9: Meccanismo d' azione dei potenziatori.

2) **Correttori**, combinati con potenziatori, che insieme migliorano la funzione e gli esiti clinici in individui omozigoti per la variante F508del/F508del o eterozigoti F508del/variazione responsiva (Figura 10). Il difetto di maturazione associato alla mutazione F508del può essere corretto in vitro mediante l'incubazione delle cellule a basse temperature (27°C) o con alte concentrazioni di chaperonine chimiche (glicerolo, DMSO). Questi trattamenti agevolano la maturazione della proteina e il suo rilascio dal reticolo endoplasmatico⁵⁷.

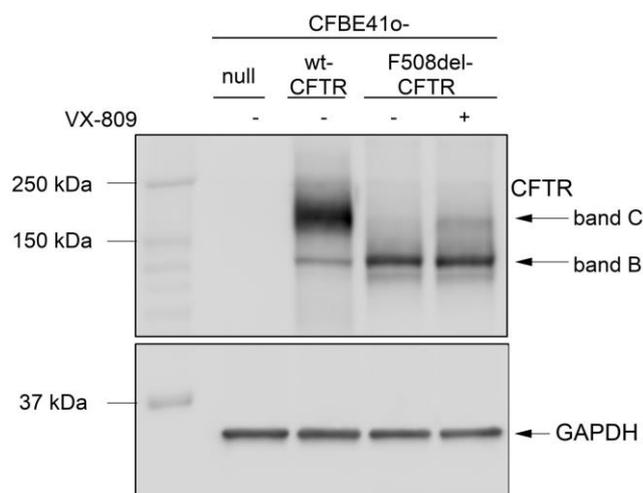


Figura 10: Recupero funzionale (Western Blot) su cellule F508del incubate con Vx809

Sempre grazie alla strategia di screening su larga scala di librerie di composti chimici si è giunti all'identificazione di molecole chiamate correttori (ad esempio il corr-4a) in grado di migliorare il difetto di maturazione della proteina F508del-CFTR⁵⁸. In pratica tali composti mimano l'effetto della bassa temperatura o delle chaperonine chimiche. Tuttavia il meccanismo di azione dei correttori è ancora poco chiaro. È ragionevole supporre che i correttori possano agire con vari meccanismi, schematizzati in Figura 8. Alcuni correttori possono agire come chaperonine farmacologiche, stabilizzando direttamente la proteina CFTR con la mutazione F508del (meccanismo 1) e prevenendone la degradazione da parte del proteasoma (Figura 11). Altri composti possono interagire con altre proteine facilitando la fuoriuscita di F508del-CFTR dal reticolo endoplasmatico ed il suo trasporto alla membrana plasmatica (meccanismo 2). Infine, un terzo tipo di correttori potrebbe agire rallentando l'internalizzazione della proteina mutata dalla superficie cellulare e la degradazione da parte del lisosoma (meccanismo 3). I migliori correttori di prima generazione (VX-809 o lumacaftor e VX-661 o tezacaftor), sono in grado di recuperare la proteina mutata fino ad un livello corrispondente al 5-16% della proteina nativa.

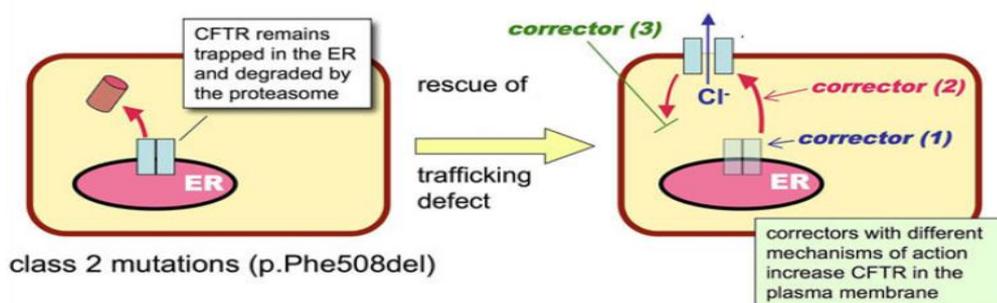


Figura 11: Possibili meccanismi d'azione dei correttori.

Gli attuali studi clinici stanno esaminando i modulatori CFTR di diverse classi, inclusi potenziatori, amplificatori, correttori e correttori di "nuova generazione" che si combinano con i correttori di prima generazione (es. Tezacaftor) e potenziatori (Ivacaftor) che possano aumentare ulteriormente l'attività di F508del in individui con FC con almeno una copia di F508del.

Kalydeco® (Ivacaftor, IVA; Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA) è stato il primo agente potenziatore identificato che attiva il CFTR difettoso sulla superficie cellulare. Il target primario dell'IVA è la proteina CFTR mutata in cui la glicina viene sostituita dall'acido aspartico nella posizione 551 (G551D): tale mutazione compromette il gating del canale del cloruro. IVA non risulta efficace sulla mutazione F508del, la più comune nella razza caucasica, in quanto la correzione completa di questo difetto richiede la modificazione della proteina CFTR con ulteriori alterazioni molecolari, con conseguente "terapia in due fasi".

Orkambi® (Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA), un agente che contiene due composti (Lumacaftor, IVA) è disponibile per i pazienti da pochi anni. Combinando queste due molecole, aumenta il trasporto della proteina CFTR sulle superfici cellulari, con gli agenti che agiscono come chaperoni molecolari durante il ripiegamento delle proteine. Conseguentemente, un numero maggiore di proteine CFTR viene trasferito sulla superficie delle cellule epiteliali⁵⁹.

Altri agenti correttivi molecolari e molecole che migliorerebbero la funzionalità e la stabilità del CFTR sulla superficie cellulare sono attualmente in fase di sviluppo.

Più recentemente, nei pazienti omozigoti per F508del, tezacaftor (TEZ), un agente che dovrebbe trasferire la proteina CFTR alla sua corretta posizione sulle superfici cellulari quando combinato con IVA (**Symdeko®**, Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA), ha dimostrato di migliorare la funzione polmonare nei pazienti con FC e ridurre la frequenza di esacerbazioni polmonari.

I pazienti eterozigoti per F508del sono difficili da correggere, con difetti del CFTR significativi che si rendono manifesti durante folding, apertura e stabilità del canale sulle membrane cellulari. Sono in corso numerosi studi clinici finalizzati allo sviluppo di correttori di nuova generazione in combinazione con TEZ / IVA. Quando viene utilizzato questo farmaco combinato, la funzionalità del CFTR derivante dalla mutazione F508del è significativamente migliorata. Gli studi clinici riportano risultati promettenti sia per gli individui F508del omozigoti che per quelli F508del eterozigoti con mutazioni che comportano una minima funzionalità residua.

Sia dati di ricerca preliminari che studi molecolari, suggerivano come, a parità di mutazione (medesima classe funzionale), avrebbe dovuto corrispondere una medesima risposta ai modulatori di CFTR; tuttavia, quando questi agenti sono stati impiegati in studi clinici e dopo l'approvazione della FDA, i risultati non sono sempre stati all'altezza delle aspettative e soprattutto non omogenei in pazienti con il medesimo genotipo CFTR⁶⁰. Alla luce di tali risultati apparentemente contrastanti, sono state pertanto realizzate tecniche di "theratyping", ovvero studio della risposta a determinati composti effettuato su coltura cellulare prelevata dal singolo paziente. Nei prossimi anni, le speranze sono riposte nelle tecniche di theratyping che potrebbero portare allo sviluppo di trattamenti specifici per i singoli pazienti, basandosi su nuovi biomarcatori.

1.2.5.1 Pazienti F508del/F508del

Orkambi® è approvato dalla FDA per l'uso in pazienti omozigoti per la mutazione F508Del. Il componente correttore molecolare di Orkambi® (cioè lumacaftor) migliora e stabilizza le interazioni tra le porzioni transmembrana di CFTR e un dominio di blocco dei nucleotidi (NBD1). Questo dominio sopprime i difetti di ripiegamento della proteina CFTR che si verificano in questa mutazione. Questa conoscenza ha fornito l'intuizione che ulteriori correzioni di CFTR possano essere ottenute con l'aggiunta di un secondo correttore. Il principio per l'utilizzo della combinazione lumacaftor/IVA si basa sui meccanismi di azione complementari (es. correttore e potenziatore). In questo processo in due fasi, per il trattamento dei pazienti con F508del, è necessaria la correzione del folding della proteina CFTR e l'apertura del canale. Con l'utilizzo di LUM/IVA è riportato come si possa ottenere un incremento assoluto del FEV1% del 3% e una significativa riduzione dei valori di cloro nel sudore a 24 settimane dall'avvio del trattamento. Per il paziente, un effetto più apprezzabile della combinazione LUM/IVA si traduce sulla stabilità della malattia (cioè, riduzione delle riacutizzazioni polmonari).

