

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jan Křesťan

Moderní terapie cystické fibrózy

Therapeutic Strategies in Cystic Fibrosis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Praha, 2020

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Lucie Bořek-Dohalské, Ph.D. a veškeré použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....

Jan Křest'an

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení mé práce.

ABSTRAKT

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno mutacemi v *CFTR* genu. Cílem práce je shrnutí zjištěných skutečností z oblasti léčby cystické fibrózy CFTR modulátory.

V první části práce je popsáno samotné onemocnění, jeho historie a příznaky. Rovněž jsou zde uvedeny příčiny onemocnění, a to formou popisu *CFTR* genu a mutací, které vedou k onemocnění cystickou fibrózou. V práci je rovněž popsána funkce CFTR proteinu. Dále se práce věnuje symptomatické léčbě a zmiňuje genovou terapii.

Druhá část práce shrnuje aktuální poznatky o léčbě CFTR modulátory. Rozděluje tyto sloučeniny do pěti skupin na CFTR potenciátory, korektory, amplifikátory, stabilizátory a read-through agents. V poslední části práce je nastíněn pohled do budoucna vzhledem k modulátorovým terapiím, které jsou ještě ve vývoji.

Klíčová slova: cystická fibróza, *CFTR* gen, CFTR protein, CFTR modulátory

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autozomal recessive disease caused by mutations in the *CFTR* gene. The aim of this work is conclusion of the recent knowledge from the usage of CFTR modulators in the treatment of cystic fibrosis.

The first part of this bachelor thesis is dedicated to the disease itself, its history and symptoms. In the form of description of the *CFTR* gene and its mutations which lead to the cystic fibrosis disease, the causes of the disease are described. Function of CFTR protein is also mentioned.

The second part of this thesis is focused on conclusion of the current knowledge of the CFTR modulators treatment. In the last chapter of the work, possible future changes and ways of treating patients with CFTR modulators therapy are considered.

Key words: cystic fibrosis, *CFTR* gene, CFTR protein, CFTR modulators

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1. Úvod.....	8
2. Cíl práce.....	10
3. Přehled literatury	11
3.1 Cystická fibróza.....	11
3.1.1 Cystická fibróza v datech.....	12
3.1.2 Historie onemocnění.....	13
3.1.3 Projevy onemocnění	14
3.1.3.1 Respirační potíže.....	15
3.1.3.2 Potíže spojené s gastrointestinálním traktem.....	16
3.1.3.3 Další možné potíže	18
3.2 <i>CFTR</i> gen a <i>CFTR</i> protein.....	18
3.2.1 <i>CFTR</i> gen	18
3.2.2 <i>CFTR</i> protein	19
3.2.3 Třídy mutací <i>CFTR</i> genu a jejich dopady na <i>CFTR</i> protein.....	22
3.2.3.1 Třída I.....	23
3.2.3.2 Třída II.....	23
3.2.3.3 Třída III.....	24
3.2.3.4 Třída IV.....	24
3.2.3.5 Třída V.....	24
3.2.3.6 Třída VI.....	25
3.2.3.7 Třída VII	25
3.3 Symptomatická léčba cystické fibrózy.....	25
3.3.1 Symptomatická léčba problémů spojených s respiračními potížemi.....	26
3.3.2 Symptomatická léčba problémů spojených s gastrointestinálním traktem.....	27
3.4 Genová terapie v léčbě cystické fibrózy	27
3.5 <i>CFTR</i> modulátory	28
3.5.1 <i>CFTR</i> potenciátory.....	29
3.5.2 <i>CFTR</i> korektory	34
3.5.3 <i>CFTR</i> amplifikátory	40
3.5.4 <i>CFTR</i> stabilizátory.....	40
3.5.5 <i>CFTR</i> read-through agents.....	43
3.6 Vyhledky do budoucna.....	44
8. Seznam použité literatury	49

SEZNAM ZKRATEK

CF	cystická fibróza
CFTR	“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
ECFS	“European Cystic Fibrosis Society“
CFF	“Cystic Fibrosis Foundation“
ASL	“airway surface liquid“
PCL	“periciliary liquid layer“
ENaC	“epithelial Na ⁺ channel“
GIT	gastrointestinální trakt
ABC	“ATP Binding Casette“
MSD	“Membrane Spanning Domain“
NBD	“Nucleotide Binding Domain“
PKA	proteinkináza a
PKC	proteinkináza c
PTC	“Premature Termination Codon“
HTS	“High Throughput Screening“
FDA	“Food and Drug Administration“
FEV ₁	objem vydechnutý s největším úsilím za první sekundu po maximálním nádechu
CYP3A	cytochrom P450 (rodina 3, podrodina A)
lum/iva	kombinovaná terapie lumacaftor/ivacaftor
tez/iva	kombinovaná terapie tezacaftor/ivacaftor
ela/tez/iva	kombinovaná terapie elaxacaftor/tezacaftor/ivacaftor
PPQC	“peripheral protein quality control“

1. Úvod

Cystická fibróza je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které je způsobeno mutací v *CFTR* genu. Následkem mutace tohoto genu dochází k poškození CFTR proteinu, který funguje v organismu jako kanál transportující chloridové ionty. Narušení transportu chloridových iontů způsobuje vznik hustého hlenu v orgánových soustavách pacientů a vede k jejich postupnému poškození.

Moderní terapie CFTR modulátory léčí příčinu onemocnění cystickou fibrózou. Umožňuje nápravu chyb v syntéze CFTR proteinu u postižených jedinců. Aktuálně je užíváno nebo vyvíjeno velké množství účinných látek. Mezi CFTR modulátory řadíme korektory, potenciátory, amplifikátory, read-through agents a stabilizátory. V současné době se tato forma terapie dostává do popředí díky nejnovější kombinaci modulátorů pod obchodním názvem Trikafta, která je velmi úspěšná. Problémem modulátorové je velké množství mutací *CFTR* genu, které se mohou u pacientů vyskytovat. Z toho důvodu je nutné nalezení vhodných modulátorů pro různé druhy těchto mutací, což je složité. Nevýhodou terapie je její vysoká finanční nákladnost a nutnost užívat CFTR modulátory po celou dobu života.

V úvodní části se předkládaná práce popisuje historii onemocnění, informuje o nadnárodních organizacích, které se problematice cystické fibrózy věnují. Dále jsou zmíněny projevy tohoto komplexního onemocnění, převážně v dýchací soustavě a gastrointestinálním traktu. V těchto orgánových soustavách je onemocnění nejvíce patrné a pro pacienty spojené s největším rizikem.

V předkládané práci jsou uvedeny příčiny onemocnění. Převážně se jedná o problémy způsobené zahuštěním hlenu, který se vyskytuje na vnitřním povrchu orgánových soustav. K zahuštění hlenu dochází právě vlivem špatné funkce CFTR proteinu. Jeho popis a popis jeho funkce je uveden spolu s popisem *CFTR* genu. Práce dále uvádí výpis jednotlivých mutací *CFTR* genu. Rozčleňuje tyto mutace do jednotlivých tříd.

Symptomatická léčba je další důležité téma k nastínění problematiky onemocnění cystickou fibrózou. Jsou uvedeny různé druhy léčby pro dané orgánové soustavy, které jsou nejvíce zasaženy cystickou fibrózou.

Předkládaná práce se zmínuje o genové terapii, která však aktuálně nemá na trhu aktivní léčbu ke klinickému využití. Rovněž se však řadí do moderních terapií cystické

fibrózy. Tato práce si však především klade za cíl zmapovat terapii CFTR modulátory, jejichž vývoj v aktuální době velmi pokročil díky kombinování různých druhů těchto sloučenin a objevu nových potenciálních sloučenin s různým mechanismem. V práci jsou CFTR modulátory rozděleny do pěti skupin a jsou popsány nejnadějnější látky pro další zkoumání či využití v léčbě.

Poslední část práce se zaměřuje na budoucnost modulátorových terapií, stanovuje cíle pro zlepšení terapie a zmiňuje CFTR modulátory, které jsou aktuálně testovány. Rovněž zmiňuje jejich potenciální využití v léčbě cystické fibrózy u pacientů s určitým typem mutací. Zároveň je zvažována finanční stránka celé léčby.

2. Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce je aktuální rešerše poznatků z vývoje CFTR modulátorů jako možnosti moderní terapie cystické fibrózy. Cílem je popsat aktuálně využívané nebo vyvíjené CFTR modulátorové terapie a nastítnit možnosti dalšího vývoje tohoto směru terapie.

3. Přehled literatury

3.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (dále jen CF) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění kavkazské populace, tedy lidí evropského původu. CF významně ovlivňuje délku života a jeho kvalitu. Pro pacienty nemocné touto chorobou je nutností celoživotní každodenní léčba. CF postihuje transport chloridových iontů v buňkách epitelu. To má za následek nepříznivou změnu ve funkci mnoha soustav, jako je například dýchací, endokrinní, gastrointestinální a reprodukční soustava [1,2].

Toto pro organismus negativní ovlivňování transportu chloridových iontů je zapříčiněno mutacemi *CFTR* genu (z anglického “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), který kóduje CFTR protein. Tento membránový protein reguluje pohyb iontů a vody skrz buněčnou stěnu epitelu [3]. V současné době je známo zhruba 2000 různých typů mutací tohoto genu, přičemž nejčastěji se vyskytující mutací je F508del [1,4]. Je to mutace charakteristická delecí tří párů bází v *CFTR* genu, což vede k absenci fenylalaninového zbytku v pozici 508, který se u zdravých jedinců běžně v aminokyselinové sekvenci vyskytuje [2].

Přes to, že se jedná o monogenní onemocnění, jde o velice závažnou nemoc, a to právě z důvodu zmíněného vysokého počtu mutací. Tento fakt totiž znesnadňuje vývoj jednotné léčby, která by pomohla všem pacientům s CF. V současné době je CF nemocí léčitelnou, ale nevyléčitelnou. Kvůli komplexním vlivům mutací *CFTR* genu na funkci orgánových soustav je nadmíru důležitá symptomatická léčba dle individuálních postižení nemocných. Zároveň se moderní terapie zaměřuje na možnost kauzální léčby. Jde jak o léčbu genovou, která probíhá zásahem do lidského genomu, tak o léčbu pomocí tzv. *CFTR* modulátorů, jež korigují *CFTR* protein a potencují narušený transport chloridových iontů.

Díky pokrokům v diagnostice této nemoci jsme v dnešní době schopni odhalit toto onemocnění již v rámci novorozeneckého screeningu a tím předejít fatálním dopadům pozdního započetí léčby [5,6].

3.1.1 Cystická fibróza v datech

Ročně dochází k diagnostikování CF u přibližně jednoho dítěte z 3000 narozených [4]. Četnost pacientů a rozmanitost projevů CF si vynutily vznik organizací, jež shromažďují důležitá statistická data o pacientech s tímto onemocněním. Data shromažďují v registrech CF pacientů a každoročně vydávají shrnující zprávy, které mají za cíl poskytnout kvalitní přehled informací o pacientech s CF pro vědecké účely, porovnat výskyt CF v různých státech nebo definovat skupiny pacientů vhodných pro daný typ léčebného postupu [7].

Významnou organizací je evropská “European Cystic Fibrosis Society“ (dále ECFS), která spojuje evropské i mezinárodní vědecké či klinické odborníky na problematiku CF. Sbírá data z příslušných organizací na úrovni jednotlivých států. Pořádá pravidelné konference, během kterých se prezentují např. pokroky v léčbě a nové poznatky o méně častých, ale i často se vyskytujících mutacích. Tato organizace rovněž vydává časopis “Journal of Cystic Fibrosis“. V neposlední řadě pak ECFS napomáhá zakládání celonárodních organizací ve státech, které ještě nejsou součástí této globální sítě. Další důležitou organizací je např. americká “Cystic Fibrosis Foundation“ (dále jen CFF), jejíž činnost je obdobná ECFS. Český registr pacientů je spravován „Centrem cystické fibrózy Fakultní nemocnice v Motole“ [8,9].

V rozsáhlých registrech zmíněné organizace shromažďují informace např. o doposud objevených mutacích v genu způsobujícím CF. Tyto informace doplňují statistikou četnosti výskytu v dané populaci. Zaměřují se rovněž na problematiku a výskyt mikroorganismů v dýchací soustavě pacientů s CF, na četnost výskytu jednotlivých druhů a příznaky jimi způsobené. V registrech také nalezneme spirometrická data pacientů, vývoj zdravotního stavu u pacientů s transplantací plic a počet pacientů, u kterých byl tento zákrok proveden. Rovněž zde nalezneme statistiku doby dožití a příčin úmrtí. V současné době jsou dle sesbíraných dat dominantní příčinou smrti respirační či kardiorepirační potíže. Další důležitou položkou jsou informace o aktuálně dostupných lécích a jejich možném využití pro určité skupiny pacientů [10,11].

Za zmínku stojí zejména statistika průměrného věku dožití pacientů s CF. Ten, jak se ukazuje, postupně stále narůstá. Průměrný věk úmrtí nezávisle na pohlaví dosahuje až 40

let stárí pacienta. Tento trend je pravděpodobně způsoben neustálým zlepšováním léčebných technologií. Uvedme pro srovnání, že např. ročníky narozené na počátku devadesátých let měly průměrný věk dožití kolem 30. roku života. Za pozitivní lze považovat fakt, že do 10 let života umírá jen minimum pacientů s diagnózou CF [10,11].

Ve své výroční zprávě shrnující data ze svého registru pacientů za rok 2017 CFF rovněž poukazuje na neustále narůstající počet pacientů CF, kteří nově podstupují léčbu CFTR modulátory. Speciálně poukazuje na lék Ivacaftor, který byl roku 2012 schválen k léčbě pacientů starších šesti let, u kterých se potvrdila přítomnost mutace G551D. Roku 2017 byla již tato forma terapie schválena pro pacienty, kteří dovršili druhý rok života, a byla rozšířena o přítomnost dalších variant mutací [11].