La sicurezza e l'efficacia di LUM/IVA sono state valutate in uno studio clinico di fase III. Lo studio clinico TRAFFIC (NCT01807923) era uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo (RCT) in 559 pazienti con FC omozigoti per la mutazione F508del. La durata dello studio era di 24 settimane. L'end point primario era un cambiamento nella funzionalità polmonare. Lo studio clinico TRANSPORT (NCT01807949) è stato un altro RCT in 563 pazienti con fibrosi cistica, omozigoti per la mutazione F508del. La durata dello studio era di 24 settimane e l'end point primario era, anche in questo caso, un cambiamento nella funzionalità polmonare. Sulla base di un'analisi aggregata dei dati dello studio, i pazienti che hanno ricevuto la terapia combinata hanno mostrato miglioramenti statisticamente significativi della funzionalità polmonare, nonché aumento di peso e riduzione delle riacutizzazioni polmonari rispetto al placebo. Sono risultati inoltre significativamente ridotti l'uso di antibiotici per via endovenosa e il numero delle ospedalizzazioni. I pazienti hanno guadagnato peso nel tempo con un indice di massa corporea migliorativo (BMI). Gli eventi avversi nella combinazione lumacaftor/IVA erano principalmente di natura respiratoria con dispnea e senso di costrizione toracica. Aumenti dei livelli di transaminasi epatiche superiori a tre volte il limite superiore della norma sono stati osservati nel 5,2% dei pazienti trattati con placebo e nel 5,2% dei pazienti trattati con lumacaftor/IVA. Come risultato di questi studi, il monitoraggio della funzionalità epatica è consigliato per il primo anno di trattamento. Inoltre, si consiglia un dosaggio accurato dei farmaci di tipo azolico e il dosaggio di rifampicina se si utilizzano questi agenti.

TEZ/IVA (Symdeko®) è stato recentemente approvato per pazienti con due copie della mutazione F508del. In questo studio di fase III, TEZ/IVA ha migliorato la funzionalità polmonare di circa il 3% -4% e ha ridotto il numero di riacutizzazioni polmonari. Si ritiene che Symdeko abbia meno interazioni farmacologiche e meno effetti collaterali, come oppressione toracica, rispetto a Orkambi⁶¹. Symdeko è anche approvato per mutazioni di gating del CFTR responsive all'IVA.

1.2.5.2 G551D e altre mutazioni di gating

Kalydeco® è approvato dalla FDA per l'uso in pazienti con la mutazione G551D e per altre 35 mutazioni di CFTR. Essendo stato approvato nel 2012 (Figura 12), esiste ormai una discreta esperienza riguardo l'utilizzo di questo agente.

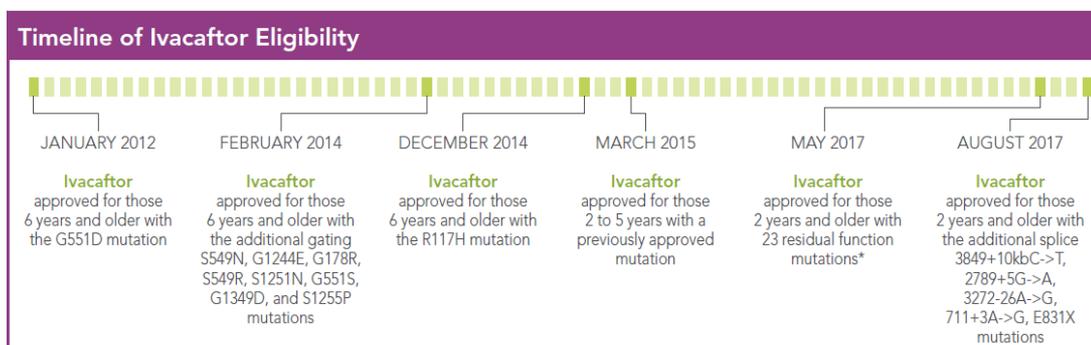


Figura 12: Tempi di approvazione per Ivacaftor

La posologia consigliata per Kalydeco® è ogni 12 ore. Si consiglia ai pazienti di assumere il farmaco con cibi grassi. Kalydeco® ha dimostrato di migliorare il FEV1% del 10%-15% anche nell'arco di giorni o settimane. Gli indici di massa corporea migliorano nei pazienti trattati con Kalydeco nell'arco di settimane o mesi. I sintomi come la tosse e la produzione di espettorato sono risultati significativamente ridotti. Kalydeco® ha dimostrato inoltre di essere in grado di ridurre il declino della funzionalità polmonare, potendo stabilizzare di fatto la pneumopatia FC-correlata. I valori di cloro nel sudore misurati in pazienti con FC trattati con questo agente risultavano drasticamente ridotti (di circa 50 punti)⁶². Esistono dati che suggeriscono che Kalydeco migliori la funzione pancreatica nei pazienti più giovani e migliori il tono della muscolatura liscia delle vie aeree. IVA è stato il primo modulatore/potenziatore CFTR approvato dalla FDA per l'uso in pazienti con FC portatori di determinate mutazioni CFTR.

La FDA ha approvato l'IVA per l'uso in pazienti con le seguenti mutazioni genetiche: G551D, R117H, G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P e G1349D. L'efficacia e la sicurezza di IVA sono state valutate negli studi clinici di fase III. Lo studio clinico STRIVE è stato un RCT che ha coinvolto 161 pazienti adolescenti/adulti con la mutazione G551D. La durata dello studio è stata di 48 settimane e l'uso di IVA è stato associato a miglioramenti statisticamente significativi della funzionalità polmonare (FEV1), a una riduzione delle riacutizzazioni polmonari e della sintomatologia respiratoria⁶³. ENVISION14 è stato un altro RCT che ha coinvolto 52 pazienti pediatriche (6-11 anni) con la mutazione G551D. La durata dello studio è stata di 48 settimane e i pazienti trattati con IVA hanno dimostrato un miglioramento statisticamente significativo della funzionalità polmonare. Da notare che la popolazione ENVISION era più giovane e meno compromessa (i valori FEV1 erano quasi normali) rispetto ai pazienti di STRIVE^{64,65}.

I pazienti che hanno completato gli studi randomizzati sono stati in grado di continuare il trattamento con un'estensione a lungo termine (PERSIST) in aperto a 96 settimane (PERSIST). I ricercatori hanno osservato benefici clinici importanti nei partecipanti allo studio⁶⁶. Uno studio longitudinale di coorte osservazionale GOAL15 ha seguito 151 pazienti trattati con IVA. Di questi pazienti, il 29% (26/89), positivo alla cultura per

Pseudomonas aeruginosa l'anno prima dell'uso dell'IVA, era negativo alla coltura 12 mesi dopo il trattamento. Inoltre, l'88% (52/59) dei pazienti che erano negativi alla coltura è rimasto non infetto. Le probabilità di una coltura positiva di *P. aeruginosa* nell'anno successivo all'IVA rispetto all'anno precedente sono state ridotte del 35% (P 0.05)⁶⁷. I singoli casi riportati hanno mostrato un aumento dell'efficacia IVA e della funzionalità CFTR nei pazienti omozigoti G551D rispetto a pazienti eterozigoti G551D. Per i pazienti in trattamento con Kalydeco, esami sulla funzionalità epatica devono essere effettuati trimestralmente per il primo anno e successivamente ogni anno. I pazienti più giovani devono sottoporsi a esami oculistici annuali per monitorare l'eventuale insorgenza di cataratta.

1.2.5.3 Modulatori CFTR triplet

Il successo delle terapie menzionate in precedenza e una comprensione più approfondita della patologia molecolare sottostante la sintesi, elaborazione, traffico e deposizione di CFTR sulle superfici cellulari, ha messo in luce il fatto che CFTR può essere presente sulle superfici delle cellule ma potrebbe non funzionare correttamente. Negli ultimi anni sono stati realizzati nuovi studi clinici con diverse combinazioni di correttori di diversa generazione. Gli ultimi trials clinici di fase III, conclusi nella primavera 2019, hanno riportato risultati molto interessanti con due combinazioni: [VX-659 + tezafactor + ivacaftor] e [VX-445 + tezacaftor + ivacaftor]. Con entrambe le combinazioni si sono ottenuti sensibili incrementi di FEV1% ed importanti riduzioni di concentrazione del cloro nel sudore. L'azienda Vertex, promotrice di questi studi, ha scelto la combinazione [VX-445 (elexacaftor) + tezacaftor + ivacaftor] per sottoporla all'approvazione dell'agenzia USA FDA, approvazione concessa verso la fine di ottobre 2019, con successiva messa in commercio della tripla combinazione, commercialmente denominata **Trikafta**[®], per i malati della popolazione statunitense.

- **Trial su pazienti F508del/F508del**

Il primo studio⁶⁸, randomizzato, controllato, in doppio cieco, è stato condotto su 107 soggetti FC omozigoti F508del di 12 o più anni: 55 nel gruppo di combinazione elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor; 52 nel gruppo controllo. Il FEV1 di partenza variava dal 40 al 90%. Tutti gli arruolati avevano ricevuto un trattamento di 4 settimane con Symdeko[®]. In seguito, per 4 settimane, il gruppo con triplo farmaco riceveva una dose fissa, costituita da elexacaftor 200 mg + tezacaftor 100 mg + ivacaftor 150 mg al mattino e dal solo ivacaftor 150 mg la sera. Il gruppo di controllo riceveva placebo + tezacaftor 100 mg + ivacaftor 150 mg al mattino e ivacaftor 150 mg la sera. Tutti gli arruolati hanno completato lo studio e sono stati eletti poi per uno studio di estensione in aperto di 96 settimane con la triplice combinazione. Di seguito, i risultati relativi ai parametri fondamentali, riportati nello studio.