Důležitý projekt vznikl spoluprací ECFS a “EuroCareCF“, které spustily roku 2008 tzv. “ECFS-Clinical Trial Network“, což je síť umožňující přístup do databází 43 center, která se zabývají CF [12].

3.1.2 Historie onemocnění

Historie onemocnění je poměrně rozsáhle prozkoumána. První záznamy o příznacích spojovaných s CF se objevují již v období středověku, kdy byly popsány případy pro CF charakteristického slaného potu dětí, které brzy umíraly [13]. Nemoc byla v této době spojována s čarodějnictvím. Z poloviny 17. století máme dokumentovány případy malých dětí, u kterých se pravděpodobně CF projevila. Postupem času se objevilo více záznamů o pacientech, nicméně nemoc jako taková komplexně popsána nebyla [14].

Roku 1938 Andersenová ve své studii poprvé popsala CF jako cystickou fibrózu pankreatu [15]. Po ukončení 2. světové války se informace o výskytu nemoci šířily poměrně pomalu. Většina dětí, které se narodily s CF, se dožívala zhruba jednoho roku. V USA se o hlubší prozkoumání nemoci zasloužil Paul di Sant’ Agnese. Podařilo se mu zobecnit pojetí nemoci. Dokázal, že cystická fibróza pankreatu je mnohem obecnější onemocnění a nemusí vždy souviset se špatnou činností pankreatu, ale může ovlivňovat prakticky všechny sekreční exokrinní žlázy. Zároveň se zabýval studiem potu dětí trpících touto nemocí, a zjistil, že obsahuje více soli než pot dětí zdravých. Tím potvrdil spolehlivost “potního testu“ pro diagnostiku CF [13,16]. Potvrzení “potního testu“ pro diagnostiku CF bylo klíčové a tato metoda je využívána dodnes.

Dalšími důležitými kroky v definování nemoci bylo objevení snížené propustnosti buněčných membrán pro chloridové ionty Quintonem v roce 1983 [17] a objevení *CFTR* genu Keremovou a spol. roku 1989 [2].

Se stále narůstajícím počtem získaných vědomostí ohledně nemoci docházelo k postupnému zakládání specializovaných organizací, které se zaměřovaly na pomoc nemocným při léčbě, vědeckovýzkumný rozvoj v oblasti CF, na souhrn dat z daných míst či šíření nejdůležitějších informací pro nemocné a jejich blízké. První takovouto organizací byla již zmíněná „Cystic Fibrosis Foundation“ založená v USA roku 1955. Deset let po jejím založení došlo v Paříži ke vzniku „Mezinárodní společnosti pro cystickou fibrózu (mukoviscidózu)“ (z anglického International Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis) Association), která byla později nahrazena organizací „Cystic Fibrosis Worldwide“. Ta spojuje 67 zemí světa pomocí lokálních menších organizací. Usiluje o to, aby byla nemocným CF dopřána kvalitní péče, a pomáhá organizacím v členských zemích při získávání podpory od vlády [13,18].

V České republice se do roku 1960 diagnostikovala CF na základě špatné činnosti pankreatu. Výraznější zlepšení přineslo období 90. let, kdy došlo k zakládání center pro léčbu CF, objevily se adekvátní léky a začaly se provádět transplantace plic. Roku 1992 byl založen Klub nemocných cystickou fibrózou, který spolupracuje s „Cystic Fibrosis Worldwide“ a podniká různé podpůrné činnosti v oblasti léčby a šíření informací o CF [13,19]. Od 1. října 2009 je na území České republiky prováděn celoplošný novorozenecký screening k včasnému odhalení onemocnění CF. Zavedení této diagnostické metody bylo ověřeno v zahraničí a setkala se s úspěchy i na území ČR [20,21].

3.1.3 Projevy onemocnění

Jak již bylo zmíněno, CF je onemocnění velice komplexní. Postihuje mnoho orgánových soustav, jejichž činnost je spojena s *CFTR* proteinem, konkrétně s jeho funkcí přenosu iontů a vody přes membránu buněk epitelu. U pacientů je však projev onemocnění velmi variabilní v závislosti na typu mutace v *CFTR* genu [1].

Pro nemoc je charakteristická tvorba viskózního sekretu v pankreatu, plicích a dalších orgánech následkem mutace v *CFTR* genu vedoucí k již zmíněné špatné regulaci pohybu iontů a vody skrz buněčnou membránu. Dochází ke vstřebávání vody, dehydrataci sekretu a tím pádem ke zvýšení jeho viskozity. Takto zhuštěný sekret negativně ovlivňuje

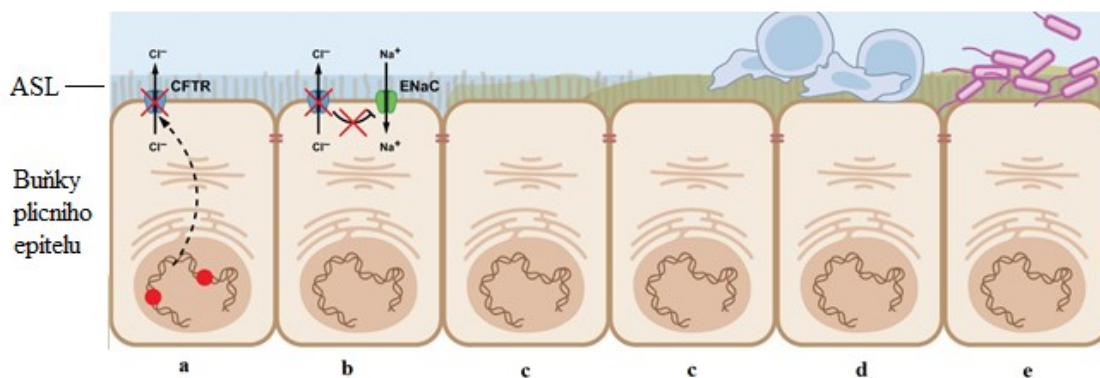
činnost plic, způsobuje jejich zanášení a následné usazování bakterií a napomáhá vzniku zánětů. V pankreatu může blokovat uvolňování důležitých enzymů [3,22].

Dalším charakteristickým znakem pro jedince s CF je jejich slaný pot. Obsahuje větší množství chloridových a sodných iontů než u jedinců zdravých. Díky tomu je možné nemoc plošně diagnostikovat pomocí zmíněného “potního testu“. Zároveň díky této skutečnosti hrozí pacientům nemocným CF nebezpečí přílišné ztráty solí, zvláště pak při vysokých teplotách nebo při vysoké zátěži, kdy dochází k výraznějšímu pocení. Množství vypocené tekutiny se však od zdravých jedinců neliší [23,24].

3.1.3.1 Respirační potíže

Postižením dýchací soustavy trpí většina nemocných CF a, jak již bylo řečeno, jedná se o nejčastější příčinu úmrtí. U zdravých jedinců plíce produkují hlen, který slouží k ochraně před vdechnutými přenašeči infekce nebo látek toxické povahy. Tato tekutina se nazývá ASL (z anglického “airway surface liquid“). Má dvě vrstvy: periciliární tekutinu (PCL, z anglického “periciliary liquid layer“, a hlenovou vrstvu. Vrstva PCL na rozdíl od hlenové vrstvy neobsahuje muciny a je charakteristická nízkou viskozitou. Vlastnosti mucinů závisí na pH, obsahu vody a solí. Zdravé plíce jsou schopné tzv. „mukociliární clearance“ – čištění plic pomocí těchto vrstev. Omezená funkce nebo nepřítomnost CFTR proteinu ovlivní složení ASL a tím sníží čistící funkci plic. Pacienti s CF jsou tak vystaveni život ohrožujícímu nebezpečí ze strany mikroorganismů, které jsou pro zdravé jedince prakticky neškodné. Mezi nejzávažnější mikroorganismy, které napadají plíce nemocných CF, patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Stenothrophomonas maltophilia* nebo *Staphylococcus aureus*. [13,25,26].

Při infikování plic výše zmíněnými bakteriemi se imunitní systém brání pomocí velkého množství neutrofilních granulocytů. Jejich rozkladem se však uvolňuje velké množství DNA, které ještě více zahušťuje hlen v plicích. Mimo jiné také produkují velké množství elastázy, která rokládá elastin a jiné strukturální proteiny ve stěně dýchacích cest. To má za následek snižování ochrany před infekcemi, či před mechanickým poškozením, což ovlivňuje správnou schopnost dýchání [27,28]. Kaskádu dějů probíhajících při samotné patogenezí lze sledovat na obrázku 1 na straně 17.



Obrázek 1: Znázorněná kaskáda dějů při patogenezi v plicích u nemocných CF s nefunkčním CFTR proteinem. a – porušená tvorba *CFTR* proteinu; b – nefunkční *CFTR* protein, absorpce sodných iontů; c – zvyšování viskozity hlenu, d – zánět, zjizvení tkáně; e – bakteriální infekce. Převzato a upraveno z [29].

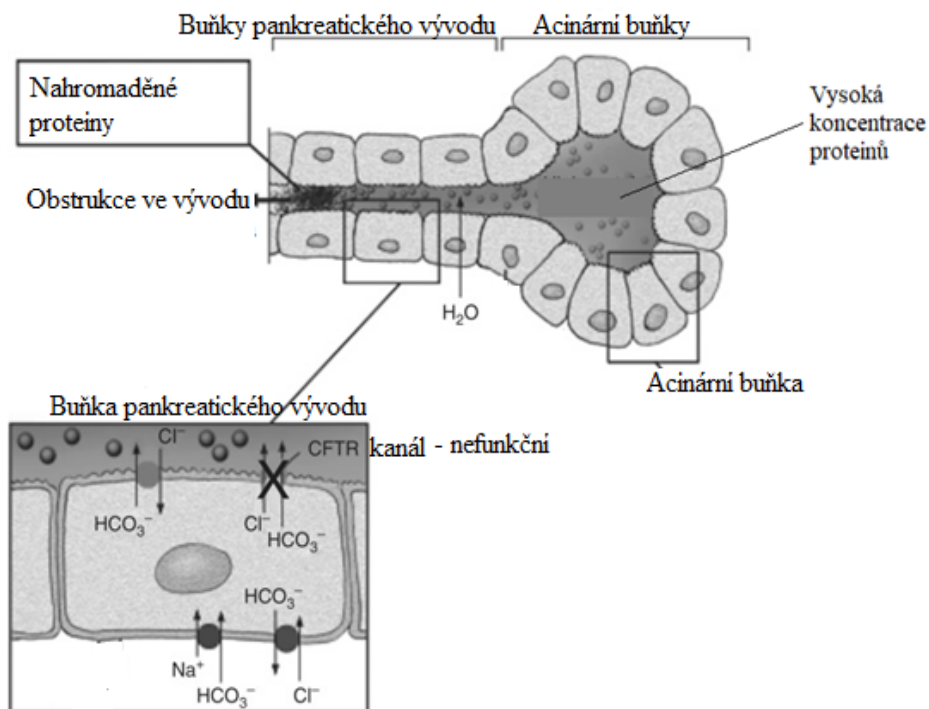
Ve fázi **1.a** na obrázku 1 sledujeme *CFTR* gen, u něhož se vyskytuje mutace vedoucí k onemocnění CF. Z genu je syntetizován CFTR protein, který není schopen následkem mutace v *CFTR* genu přenášet chloridové ionty. Na obrázku **1.b** dochází k absorpci sodných iontů pomocí sodného kanálu ENaC (z anglického “epithelial Na⁺ channel“). Spolu se sodnými ionty je z ASL transportována i voda, což zvyšuje viskozitu hlenu. Následkem toho dochází k porušení funkce mukociliární clearance a to vyústí v zúžení až ucpání dýchacích cest (fáze **1.c**). Následně dochází k bakteriální infekci a zánětu, který vede k zjizvení tkáně (fáze **1.d, 1.e**). Tato fáze se označuje jako destruktivní cyklus. Tato kaskáda dějů vede k nenávratnému poškození plic, což je stav řešitelný pouze transplantací [29].

V prvním roce života může CF způsobit obstrukční respirační onemocnění bronchiolitidu, která je způsobována virovou infekcí s přičiněním bakteriálních patogenů. Velmi častým příznakem CF spojeným s respirační soustavou je chronický kašel, který je u dětí často spojen s vykašláváním hlenu. Dalšími projevy jsou tachypnoe, dušnost či cyanóza. Velmi častá je i bolest na hrudníku [13].

3.1.3.2 Potíže spojené s gastrointestinálním traktem

Potíže s gastrointestinálním traktem (dále jen GIT) spočívají primárně v problémech s pankreatem. Většina pacientů CF trpí poškozením tohoto orgánu, což je opět způsobeno převážně špatnou funkcí či nepřítomností CFTR proteinu a následně již popsány problémy s hlenem vylučovaným buňkami epitelu. Poškození funkce pankreatu může u nemocných

CF vést až k nevratnému poškození samotného orgánu. Problematika pankreatu u pacientů s CF je znázorněna na obrázku 2 na straně 18 [25].



Obrázek 2 – Znázornění obstrukce v pankreatických vývodech způsobené nesprávnou funkcí CFTR kanálu. Znázornění nefunkčního CFTR kanálu, jehož důsledkem neproudí přes buněčnou stěnu chloridové ionty. Následkem toho se zahušťuje oblast pankreatického vývodu a dochází k ucpávání vývodu. Nahromaděné proteiny nemohou opustit pankreas.

Převzato a upraveno z: [25].