Risultati di efficacia: Valori medi (tra parentesi, intervalli di confidenza al 95%)*

<i>End points</i>	Placebo/TEZ/IVA n 52	ELEX/TEZ/IVA n 55
FEV1 (% predetto). Variazioni assolute punti % dall'inizio, dopo <u>4 settimane</u>	+ 0,4 (-1,4 – 2,3)	+10,4 (8,6 – 12,2)
Test sudore (variazioni cloruro) mmol/L	+ 1,7 (-1,9 – 5,3)	-43,4 (-46,9 – 40,0)
Qualità vita: punteggio sintomi respiratori	-1,4 (-5,4 – 2,6)	+16,0 (12,1 – 19,9)

• **Trial su pazienti F508del/Minimal function mutation**

Il secondo studio⁶⁹ è un trial clinico controllato, randomizzato, in doppio cieco su pazienti di 12 o più anni con FEV1 di partenza compresa tra 40 e 90%. Riguarda pazienti eterozigoti composti per la mutazione F508del associata ad altra mutazione correlata a funzione minima di CFTR (mutazioni che comportano mancata sintesi di CFTR o che da analisi *in vitro* non mostrano funzione CFTR o questa è inferiore al 10% della funzione normale). Il gruppo con triplo farmaco riceveva una dose fissa, costituita da elexacaftor (200 mg) + tezacaftor (100 mg) + ivacaftor (150 mg) al mattino e dal solo ivacaftor (150 mg) alla sera. Il gruppo placebo riceveva al mattino il triplo placebo e alla sera il placebo ivacaftor. Nel complesso hanno portato a termine lo studio 403 soggetti FC: 200 nella tripla combinazione e 203 nel gruppo placebo. Tutti i pazienti che hanno portato a termine lo studio sono stati poi eletti per l'arruolamento in uno studio di estensione, aperto, con la tripla combinazione, della durata di 96 settimane.

Risultati di efficacia: Valori medi (tra parentesi, intervalli di confidenza al 95%)*

<i>End points</i>	Placebo n 203	ELEX/TEZ/IVA n 200
FEV1 (% predetto). Variazioni assolute Punti % dall'inizio, dopo <u>4 settimane</u>	- 0,2 (-1,3 – 1,0)	+ 13,6 (12,4 – 24,8)
FEV1 (% predetto). Variazioni assolute Punti % dall'inizio, dopo <u>24 settimane</u>	- 0,4 (-1,5 – 0,7)	13,9 (12,8 – 15,0)
Esacerbazioni polmonari 24 sett. (rip. a 1 anno)	113	41
Test sudore (variazioni cloruro) mMol/L <u>24 settimane</u>	- 0,4 (-2,2 – 1,4)	- 42,2 (-44,0 – -40,4)
Qualità vita: punteggio sintomi respir. <u>24 sett</u>	- 2,7 (-4,6 – 0,8)	+ 17,5 (15,6 – 19,5)
Rapporto peso/altezza ² (BMI) <u>24 sett.</u>	+ 0,09 (-0,05 – 0,22)	+ 1,13 (0,99 – 1,26)

Alla luce di questi dati, si può sostenere come Trikafta[®] si sia mostrato nettamente più efficace nei pazienti F508del/F508del rispetto ai trattamenti con Orkambi[®] e Symdeko[®]. La tolleranza nel breve periodo si è rivelata complessivamente buona. La breve durata del trial e la scarsa numerosità dei pazienti costituiscono una limitazione al significato dei risultati ottenuti e comunque questi appaiono sufficienti a testimoniare che la tripla combinazione è assai più vantaggiosa rispetto alle altre doppie combinazioni già introdotte nell'uso.

Questi trial hanno inoltre confermato la necessità di agire su punti diversi del percorso maturativo di CFTR-F508del, con l'associazione di almeno due correttori, per correggerne a sufficienza l'alterazione ed ottenere una sufficiente presenza della proteina in membrana apicale cellulare, da attivare con un potenziatore⁷⁰.

L'avvento di questa nuova generazione di modulatori porterà verosimilmente significativi cambiamenti in termini prognostici all'interno dell'ampia casistica di paziente FC con genotipi "responsivi". È importante tuttavia sottolineare come restino al momento fuori da questa prospettiva tutti i pazienti con mutazioni rare non portatori di F508del, una percentuale non trascurabile di malati, soprattutto nelle popolazioni del Sud dell'Europa e del bacino del Mediterraneo, ove è riportata una più alta frequenza di stop codon mutations ed in generale una minore prevalenza di F508del.

1.3 Gene therapy e editing genico

Trattamenti correttivi che non sono specifici per la classe di mutazione e quindi applicabili a tutti i pazienti - ad es., Terapia genica, terapie cellulari e attivazione di canali ionici alternativi che bypassano il CFTR - sono stati esplorati, ma sono ancora nelle prime fasi di sviluppo⁷¹.

La terapia genica è stata oggetto di studio dalla scoperta del gene (1989) causante la FC. Vari vettori sono stati testati per la trasmissione genica correttiva in FC, inclusi i vettori virali ricombinanti adenovirali e adeno-associati, nonché vettori non virali sintetici (ad esempio plasmidi)⁷². L'obiettivo della terapia genica è quello di utilizzare un vettore per fornire un DNA CFTR funzionale al nucleo delle cellule epiteliali polmonari, in modo tale che una proteina funzionale possa essere trascritta al posto del gene CFTR mutato. Nel 2015 sono stati pubblicati i più ampi studi clinici di fase I/IIa e di fase IIb, riguardanti l'impiego di un vettore di terapia genica non virale basato su plasmidi in soggetti con FC nel Regno Unito^{73,74}. In questo studio in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo, i soggetti hanno ricevuto dosi mensili di terapia genica basata sul plasmide tramite nebulizzazione per 12 mesi. Alla fine del trattamento, i soggetti sottoposti a terapia genica hanno mostrato stabilizzazione della funzionalità polmonare rispetto a un declino osservato nel gruppo placebo. Nel complesso, i soggetti trattati hanno avuto un miglioramento del FEV1 del 3,7% rispetto al placebo. Non ci sono state tossicità significative durante il trattamento. Lo sviluppo di vettori lentivirus ricombinanti basati su RNA e una tecnologia di editing genetico emergente (ad esempio CRISPR/Cas9) hanno la promessa di rendere la riparazione del gene CFTR mutato una possibilità futura^{75,76,77}. Sebbene questi sistemi non siano stati ancora studiati clinicamente nella FC, offrono una opportunità per la medicina di precisione; correggere la mutazione CFTR specifica nel paziente.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro progetto si è proposto di sviluppare un protocollo di analisi in vitro per la definizione del *teratipo* (caratterizzazione in vitro della risposta a trattamenti mirati alla modulazione della CFTR) di appartenenza di pazienti FC italiani, un obiettivo particolarmente importante dato il gran numero di mutazioni rare la cui classe di appartenenza e sensibilità farmacologica sono sconosciuti.

Tale analisi è stata realizzata su cellule raccolte mediante la tecnica del brushing nasale.

Gli obiettivi generali dello studio:

- 1) Analisi del registro dei pazienti afferenti al centro UOSD Centro Fibrosi Cistica dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini;
- 2) Selezione dei pazienti che presentano mutazioni rare, orfane di terapia, giudicate potenzialmente responsive ai modulatori di CFTR;
- 3) Studio dei meccanismi molecolari alla base del difetto di base nella fibrosi cistica; con particolare attenzione al trasporto ionico;
- 4) Sperimentazione in vitro di nuovi approcci terapeutici basati su farmaci già approvati o di nuova sperimentazione.

Più specificamente, si vuole valutare la capacità di nuovi composti chimici di recuperare la funzione della proteina CFTR mutata in cellule epiteliali prelevate da pazienti FC. In effetti la ricerca scientifica ha prodotto diverse molecole in grado di correggere il difetto causato da diverse mutazioni FC. Il modello cellulare oggetto della presente proposta è essenziale per la definizione del migliore trattamento per ciascun tipo di mutazione. Le cellule epiteliali serviranno anche per affrontare altri studi rivolti alla comprensione delle proteine che, insieme a CFTR, concorrono alla modulazione delle proprietà chimico-fisiche del fluido periciliare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei dati

I dati sono stati raccolti mediante revisione delle cartelle cliniche e dei fascicoli dei pazienti afferenti al Centro Fibrosi Cistica della Regione Liguria. Sono stati raccolti dati riguardanti età, sesso, genotipo, sufficienza pancreatica, colonizzazione polmonare, stato nutrizionale, tolleranza glucidica, funzionalità polmonare, storia di rino-sinusopatia cronica e trapianto polmonare. Sono stati inoltre raccolti dati riguardanti eventuale terapia con modulatori di CFTR pregressa o in atto.

Sulla base del database così realizzato, sono stati selezionati i pazienti da sottoporre a brushing nasale in base alla presenza di criteri genetici e clinici per la diagnosi di Fibrosi Cistica ed al genotipo CFTR di ogni singolo soggetto.

3.2 Raccolta del campione

Per il prelievo delle cellule dell'epitelio nasale è stato utilizzato lo spazzolino per prelievo citologico Endobrush®, costituito da setole in nylon, trattenute da un avvolgimento in metallo e montato su stelo plastico.