Acinární buňky v pankreatu produkují velké množství proteinů, které je stejné pro nemocné CF i zdravé jedince. U zdravých jedinců jsou proteiny rozpuštěny v málo viskózní tekutině a vylučovány pankreatickými vývody. U nemocných CF dochází vlivem zhuštění hlenu k pomalejšímu průtoku této tekutiny, což vede ke vzniku obstrukcí v pankreatických vývodech, způsobenými velkou koncentrací neodplavených proteinů [13,25].

V souvislosti s problémy s pankreatem u nemocných CF se pacienti rozdělují na pankreaticky suficientní (15 % populace) a insuficientní (85% populace). Rozhodujícím faktorem je schopnost jedince se vyvíjet, udržovat zdraví a trávit potravu bez nutnosti přijímání pankreatických enzymů spolu se stravou. Pankreatická insuficience je způsobena nízkým pH v duodenu, které negativně ovlivňuje aktivitu trávicích enzymů. Následkem této skutečnosti má nemocný potíže při trávení potravy a s tím spojeným využíváním energie k fungování organismu. Variabilita CF se projevuje i v tomto případě. U většiny pacientů se

pankreatická insuficience projevuje již od prvního roku života, nicméně někteří se pankreaticky insuficientními stávají až později. Určitá skupina jedinců zůstává pankreaticky suficientními po celou dobu života. Pankreatická insuficience je typická pro jedince s mutacemi *CFTR* genu tříd I, II, III a VI. Pankreatická suficience se po narození vyskytuje převážně u jedinců s mutacemi tříd IV a V [30,31].

Dalším závažným problémem GIT je nízké pH v duodenu. Takto nízké pH negativně ovlivňuje aktivitu pankreatických enzymů [31]. Tato skutečnost má za následek potíže pro nemocného z hlediska trávení potravy a s tím spojeným využíváním energie k fungování organismu.

Neschopnost štěpit složky potravy se u pacientů nemocných CF projevuje od nízkého věku tzv. steatorreou, což je produkce velkého množství mastné stolice s výrazným zápachem. Pacienti rovněž trpí nízkou koncentrací vitamínů rozpustných v tucích. Deficit množství vitamínů E či A může vést až k poškození jater. Následkem popsaných problémů dochází u pacientů vyššího věku k osteoporóze. Mezi další projevy vlivu CF na gastrointestinální trakt jsou např. fibrotizující kolonopatie, pankreatitida nebo mekoniový ileus. Výskyt těchto a dalších problémů je již však velmi individuální a závisí na konkrétní mutaci *CFTR* genu [13,31,32].

3.1.3.3 Další možné potíže

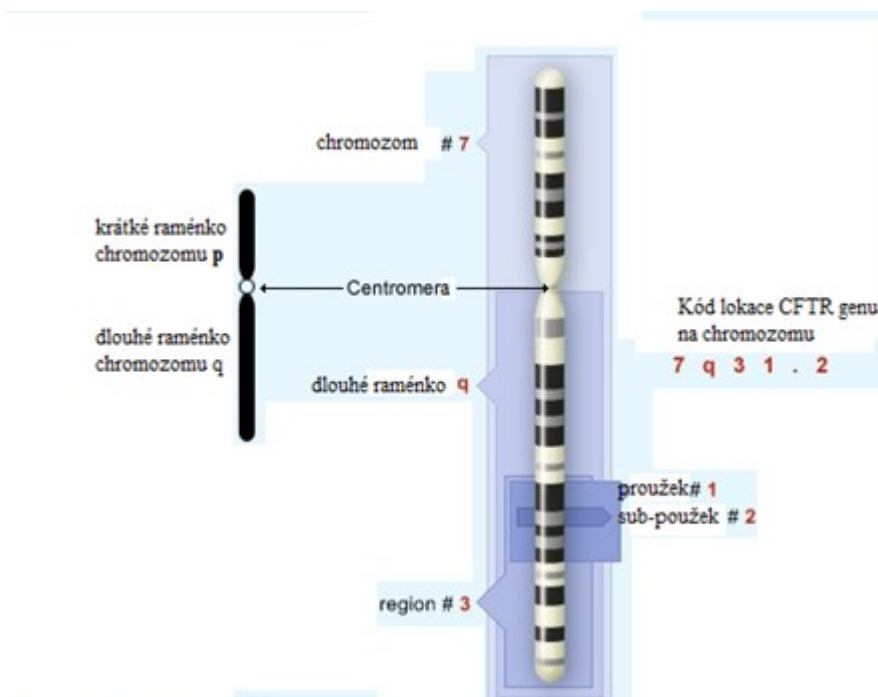
Dalšími možnými problémy jsou diabetes melitus, porucha růstu, poruchy kostního metabolismu, kardiovaskulární komplikace či zmiňovaná porucha reprodukčního ústrojí. Většina mužů trpí neplodností, plodnost žen je snížena vyplněním děložní dutiny viskózním hlenem, který zhoršuje průchod spermií. Otěhotnění je nicméně možné [13].

3.2 *CFTR* gen a *CFTR* protein

3.2.1 *CFTR* gen

CFTR gen byl objeven roku 1989 jako gen, jehož mutace vedou k onemocnění cystickou fibrózou. Díky tomuto objevu bylo možné rozklíčovat jednotlivé mutace tohoto genu a následně zvážit další možnosti léčebné terapie pro některé jedince s mutacemi četného výskytu. Gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7 a obsahuje 250 kb. Transkripce tohoto genu se vytváří mRNA o celkové délce 6,5 kb [33,34]. Díky specifickým markerům vázaných k *CFTR* genu byla lokalizována poloha tohoto genu ještě přesněji, a to

v oblasti označované 7q31.2 kde q značí dlouhé raménko chromozomu [2]. Lokalizace *CFTR* genu je znázorněna na obrázku 3 na straně 20.



Obrázek 3: Lokalizace *CFTR* genu na chromozomu 7. Převzato a upraveno z: [35].

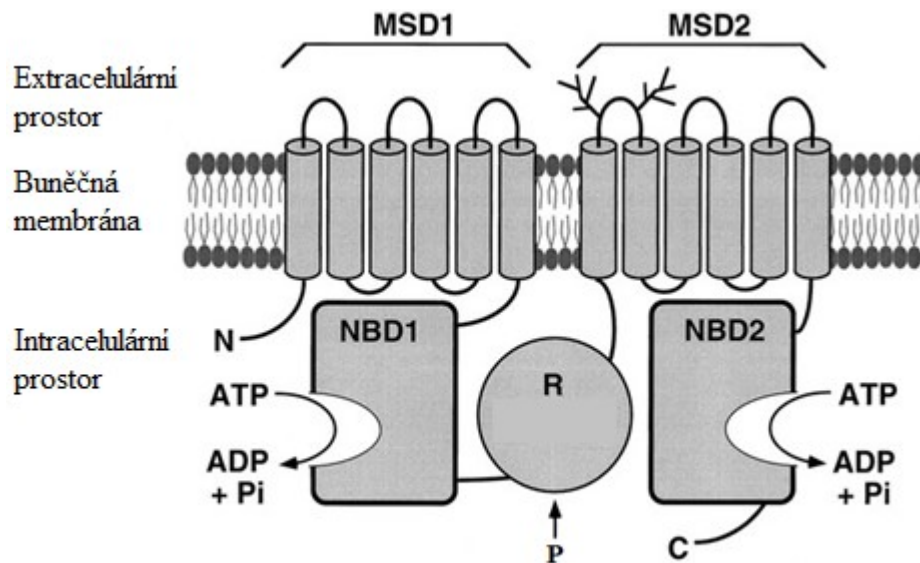
V dnešní době je známo cca 2000 různých typů mutací *CFTR* genu. Mezi nejčastější mutace patří F508del. Je způsobena delecí tří nukleotidů kódujících fenylalanin v pozici 508. Tato mutace se vyskytuje zhruba ve dvou třetinách *CFTR* alel. Ze zmíněných 2000 mutací se 20 vyskytuje ve vyšší četnosti než 0,1% [10,36,37]. Dalšími často se vyskytujícími mutacemi *CFTR* genu jsou např. G542X, G551D, W1282X a R117H s četností výskytu v průměru nad 1%. Četnost výskytu nejběžnější mutace F508del v registru pacientů ECFS odpovídá průměrně 61% *CFTR* alel [10].

3.2.2 *CFTR* protein

Jak již bylo zmíněno *CFTR* protein je kódován *CFTR* genem a je tvořen 1480 aminokyselinami [38]. Patří do rodiny ABC transportérů (z anglického “ATP Binding Cassette”). Je jediným proteinem této třídy, který funguje jako iontový kanál, nicméně otevírání a zavírání kanálu je řízeno interakcí s ATP, což je pro ABC transportéry typické [39].

Funkční struktura *CFTR* proteinu se skládá z pěti domén: ze dvou MSD (z anglického “Membrane Spanning Domain“), dvou NBD (z anglického “Nucleotide Binding

Domain“) a jedné regulační domény (R domain), která je pro ABC transportéry atypická. Struktura proteinu je od N konce: MSD1-NBD1-R-MSD2-NBD2 a je znázorněna na obrázku 4 na straně 21 [40].

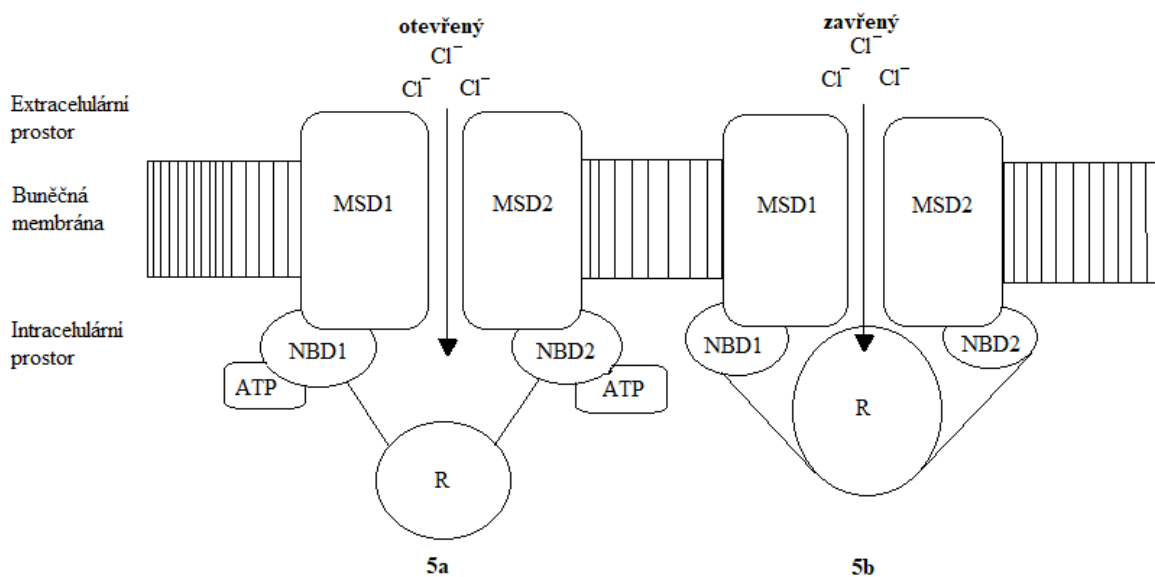


Obrázek 4: Struktura CFTR proteinu. MSD1, MSD2 – domény ukotvující protein v membráně; NBD1, NBD2 – domény vázající a hydrolyzující ATP, R – regulační doména aktivovaná fosfátem (P); Převzato a upraveno z: [40].

Z obrázku 4 na straně 21 je patrné, že MSD1 a MSD2 (neboli TMD1 a TMD2) jsou často tvořeny šesti transmembránovými helixy (TM1-TM6 a TM7-TM12 – na obrázku 4 zleva doprava). Tyto proteinové domény CFTR protein ukotvují v membráně a vytvářejí kanál pro pohyb chloridových iontů. NBD1 a NBD2 jsou kompletně zanořeny v intercelulárním prostoru a nachází se na nich vazebná místa pro ATP. Na těchto doménách probíhá hydrolyza ATP na ADP a fosfát. Regulační doména R se nachází mezi NBD1 a NBD2. To, jestli je tato doména fosforylována nebo nikoliv následně rozhoduje o otevření či zavření CFTR kanálu [40,41].

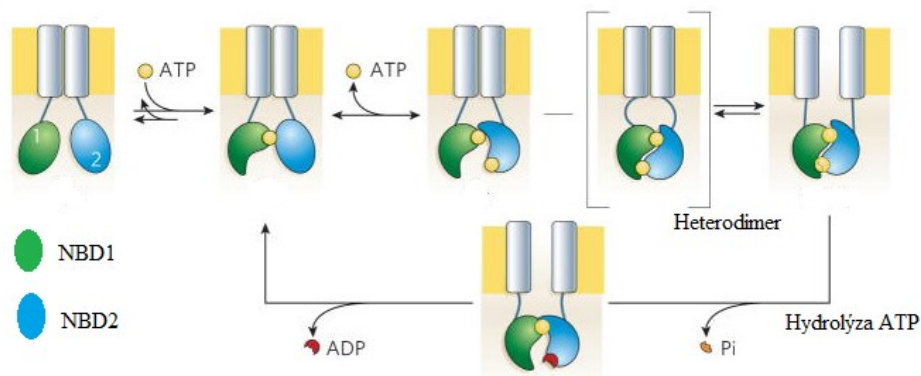
Aktivace CFTR proteinu závisí primárně na aktivitě proteinkinázy c (PKC). Doposud není známo, zda ovlivňuje aktivitu proteinkinázy a (PKA) působením přímo na CFTR protein nebo fosforylací nějakých vedlejších proteinů. PKA je enzym, který katalyzuje fosforylací R domény a její činnost je aktivována druhým poslem cAMP. Z tohoto důvodu bývá CFTR protein označován jako cAMP-aktivovaný kanál. Fosforylace R domény

zabraňuje této doméně blokovat otevření kanálu a průchod iontů [41,42]. Mechanický model sterické blokace kanálu je znázorněn na obrázku 5 na straně 22.