I soggetti selezionati sono stati sottoposti a lavaggi nasali con soluzione fisiologica nelle 12 ore precedenti al prelievo e sono stati esclusi i pazienti con rinite acuta in atto al momento della visita. La procedura è stata realizzata nell'ambito di visite ambulatoriali routinarie già programmate in precedenza per il follow-up della patologia di base.

Ogni soggetto è stato sottoposto a spazzolamento a livello di entrambe le narici. La procedura consiste nell'inserimento all'interno delle cavità nasale dello spazzolino citologico monouso, con cui si esegue uno spazzolamento della mucosa dei turbinati nasali, mediante movimenti di "va e vieni", associati a movimenti rotatori sull'asse dello spazzolino stesso. La procedura ha una durata di circa 4-5 secondi per ciascuna narice.

Lo spazzolino impiegato per il brushing è stato poi agitato ripetutamente in un mezzo di coltura in provetta per portare in sospensione le cellule nasali rimaste intrappolate tra le setole dello spazzolino e trasportato a temperatura ambiente c/o i Laboratori di Genetica Umana dell'Istituto Giannina Gaslini entro 10 minuti dal momento del prelievo.

3.2 Valutazione funzionale del flusso ionico

Il progressivo miglioramento delle tecniche di coltura e di studio delle cellule epiteliali delle vie aeree permette lo studio in vitro di aspetti molto importanti collegati alla fibrosi cistica e ad altre patologie croniche dell'apparato respiratorio. Le cellule, prelevate mediante brushing delle cavità nasali, possono essere coltivate in maniera da stimolare la proliferazione delle cellule basali staminali. L'amplificazione del numero di cellule consente la generazione di numerose aliquote conservabili per molti anni mediante congelamento in azoto liquido.

Le cellule scongelate possono essere ulteriormente coltivate e successivamente fatte differenziare mediante semina su un supporto poroso in un opportuno terreno e in configurazione di interfaccia aria-liquido, cioè alimentate solo dal lato basolaterale. In queste condizioni le cellule formano un epitelio pseudostratificato ciliato molto simile a quello delle vie aeree. Su questi modelli cellulari è possibile effettuare tutta una serie di studi che comprendono la valutazione di nuovi approcci terapeutici, la misurazione dei processi di trasporto ionico transepiteliale con la tecnica della corrente di corto-circuito in camera di Ussing oppure con sonde fluorescenti, l'analisi del trascrittoma e del proteoma.

La raccolta delle cellule nasali umane è stata eseguita da entrambe le narici e senza anestesia locale. Prima di procedere con la raccolta è stato effettuato un lavaggio con una soluzione salina fisiologica per rimuovere l'eccesso di muco. Per la raccolta è stato usato uno spazzolino sterile soffice effettuando dei movimenti rotatori antero-posteriori. Lo spazzolino è stato in seguito trasferito in un tubo conico da 15 mL contenente 6 mL di Ca^{2+} Mg^{2+} D-PBS e portato in laboratorio per essere processato.

A questo punto il campione è stato centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti (dopo aver tolto lo spazzolino che è stato trattato separatamente per staccare eventuali cellule rimaste adese alle setole). Il pellet è stato risospeso in 6 ml di terreno costituito da LHC9 e RPMI1640(1:1) complementato con diversi ormoni e supplementi.

Questo terreno privo di siero consente una proliferazione ottimale delle cellule epiteliali. Prima di piastrare le cellule la fiasca è stata pretrattata con $100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ di una soluzione di collagene di coda di ratto e lasciata in incubatore a 37°C (5% CO_2) per almeno 15 minuti. Per migliorare la crescita e aumentare la duplicazione delle cellule in vitro il terreno di coltura è stato supplementato con una miscela di inibitori SMAD e ROCK, necessari per la riprogrammazione ed immortalizzazione delle cellule epiteliali umane⁷⁹.

Per eradicare la contaminazione batterica e mitotica inoltre, sono stati aggiunti al terreno di proliferazione antibiotici e fungizone ($2.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Gli antibiotici e la loro scelta viene fatta in base all'antibiogramma più recente ma qualora questo non fosse disponibile si procede all'uso di una miscela di colimicina e piperacillina per 48 h. Il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni e le cellule sono state coltivate su fiasca T25 fino ad un certo grado di confluenza pari al 60%.

Le cellule sono state quindi staccate mediante tripsina e ripiastrate su una fiasca T75 per continuare la coltura. Quando anche queste cellule hanno raggiunto il 60% della confluenza sono state staccate ed ampliate su tre fiasche T75 per poi essere congelate in una soluzione di siero fetale bovino con DMSO al 10% in 9 vials e conservate in azoto liquido.

Le cellule al passaggio 3 sono state scongelate trasferendo la fiala da congelamento in un bagnetto riscaldato a 37°C . Le cellule sono state successivamente trasferite in un tubo conico da 15 mL contenente terreno proliferativo e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in terreno di crescita e piastrato su una fiasca T75. Le cellule sono state coltivate in fiasca fino al raggiungimento del 90% della confluenza e poi staccate con la tripsina e contate per determinare il rendimento cellulare. Le cellule sono state seminate ad alta densità su supporti permeabili Snapwell. (500.000cellule/Snapwell, Figura 13).

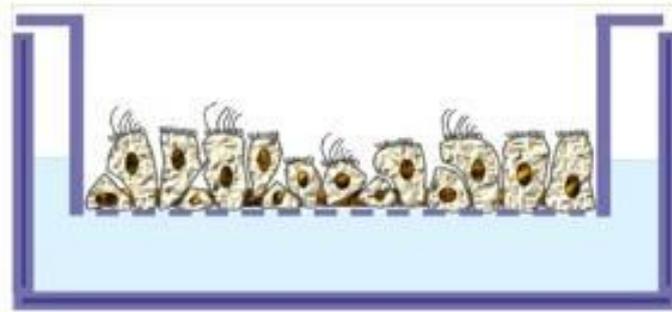


Figura 13: Supporto permeabile Snapwell

Dopo 2 ore il terreno LHC /RPMI 1640 è stato sostituito con un terreno differenziativo contenente DMEM/Ham's F12 (1:1), siero fetale bovino (2%), penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml) e diversi ormoni e supplementi⁸⁰. Il terreno è stato cambiato ogni giorno in entrambi i lati apicale e basolaterale del supporto per circa 7 giorni (coltura liquido-liquido). Il grado di differenziazione dell'epitelio è stato valutato misurando la differenza di potenziale e resistenza transepiteliale con un voltmetro epiteliale. Successivamente, il terreno è stato aggiunto solo nella parte basolaterale (coltura aria-liquido), questa condizione, protratta per ulteriori 7 giorni e, favorisce una più completa differenziazione dell'epitelio.

L'effetto di singoli composti o combinazioni di composti è stato testato con registrazioni della corrente di cortocircuito. Nel caso di correttori, gli epiteli sono stati incubati per 24 ore con i composti da testare prima di effettuare gli esperimenti. I supporti porosi Snapwell sono stati montati in camera di Ussing (Figura 14). Essa è costituita da due semi-compartimenti, (apicale e basolaterale), che sono stati riempiti con soluzione di Krebs (12 mM NaCl, 0.8 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 24 mM NaHCO₃, 10 mM glucosio e 0.04 mM rosso fenolo). La soluzione viene fatta gorgogliare con una miscela gassosa contenente 5% di CO₂ e 95% d'aria, per mantenere l'ossigenazione ed il corretto pH (circa 7.4). Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C.

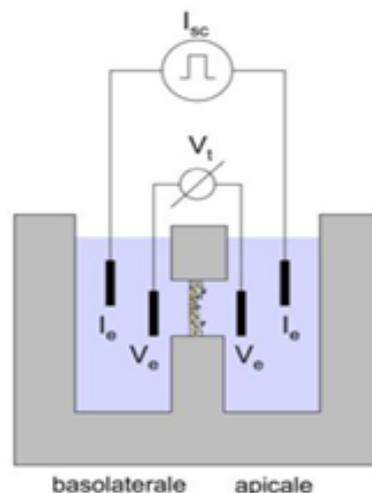


Figura 14: Configurazione della camera di Ussing per la misurazione della corrente di corto circuito su epiteli polarizzati.

E' stata misurata la risposta all' aggiunta sequenziale di amiloride, agonisti di cAMP, VX-770 e inh-172 (come inibitore specifico di CFTR). L'ampiezza della corrente bloccata dall' inh-172 è un indice del miglioramento della maturazione e della migrazione verso la membrana in seguito al trattamento correttivo. La frazione della corrente totale stimolata dal solo agonista cAMP rispetto al cAMP più il potenziatore dà invece informazioni su un possibile effetto benefico del trattamento con VX-770.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'attività svolta durante la prima fase del Dottorato è stata mirata allo studio dell'epidemiologia della popolazione affetta da FC afferente al Centro Fibrosi Cistica dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova. Sono stati pertanto raccolti dati demografici, clinici e genetici dei pazienti in regolare follow-up ottenendo i risultati di seguito riportati.

Attualmente i pazienti affetti da FC in regolare follow-up presso il Centro sono 254, dei quali 97 (38.2%) al di sotto dei 18 anni di età e 157 (61.8%) al di sopra dei 18 anni di età; l'età media dei pazienti calcolata al 26.09 2017 risultava essere di 26.04 anni (min 0 anni, max 74 anni). 116 pazienti (45.7%) sono di sesso femminile, mentre 138 (54.3%) sono di sesso maschile. La popolazione è stata suddivisa in fasce di età, ottenendo i dati sotto riportati (Figura 15).



Figura 15: Suddivisione della popolazione in fasce d'età

Sono stati inoltre raccolti dati in merito all'attività diagnostica svolta dal Centro negli ultimi 15 anni, ottenendo i dati riportati nelle tabelle sottoriportate (Figura 16).

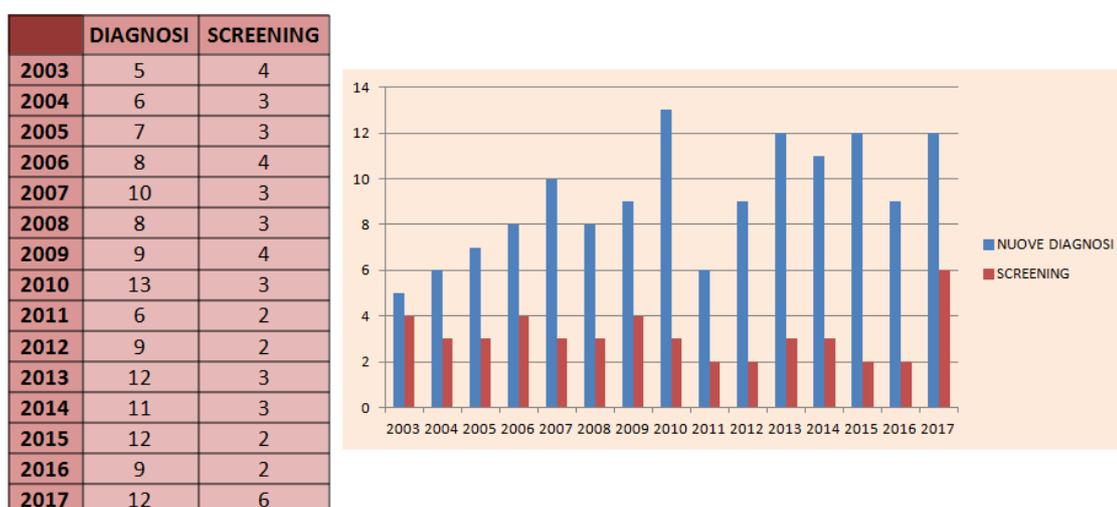


Figura 16: Numero di nuove diagnosi totali per anno effettuate presso il Centro e numero di diagnosi effettuate in seguito a positività dello screening neonatale

Come si può osservare, il numero delle diagnosi confermate (test del sudore positivo, genotipo caratterizzato da 2 mutazioni CF-causing) risulta in lieve incremento negli ultimi anni, con un significativo aumento delle diagnosi effettuate nei pazienti adulti, prevalentemente in seguito ad accertamenti svolti in merito ad infertilità maschile e/o pneumopatia cronica di ndd (Figura 17).

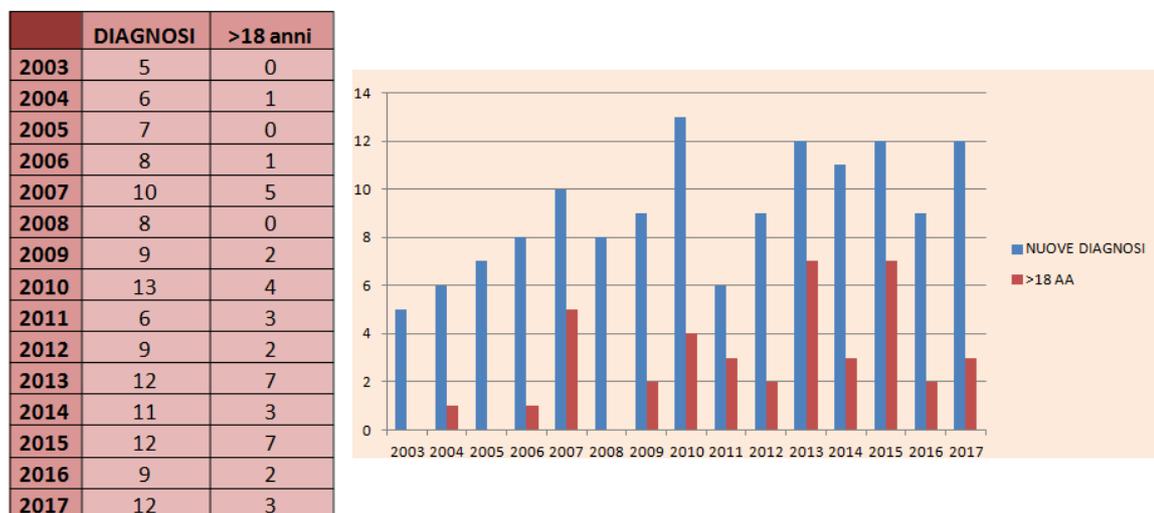


Figura 17: Numero di nuove diagnosi totali per anno effettuate presso il Centro e numero di diagnosi effettuate in pz >18 anni

Obiettivo principale dell'attività svolta è stato quello di realizzare un database completo delle mutazioni di CFTR presenti nella popolazione FC afferente al Centro Regionale della Liguria. Sono stati pertanto raccolti tutti i dati a disposizione riguardo il genotipo dei pazienti in regolari follow-up e sono stati effettuati nuovi test molecolari nei pazienti in cui risultavano informazioni missing (mancanza della 2° mutazione CF-causing, informazioni o documentazione cartacea incomplete o discordanti, test molecolari eseguiti presso altro Centro, assenza di test molecolari nei genitori).

Al momento attuale sono stati raccolti dati conclusivi riguardo 254 su 265 pazienti seguiti presso il Centro (95,85% del totale), in cui è stata certificata mediante metodiche validate la presenza di 2 mutazioni CF causing. In 29 pazienti su 254 è stata riscontrata la presenza di un valore di cloro sudorale al test del sudore negativo o borderline (11,42% della popolazione in esame). La frequenza della mutazione F508del, nettamente la più frequente nella razza caucasica, è risultata pari al 45,47% del totale degli alleli (251/508 alleli totali), con una percentuale di soggetti che presentano omozigosi F508del/F508del pari al 26,38% del totale (67/254 pazienti) ed una percentuale di soggetti con una sola copia di F508del pari al 38,18% del totale (97/254 pazienti). 91 pazienti su 254 non presentano invece alcuna mutazione F508del e rappresentano ben il 35,83% della popolazione presa in esame (Figura 18).

PREVALENZA F508del		
Omozigoti F508del/F508del	67/254	26.38%
Eterozigoti F508del	96/254	37.79%
F508del Neg/Neg	91/254	35.83%

Figura 18: Prevalenza della mutazione F508del

Di seguito nella Figura 19 è riportata la frequenza delle più comuni mutazioni di CFTR all'interno della casistica del Centro.

Mutazione CFTR	N alleli	Frequenza
F508del	230	45.28%
G542X	29	5.71%
N1303K	17	3.35%
2789+5G->A	13	2.56%
D1152H	10	1.97%
1717-1G->A	10	1.97%
3849+10kbC->T	9	1.77%
2183AA->G	6	1.18%
R553X	6	1.18%
W1282X	5	0.98%

Figura 19: Distribuzione delle più frequenti mutazioni di CFTR nella casistica

Per quanto concerne gli 11 pazienti in follow-up con diagnosi non conclusiva, si tratta di casi in cui non è stata riscontrata la presenza di 2 mutazioni CF-causing mediante le analisi CFTR di I-II-III livello (9/11 casi) oppure in cui sia stata rilevata la presenza di una mutazione non nota e/o di significato patogenetico incerto (2/11 casi). Il ricorso ad indagini di IV livello con utilizzo di c-DNA sarà cruciale per trarre conclusioni diagnostiche definitive in questi pazienti (Figura 20).

DIAGNOSI NON CONCLUSIVE			
Iniziali	Data di nascita	Mutazioni	
DF	16/07/1973	3849+10KbC>T	Unknown
ZL	16/01/1942	D1305E	Unknown
RRA	18/08/1958	2789+5G>A	Unknown
OQCE	04/12/1999	R1162X	Unknown
MS	05/10/1991	M952I	Unknown
MC	08/01/1974	G85E	Unknown
GS	30/12/1964	R553X	Unknown
GF	14/06/1976	G542X	Unknown
FG	31/01/1997	R1070Q + S466X	Unknown
CPM	14/01/2009	R117H	I1230V (3820 ^o >G)
GA	07/03/1947	F508del	L997F E I1027T

Figura 20: Soggetti con diagnosi non conclusiva

Attualmente sui 254 pazienti afferenti al Centro 37 sono in terapia continuativa con LUM/IVA (soggetti F508del/F508del), 3 in trattamento con TEZ/IVA (soggetti F508del/F508del) e 7 con IVA (*gating mutations*), per cui al momento attuale 47/254 soggetti stanno assumendo modulatori CFTR (18.50% della popolazione afferente).