Obrázek 5: Schematické znázornění otevřeného a zavřeného CFTR kanálu. Obrázek 5a – otevřený kanál s fosforylovanou R doménou; obrázek 5b – zavřený kanál. Převzato a upraveno z [13].

Jakmile je CFTR protein aktivován, jeho otevření či zavření závisí na doménách NBD1 a NBD2, které jsou schopny vázat a hydrolyzovat molekuly ATP. Jediný CFTR protein naváže jednu molekulu ATP na NBD1 doménu (na N konci řetězce). Navázání další molekuly ATP na NBD2 doménu (na C konci řetězce) umožní tvorbu heterodimeru z těchto dvou domén, čímž dojde ke změně konformace. Kanál však zůstává zavřený, dokud neproběhne hydrolyza molekuly ATP navázané na NBD1 nebo NBD2. Tento děj způsobí otevření iontového kanálu. Zavření kanálu je poté způsobeno hydrolyzou jedné molekuly ATP na příslušné doméně doprovázené rozpadem heterodimeru, dojde k uvolnění ADP a následně je možný návrat do stavu heterodimeru po navázání ATP. Bylo prokázáno, že hydrolyza ATP může probíhat pro jedno otevření kanálu pouze na jedné doméně [43,44]. Schéma popsaného děje je znázorněno na obrázku 6 na straně 23.



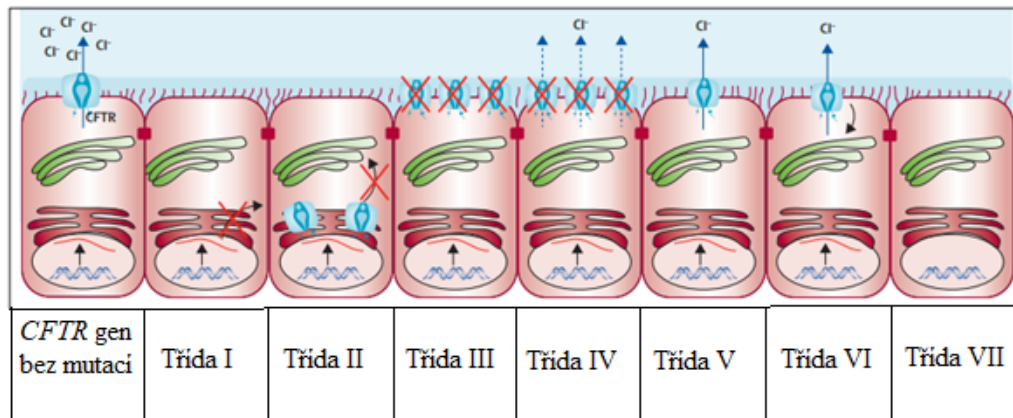
Obrázek 6: Schéma průběhu otevření CFTR kanálu díky vazné a hydrolytické aktivitě domén NBD1 a NBD2. R doména je vynechána. V počáteční fázi se ATP váže na NBD1. Poté dochází k vazbě ATP na NBD2. NBD domény se díky tomu spojují a tvoří přechodný stav, ve kterém se kanál ještě neotevírá. Následně se kanál otevře a tento relativně stabilní stav je narušen hydrolyzou ATP na NBD2 doméně, který následně vede k uzavření kanálu.

Převzato a upraveno z [44].

Jak již bylo uvedeno, CFTR protein působí jako kanál sloužící k přenosu chloridových iontů a jeho porušená funkčnost (způsobená mutacemi v *CFTR* genu) může vést primárně k zvyšování viskozity hlenu v orgánech spojené s exkrecí tekutin následkem výrazného odčerpávání molekul vody z extracelulárního prostoru do buňky.

3.2.3 Třídy mutací *CFTR* genu a jejich dopady na CFTR protein

První rozřídění mutací *CFTR* genu do skupin provedli Welsh a Smith roku 1993, kdy rozřídili mutace do 4 skupin podle toho, jak ovlivňují CFTR protein. Konkrétně se jednalo o rozdělení podle malé či žádné produkce proteinu příslušnými buňkami (první třída), chybné skládání funkční struktury proteinu (druhá třída), porušené regulace aktivity proteinu (třetí třída) a podle nedostatečného či žádného přenosu iontů proteinem (čtvrtá třída) [45]. Dělení se postupem času rozšířilo na pět až šest tříd. Roku 2016 De Boecková a Amaralová rozdělily mutace *CFTR* genu do sedmi různých tříd [46]. Toto dělení je využíváno dodnes jako nejpřehlednější a je znázorněno na obrázku 7 na straně 24. Charakteristiky jednotlivých tříd mutací *CFTR* genu jsou rozvedeny v následujících kapitolách.



Obrázek 7: Rozdělení jednotlivých mutací *CFTR* genu do sedmi tříd. Na obrázku jsou znázorněny buňky epitelu se schematickým znázorněním podstaty jednotlivých mutací, typickými pro danou třídu. Třída I – protein nevzniká; Třída II – protein není dopraven na membránu; Třída III – protein je nefunkční; Třída IV – snížená funkčnost proteinu; Třída V – tvoří se méně proteinu než u zdravých jedinců; Třída VI – protein je méně stabilní; Třída VII – protein nevzniká, protože nevzniká mRNA. Převzato a upraveno z: [46].

3.2.3.1 Třída I

Tato třída pokrývá tzv. “nesmyslné“ (z anglického “nonsense“) mutace. Tyto mutace vedou k tvorbě tzv. předčasných terminačních kodonů označovaných zkratkou PTC (z anglického “Premature Termination Codon“) a tím pádem ovlivňují CFTR protein už ve fázi syntézy. Konkrétně jsou tyto mutace schopny ovlivňovat poločasy rozpadů mutované mRNA. Tento jev je nazýván nonsense-zprostředkovaný rozpad (z anglického “nonsense-mediated decay“). Mutace mohou mít zároveň vliv i na posttranskripční modifikaci mRNA. Z tohoto důvodu je produkce CFTR proteinu buď velmi malá nebo vůbec žádná [47].

Nejčastější mutace, které jsou řazeny do této třídy, jsou G542X, T1282X nebo W1282X. [46,47]

3.2.3.2 Třída II

Do druhé třídy mutací *CFTR* genu se řadí mutace znemožňující dopravení CFTR proteinu na membránu po jeho syntéze. Hlavní problematikou tohoto typu mutací je interakce nově syntetizovaného CFTR proteinu s kontrolním systémem endoplazmatického retikula (dále jen ER). Protein přichází k ER a zmíněný kontrolní systém rozpozná vadu v jeho řetězci nebo jeho chybnou prostorovou strukturu způsobenou mutací v *CFTR* genu.