Ben 163/254 sono inoltre portatori di F508del su almeno uno dei due alleli mutati e risultano pertanto candidabili ad avvio di terapia con Vx445/Vx661/Vx770 (64.17% della popolazione afferente).

Alla luce dei dati raccolti risulta pertanto niente affatto trascurabile la percentuale di pazienti che al momento attuale non risulterebbe candidabile ad alcuno dei modulatori CFTR (91/254, pari al 35,83% della popolazione afferente al Centro).

Sulla base del database dei genotipi creato nell'ambito del Dottorato, è stato quindi possibile selezionare pazienti portatori di mutazioni CFTR missenso o piccole delezioni (che non determinino frameshift) non caratterizzate funzionalmente o comunque la cui responsabilità ai farmaci approvati sia limitata oppure non sia nota, e sul secondo allele un'altra mutazione non caratterizzata, oppure una mutazione che inserisce uno stop prematuro, oppure una mutazione appartenente alla classe 2, oppure una grossa delezione nel gene CFTR.

4.1 Popolazione dello studio

Nello studio saranno arruolati inizialmente 200 pazienti e 30 soggetti sani. Compatibilmente con il reperimento di ulteriori fondi necessari all'effettuazione degli studi in vitro, lo studio potrà essere ampliato fino all'arruolamento di 300 pazienti e 50 soggetti sani. I pazienti sono stati scelti anche sulla base del loro genotipo, in base ai criteri qui sotto elencati. I soggetti sani saranno giovani adulti, di età compresa fra i 18 e i 40 anni, non essendo richiesto per questo studio che i soggetti sani (che fungeranno da controlli per le procedure tecniche di coltura e differenziamento degli epiteli), abbiano un match completo (stessa età, etnia) con i pazienti.

Tutti i seguenti criteri di inclusione allo studio devono essere presenti:

- 1)** Età > 2 anni;
- 2)** Diagnosi di fibrosi cistica;
- 3)** Espressione di consenso informato da parte del paziente o del tutore legale
- 4)** Criteri genotipici: presenza sul primo allele di una mutazione missenso o una piccola delezione (che non determini frameshift) non caratterizzate funzionalmente o comunque la cui responsabilità ai farmaci approvati sia limitata oppure non sia nota, e sul secondo allele un'altra mutazione non caratterizzata, oppure una mutazione che inserisce uno stop prematuro, oppure una mutazione appartenente alla classe 2, oppure una grossa delezione nel gene *CFTR*.

In questa prima fase dello studio, sono stati arruolati i primi 27 pazienti, di cui il 100% ha prestato il consenso all'esecuzione della procedura di brushing nasale e relativa raccolta dati. Non si sono verificati eventi avversi maggiori, solo in 2 casi su 27 prelievi eseguiti, si è verificata una minima epistassi, a risoluzione spontanea nel giro di pochi minuti. La coltura in vitro è andata a buon fine per un campione di 24/27 individui (Figura 21). Di questi, 14 sono femmine e 10 sono maschi. L'età media del campione è di 217,42 mesi, con una stratificazione in adulti (10, di cui 7 maschi e 3 femmine), adolescenti (5, di cui 3 femmine e 2 maschi), bambini >6 anni (5 di cui 3 femmine e 2 maschi), bambini <6 anni (5, di cui 2 femmine e 3 maschi).

CODICE	SESSO	ETA' (anni)	GENOTIPO	
GE001	F	23,07	G542X	R1066C
GE002	M	3,01	P5L	2184insA
GE003	M	7,02	P5L	2184insA
GE004	M	33,08	G85E	2372del8
GE005	F	22	N1303K	R347P
GE006	F	17	N1303K	R1066C
GE007	F	4	G542X	V317A
GE008	M	24	N1303K	T338I
GE009	F	14,02	T338I	W57G
GE010	M	38,06	N1303K	394delTT
GE011	F	17,03	N1303K	1717-1G1>A
GE012	F	43,09	2183AA>G	I148T/3199del6
GE013	M	13,08	T338I	2789+5G>A
GE014	F	2,1	M469V	c.3601-3 3610del
GE015	M	6,03	G622D	Q1352H
GE016	F	28,06	G542X	R334W
GE017	F	31,06	del 17a, 17b, 18	M1V
GE018	F	10,01	N1303K	711+1G>T
GE019	M	12,1	1717-1G>A	1497delGG
GE020	F	2	R347P	R347P
GE021	M	45,09	R347P	2183AA>G
GE022	F	21,07	3849+10KbC>T	M1V
GE023	M	2,07	N1303K	R352W
GE024	M	9	T338I	5T12TG
GE025	F	23,07	R347P	D579G
GE026	F	3,01	N1303K	P5L
GE027	M	7,02	M1V	541del4

Figura 21: Soggetti studiati e relativi genotipi

È stata testata la colonizzazione polmonare cronica dei soggetti, con i seguenti risultati sulle colture di escreato o su tampone/aspirato faringeo: il 20,83% del campione risulta colonizzato da *Pseudomonas aeruginosa*, l'8,33% da *Pseudomonas aeruginosa* variante mucoide; il 54,17% è positivo per Stafilococco Meticillino Sensibile (MSSA), mentre nessun individuo presenta positività per ceppi di Stafilococco resistenti alla Meticillina (MRSA). L'8,33 % è positivo rispettivamente per *Haemophilus influenzae* mentre solo 1/24, corrispondente al 4,33%, mostra positività per *Burkholderia cepacia*. L'8,33 % del campione mostra positività colturale per *Aspergillus flavus*, il 4,17% per *Aspergillus fumigatus*. La colonizzazione nasale è stata testata tramite tampone in 17/24 pazienti, risultando negativa per *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA e funghi, positiva per MSSA nel 23.53% degli individui e nell'11,76% per *Moraxella catarrhalis*.

Altre variabili analizzate:

- Il 41% dei pazienti testati presenta insufficienza pancreatica esocrina in trattamento sostitutivo con estratti pancreatici, mentre il 59% del campione presenta sufficienza pancreatica esocrina (Figura 22);

- Il 29% presenta diabete secondario a FC (CFDB) in terapia insulinica mono o plurigiornaliera, mentre il 71% presenta normotolleranza glucidica (Figura 22);

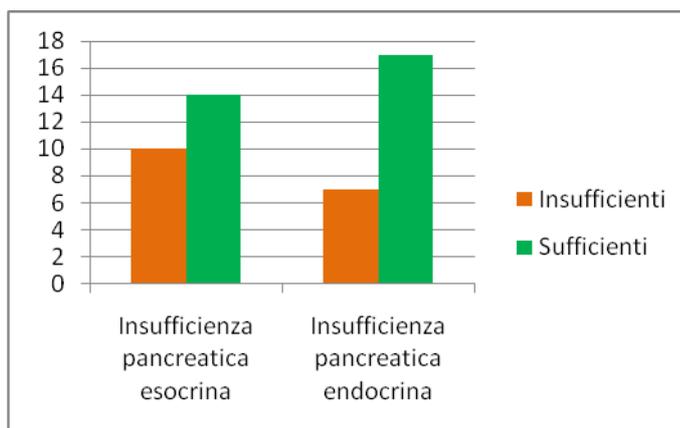


Figura 22: Status pancreatico e tolleranza glucidica

- 20/24 individui hanno eseguito prove di funzionalità respiratoria (PFR) nella medesima visita ambulatoriale in cui è stato eseguito il brushing nasale, ottenendo un valore medio di FVC% di 99,5% (DS 1.7), FEV1% 85% (DS 23) e MMEF% 41% (DS 34.6) (Figura 23);

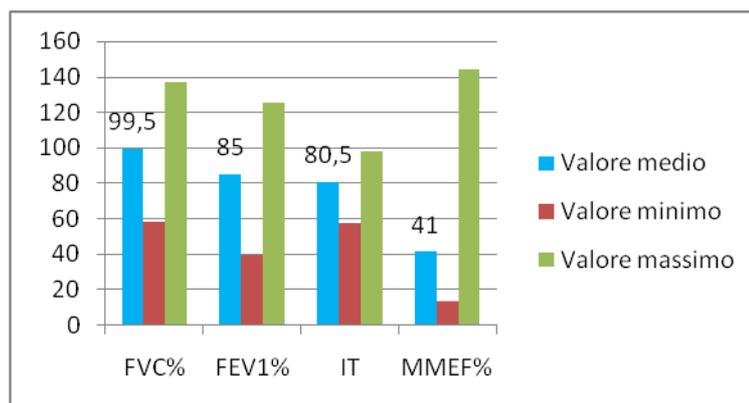


Figura 23: Funzionalità respiratoria

- Agli esami ematochimici eseguiti nell'ambito della medesima visita ambulatoriale in cui è stato eseguito il brushing nasale 3/15 individui hanno presentato positività di PCR, 12/15 negatività del marcatore, mentre 9 pazienti non hanno eseguito esami ematochimici in tale occasione (Figura 24);

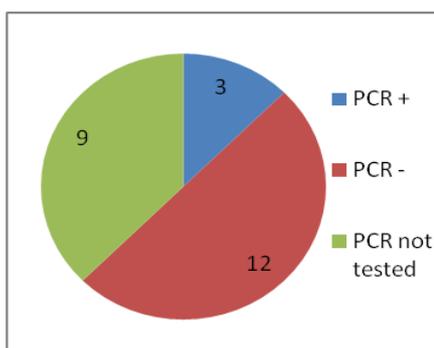


Figura 24: Indici di flogosi al momento del test

- 21/24 individui presentano sintomatologia rinitica/sinusitica cronica e 20/24 assumono terapia endonasale (lavaggi nasali con soluzione fisiologica o ipertonica al 3%) con regolarità. 9/24 presentano allergie a farmaci; 2/24 altre tipologie di allergie (parietaria, pelo di cane e gatto, margherita, acaro della polvere).
- 2 dei 24 soggetti testati sono stati sottoposti a trapianto bi-polmonare.

4.2 Analisi del trasporto ionico CFTR-mediato in epitelii derivati da cellule nasali di pazienti

Le cellule epiteliali basali (cioè quelle che conservano caratteristiche di staminalità) vengono isolate e coltivate come descritto nella corrispondente sezione dei Materiali e Metodi, e successivamente seminate su supporti porosi che permettono il differenziamento in epitelio.

Gli epitelii sono stati poi analizzati in camera di Ussing, per determinare il trasporto ionico transepiteliale mediante analisi della corrente di corto-circuito, con particolare riferimento alla secrezione di cloruro CFTR-mediata.

Saranno qui mostrati alcuni esempi delle analisi effettuate e dei risultati ottenuti.

Il primo paziente analizzato è stato GE001. Le mutazioni di questo paziente sono G542X/R1066C. Nell'effettuare questo tipo di analisi bisogna tenere presente che le attività che si registrano sono dovute ad entrambi gli alleli, quindi potrebbe non essere facile discriminare se entrambe le mutazioni siano responsive al trattamento farmacologico, o se lo sia solo una delle due (e, nel caso, quale lo sia).

Nel paziente GE001, tuttavia, la prima mutazione, che inserisce un codone di stop prematuro, è a tutti gli effetti una mutazione che determina l'assenza di proteina. La secrezione di cloruro osservata quindi in queste cellule, in assenza di trattamento con agenti readthrough, in grado di ripristinare l'espressione della proteina prodotta dall'allele G542X, è quindi imputabile al secondo allele, che produce la proteina missenso R1066C. I dati in letteratura suggeriscono che R1066C abbia un difetto di maturazione, cioè appartenga alla classe II⁸¹.

Gli epitelii derivati da GE001 sono stati trattati per 24h con il veicolo da solo (DMSO; come controllo negativo) e con due diversi correttori: VX-809 (lumacaftor; 3 microM) e VX-445 (elexacaftor; 3 microM). Durante le registrazioni di corrente di corto-circuito sono state misurate la risposta all'aggiunta sequenziale di amiloride, agonisti di cAMP, VX-770 e inh-172 (come inibitore specifico di CFTR). L'ampiezza della corrente bloccata dall'inh-172 viene utilizzata come parametro dell'attività totale di CFTR e è quindi un readout diretto del miglioramento della maturazione e della migrazione verso la membrana in seguito al trattamento correttivo (Figura 25).

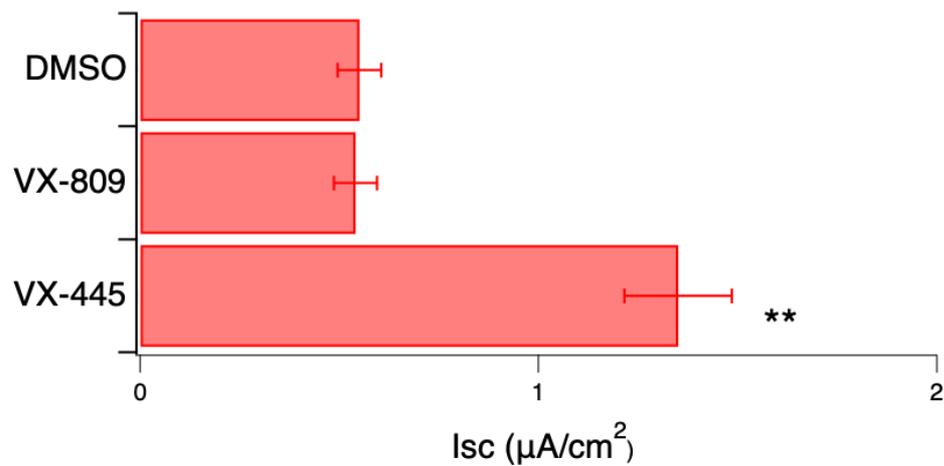


Figura 25: Effetto dei correttori sugli epitelii nasali da paziente G542X/R1066C valutate con la tecnica delle registrazioni di correnti di corto circuito.

I risultati hanno mostrato un significativo aumento di secrezione di cloruro mediata da CFTR negli epitelii trattati con VX-445, mentre sembrerebbe non esserci alcun effetto di correzione a seguito del trattamento con il correttore VX-809 (Figura 25). L'aumento di corrente causato da VX-445 è di circa 2.5 volte rispetto alla attività registrata negli epitelii di controllo, trattati con il solo veicolo.

5. CONCLUSIONI

L'attività di Dottorato svolta in questi anni ha consentito quindi innanzitutto di classificare la popolazione afferente al Centro FC della Regione Liguria in base al genotipo, permettendo l'individuazione dei soggetti con diagnosi non conclusiva e dei pazienti con genotipi attualmente non candidabili a terapie con modulatori CFTR, che rappresentano una percentuale tutt'altro che trascurabile della popolazione totale.

Il prelievo di cellule epiteliali mediante brushing nasale, che è stato accettato dalla totalità dei soggetti cui è stata proposta la partecipazione al progetto, si è rivelato essere una tecnica sicura e ben tollerata dai pazienti; in particolare non si sono registrati eventi avversi significativi. In più del 90% dei casi inoltre è stato possibile avviare la coltura cellulare già dopo il primo brushing, senza dover ricorrere a retest del probando.

Negli ultimi anni le prospettive terapeutiche per i pazienti affetti da FC sono drasticamente cambiate. Con l'avvento dei farmaci modulatori della CFTR e attraverso una maggiore comprensione di quello che è il difetto di base, è emerso come sia necessario sempre più personalizzare la terapia per ogni singolo paziente. Si è passati quindi da una terapia più prettamente "sintomatica" ad una terapia in grado di agire sul difetto di base. Visto l'obiettivo di efficacia di questi farmaci nel rallentare il danno polmonare, altrimenti irreversibile, appare fondamentale intraprendere il trattamento il più precocemente possibile, per ottenere benefici sia a livello clinico sia sulla qualità di vita del paziente.

Al momento risultano disponibili in commercio o comunque in via di approvazione regolatoria diversi farmaci con tale funzione, alcuni con significativi risultati in termini di efficacia e profilo di tollerabilità (Ivacaftor in particolare), ma pur sempre rivolti ad un numero parziale di mutazioni. Recentemente l'approvazione da parte di NIH del Trikafta per tutti i pazienti aventi almeno un allele F508del + ha enormemente ampliato la popolazione di pazienti FC candidabili a trattamenti con modulatori della CFTR, consentendo di poter ipotizzare un radicale cambiamento in termini di prognosi e qualità della vita per tali soggetti, anche alla luce dei significativi risultati ottenuti nei trial clinici in cui è stata testata tale combinazione di molecole.

Restano al momento potenzialmente "orfani" dal punto di vista della modulazione di CFTR tutti i soggetti portatori di mutazioni rare, una proporzione non trascurabile di pazienti in particolare nel bacino del Mediterraneo e più in generale nelle regioni europee sudorientali, ove le mutazioni di Classe I sono particolarmente frequenti e la prevalenza di F508del non risulta paragonabile a quella delle popolazioni dell'Europa del Nord e dell'arcipelago britannico.

L'attenzione della società scientifica FC si è pertanto orientata negli ultimi anni sullo studio di queste mutazioni rare, ancora in gran parte non conosciute dal punto di vista funzionale e spesso del tutto ignote in termini di risposta ai farmaci modulatori già conosciuti o *in fieri*. La loro relativa scarsa prevalenza a livello della popolazione FC rende sostanzialmente poco proponibili trial mirati su queste mutazioni e pertanto lo studio funzionale si deve necessariamente basare su studi come il nostro, mirati alla valutazione della risposta in vitro alle molecole a nostra disposizione e finalizzati alla definizione del teratipo specifico di ciascun soggetto testato.

Questo progetto potrebbe aprire concretamente delle possibilità di prescrizione delle molecole che abbiano dimostrato una qualche efficacia *in vitro*, o mediante forniture compassionevoli da parte della ditta produttrice, come già segnalato in alcuni casi con molecole quali Lumacaftor/Ivacaftor in pazienti non F508del/F508del in passato, oppure anche mediante percorsi di prescrivibilità regolatoria, laddove la molecola testata abbia già dimostrato un profilo di safety *in vivo* su pazienti con genotipo differente.

In questa fase particolarmente ricca di nuove prospettive in FC, il rapporto tra clinico e laboratorista dovrà diventare sempre più stretto e proficuo, proprio perché dimostrare l'efficacia di una molecola *in vitro* può rappresentare una concreta chance prescrittiva per soggetti altrimenti privi di opportunità terapeutiche di correzione del difetto di base a breve termine, anche alla luce della totale assenza di trial destinati a questa particolare categoria di pazienti affetti.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cystic Fibrosis. 2014. Retrieved from <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cystic-fibrosis/>.
2. Cant N et al. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Jul; 52:15-25.
3. Gallati S. ERS. Pediatric respiratory medicine. Genetics, pathophysiology and epidemiology of CF.
4. Cystic fibrosis mutation database. Retrived from www.genet.sickkids.on.ca/statisticspage.html.
5. Rock MJ. Newborn screening for cystic fibrosis. *Clin Chest Med.* 2007 Jun; 28(2):297-305.
6. Massie J, Gillman A. Uncertain diagnosis after newborn sceening for cystic fibrosis: an ethics-based approach to a clinical dilemma. *Pediatr. Pulmonol.* 2014 Jan;49(1):1-7.
7. Regamey N, Barben J. Pediatric respiratory medicine. CF lung disease. ERS
8. Cystic Fibrosis Foundation patient registry 2012 annual data report. Maryland 2013.
9. Kelly A, Moran A. Update on cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros.* 2013 Jul; 12(4):318-31.
10. Rowland M et al. Outcome in patients with cystic fibrosis liver disease. *J Cyst Fibros.* 2014 Jun 7. Pii
11. Jarzabek M et al. Cystic fibrosis as a cause of infertility. 2004 Jul;4(2):119-29.
12. Munck A, Ballmann M, Lindblad A. Pediatric respiratory medicine. Extrapulmonary manifestations of CF.
13. Cepero R, Smith RJH, Catlin FI, Bressler KL, Furuta GT, Shandera KC. Cystic fibrosis — An International Journal of Otolaryngology otolaryngologic perspective.
14. Godoy JM, Godoy AN, Ribalta G, Largo G. Bacterial pattern in chronic sinusitis and cystic fibrosis. *Otolaryngology.* Vol. 145, pp. 673–676, 2011.
15. EPOS: European Position Paper on Rhinosinusitis and nasal polyps 2012.
16. Kerem E et al. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis* 2005 Mar; 4(1):7-26
17. Peters S. Cystic Fibrosis: a review of pathophysiology and current treatment recommendations. 2014 Apr; 67(4):148-51, 153
18. Regamey N, Barben J. ERS. Pediatric respiratory medicine. CF lung disease.
19. Cohen-Cymerknoh M et al. Managing in Cystic Fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. Review 2011.
20. Goralski JL, Donaldson SH. Hypertonic saline for cystic fibrosis: worth its salt? *ERS* 2014 Jun; 8(3):267-9.
21. Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry Annual Data Report 2011
22. <http://www.cysticfibrosis.ca/cf-care/cf-registry>
23. Bush A. et al. Cystic Fibrosis in the 21th Century. *Prog Resppir Res.* Basel, Karger, 2006, vol 34: 131-137
24. Bush A. et al. Cystic Fibrosis in the 21th Century. *Prog Resppir Res.* Basel, Karger, 2006, vol 34: 145-152
25. <http://www.cysticfibrosis.ca/cf-care/cf-registry>

26. Italian Cystic Fibrosis Research Foundation
27. Wang W, Chen MH, Lai HC, Wang X, Yan J, Zhang Z. Onset of persistent pseudomonas aeruginosa infection in children with cystic fibrosis with interval censored data. *BMC Med Res Methodol*. 2016 Sep 17;16(1):122.
28. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066–1073.[PubMed]
29. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 1991;253(5016):202–205.[PubMed]
30. Bear CE, Li CH, Kartner N, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) *Cell*. 1992;68(4):809–818.[PubMed]
31. Li C, Naren AP. CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. *Integr Biol (Camb)* 2010;2(4):161–177.[PMC free article][PubMed]
32. Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(7):593–597.[PubMed]
33. Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440:477–483.
34. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1981;305:1489–1495.
35. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O’Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*. 2004;10:487493.
36. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153:S4–S14.
37. Kerem B, Chiba-Falek O, Kerem E. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test*. 1997;1:35–39.
38. Cystic Fibrosis Registry Report Trust. Annual Data Report 2010, December 2011. Available from: UK CF Registry – Annual Data Report 2010 Accessed May 16, 2013.
39. Patient Registry. Annual Data Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2011. Available from: <http://www.cff.org/LivingWithCF/QualityImprovement/PatientRegistryReport/>. Accessed May 16, 2013.
40. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2003;361:1671–1676.
41. Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, et al. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly-Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet*. 1992;51:245–250.
42. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, et al. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med*. 1994;331:974–980.

43. Kulczycki LL, Kostuch M, Bellanti JA. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet A*. 2003;116A: 262–267.
44. Davis PB, Schluchter MD, Konstan MW. Relation of sweat chloride concentration to severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38:204–209.
45. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130:1441–1447.
46. de Gracia J, Mata F, Alvarez A, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005;60:558–563.
47. Shoshani T, Augarten A, Gazit E, et al. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet*. 1992;50:222–228.
48. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67:471–485.
49. Cystic Fibrosis Mutation Database. CFTR1, 2013. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>. Accessed May 16, 2013.
50. Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290: L1117–L1130.
51. Clinical and Functional Translation of CFTR. CFTR2. Available from: <http://www.cftr2.com>. Accessed January 19, 2013.
52. Hudock KM, Clancy JP. An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2017 Dec;22(4):331–46 [Epub 2017 Dec 22. PubMed PMID:29264936].
53. Pedemonte N, Sonawane ND, Taddei A, et al. Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective delta F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating. *Mol Pharmacol*. 2005 May;67(5):1797-807. Epub 2005 Feb 18.
54. Pedemonte N, Boido D, Moran O, et al. Structure-activity relationship of 1,4-dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Mol Pharmacol*. 2007 Jul;72(1):197-207. Epub 2007 Apr 23.
55. Pedemonte N, Diena T, Caci E, et al. Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations. *Mol Pharmacol*. 2005 Dec;68(6):1736-46. Epub 2005 Sep 8.
56. Moran O, Zegarra-Moran O. A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein. *FEBS Lett*. 2005 Jul 18;579(18):3979-83.
57. Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest*. 1992 Jan;89(1):339-49.
59. Pedemonte N, Lukacs GL, Du K et al. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2564-71. Epub 2005 Aug 25.

60. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373(3):220–231.
61. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell*. 2016;27(3):424–433.
62. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013–2023.
63. deBoeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros*. 2014;13(6):674–680.
64. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature*. 1991;352(6336):628–631.
65. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*. 1990;347(6291):358–363.
66. Protasevich I, Yang Z, Wang C, et al. Thermal unfolding studies show the disease causing F508del mutation in CFTR thermodynamically destabilizes nucleotide-binding domain 1. *Protein Sci*. 2010; 19(10):1917–1931.
67. Rowe SM, Daines C, Ringshausen FC, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2024–2035.
68. Rowe SM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7): 1–15.
69. Heijerman HGM, McKone EF, Downwy DG, et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen on people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomized, phase 3 trial. *Lancet* 2019 October 31 (Epub ahead of print).
70. Middleton PG, Mall MA, Drevinek P, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med* 2019; published online Oct 31. DOI:10.1056/NEJMoa1908639.
71. Tullis E, Colombo C, Davies JC, et al. Preliminary safety and efficacy of triple combination CFTR modulator regimens in CF. Poster 777. In: The 31st Annual North American Cystic Fibrosis Conference; November 2–4, 2017; Indianapolis, IN.
72. Alton EW, Boyd AC, Porteous DJ, et al. A phase I/IIa safety and efficacy study of nebulized liposome-mediated gene therapy for cystic fibrosis supports a multidose trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1389–1392. [PubMed]
73. Griesenbach U, Inoue M, Meng C, et al. Assessment of f/hn-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:846–856. [PMC free article][PubMed]
74. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*. 2013;13:653–658. [PubMed]

75. Bellec J, Bacchetta M, Losa D, et al. CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and crispr-cas9 genome editing in human airway epithelial cells. *Curr Gene Ther.* 2015;15:447–459.[PubMed]
76. Mckone EF, Borowitz D, Drevinek P, et al. Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open label extension study (PERSIST). *Lancet Respir Med.* 2014;2(11):902–910.
77. Molinski SV, Ahmadi S, Ip W, et al. Orkambi[®] and amplifier co-therapy improves function from a rare *CFTR* mutation in gene-edited cells and patient tissue. *EMBO Mol Med.* 2017;9(9):1224–1243.
78. Rabeh WM, Bossard F, Xu H, et al. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore $\Delta F508$ CFTR folding and function. *Cell.* 2012;148(12):150–163.
79. Palechor-Ceron N, Supryniewicz FA, Upadhyay G, et al. Radiation induces diffusible feeder cell factor(s) that cooperate with ROCK inhibitor to conditionally reprogram and immortalize epithelial cells. *Am J Pathol.* 2013 Dec;183(6):1862-1870. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.009. Epub 2013 Oct 3
80. Galiotta LJ, Lantero S, Gazzolo A, et al. An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Jun;34(6):478-81.
81. Fanen P, Labarthe R, Garnier F, et al. Cystic fibrosis phenotype associated with pancreatic insufficiency does not always reflect the cAMP-dependent chloride conductive pathway defect. Analysis of C225R-CFTR and R1066C-CFTR. 1997 011 28;272(48):30563-6