Takto detekovaný chybný CFTR protein poté není přenášen k dalším úpravám do Golgiho aparátu, ale je dále zadržován na ER nebo dochází k jeho přenosu do lyzozomu, kde dochází k jeho postupné degradaci [48].

Do této třídy se řadí např. mutace F508del, N1303K nebo A561E [46,48].

3.2.3.3 Třída III

Třetí třída mutací *CFTR* genu je spojena s nefunkčností CFTR proteinu jako kanálu, který byl již syntetizován a upraven v ER a Golgiho aparátu. Protein je tedy zanořen do membrány, ale následkem mutace je negativně ovlivněn přenos chloridových iontů [39].

Děje se to následkem neschopnosti CFTR proteinu štěpit ATP. Poškozené místo se nachází na doméně NBD1. Je zamezeno tvorbě heterodimeru mezi doménami NBD1 a NBD2 a nedochází tedy k vazbě a štěpení ATP. Z tohoto důvodu není možné ovlivňovat otevírání CFTR kanálu a díky tomu nemůže být uskutečněn přenos chloridových iontů přes buněčnou membránu [49].

Mezi mutace třetí třídy řadíme např. G551D, S549R nebo G1349D [46].

3.2.3.4 Třída IV

Mutace *CFTR* genu řazené do čtvrté třídy ovlivňují rovněž funkci CFTR proteinu na úrovni přenosu chloridových iontů. Protein je u těchto mutací úspěšně zanořen do membrány. Domény NBD jsou schopny vázat a štěpit ATP. V tomto případě *CFTR* mutací však dochází ke snížení propustnosti kanálu pro chloridové ionty, propouští podstatně menší množství, než je tomu u zdravých jedinců a u této třídy mutací se také zkracuje doba otevření kanálu [46,49].

Mezi tyto mutace se řadí např. R117H, R334W nebo R347P [47].

3.2.3.5 Třída V

Četnost výskytu mutací *CFTR* genu této třídy je nízká. Tyto mutace vedou k syntéze podstatně menšího množství CFTR proteinu, než je obvyklé u zdravého jedince. Je to způsobeno dysregulací. Rovněž mohou mutace této třídy negativně ovlivňovat posttranslační modifikace mRNA. To má za následek syntézu menšího počtu funkčních CFTR proteinů. Poměr množství syntetizovaného funkčního a poškozeného CFTR proteinu je variabilní a mezi pacienty CF se liší [46,49]. K těmto mutacím řadíme např. A455E [46].

3.2.3.6 Třída VI

Do šesté třídy řadíme takové mutace *CFTR* genu, které vedou k syntéze *CFTR* proteinu, který se problematicky zanořuje do buněčné membrány. Jeho snížená stabilita je zapříčiněna chybějícími aminokyselinami na C-konci proteinu. Počet chybějících aminokyselin se pohybuje v rozmezí 70 až 98 aminokyselinových zbytků. Tato část řetězce *CFTR* proteinu se nepodílí na samotném transportu chloridových iontů, ale vlivem jeho zkrácení se stává protein nestabilní a nemůže správně vykonávat svou funkci [50].

Do této třídy řadíme např. mutace rF508del (z anglického rescued Phe508del) nebo Q1412X. [46,50]

3.2.3.7 Třída VII

Mutace sedmé třídy jsou označovány jako “unrescuable“ mutace. Tento název poukazuje na fakt, že není možné tyto mutace *CFTR* genu pozitivně ovlivnit prostřednictvím léků nebo jiných farmakologických prostředků. Do této třídy patří mutace, které způsobují velké delece. Řadíme sem např. dele2,3(21kb). Podle Marsona by měla být sedmá třída mutací sloučena s první třídou a výsledná třída by měla být rozdělena na podkategorie *a* a *b*, protože v obou případech nedochází k syntéze *CFTR* proteinu. U mutací sedmé třídy však nedochází k transkripci *CFTR* genu do mRNA, zatímco u mutací třídy I dochází k transkripci *CFTR* genu do mRNA, nicméně tato mRNA je porušena a není z ní možné translaci tvořit *CFTR* protein [46,51].

3.3 Symptomatická léčba cystické fibrózy

V současnosti je CF léčena různými způsoby. Základním typem léčby je léčba symptomatická. Účelem symptomatické léčby je ochrana pacientů před projevy onemocnění způsobenými mutacemi *CFTR* genu popsanými v minulé kapitole, které vedou k problémům v jednotlivých orgánových soustavách (viz kapitola 1.3). Symptomatická léčba ovšem neřeší samotnou příčinu léčených příznaků CF a z toho důvodu nemůže vést k vyléčení onemocnění. Na samotnou příčinu nemoci se zaměřuje genová terapie a léčba tzv. *CFTR* modulátory, kterým bude věnována celá následující kapitola. Symptomatická léčba, ale i léčba *CFTR* modulátory cílí na snížení dopadů onemocnění CF a znamená pro pacienty celoživotní léčení. Na samotnou podstatu onemocnění se zaměřuje genová terapie, která má potenciál nemoc trvale vyléčit [52].

3.3.1 Symptomatická léčba problémů spojených s respiračními potížemi

Hlavním cílem symptomatické léčby dýchací soustavy pacientů nemocných CF je zabránit nadměrné tvorbě viskózního hlenu v dýchacích cestách, čímž se předchází obstrukcím, potížím s dýcháním či samotnému poškození plic. Dále se léčba zaměřuje na ochranu pacientů před infekcemi způsobenými bakteriemi, které jsou pro ně velmi nebezpečné [53].

Mezi nejdůležitější druhy symptomatické léčby patří inhalace hypertonického roztoku NaCl (3-7%), který ředí hlen v dýchacích cestách a má baktericidní účinky [5].

Jednou ze základních metod léčby CF (konkrétně ucpávání dýchacích cest) je fyzioterapie, která s velkou pravděpodobností přispívá ke zlepšujícím se prognózám u pacientů s CF. Využívá se mnoho různých metod fyzického cvičení a rovněž cvičení dechového. Tato cvičení mají za cíl vyčištění dýchacích cest od naředěného hlenu, který se v dýchací soustavě vyskytuje po inhalaci roztoku NaCl [5,54].

Podstatnou roli v léčbě respiračních projevů CF hrají mukolytika. Za zmínku stojí dornáza alfa, lidská rekombinantní deoxyribonukleáza. Bylo zdokumentováno, že dornáza alfa štěpí extracelulární DNA, která se hromadí v dýchacích cestách následkem rozkladu neutrofilů. Díky tomu snižuje viskozitu hlenu v dýchacích cestách. Bylo rovněž prokázáno, že včasné nasazení dornázy alfa zlepší funkci plic a zároveň zpomalí pokles jejich funkčnosti [54]. Lék, který obsahuje tuto látku, se nazývá Pulmozym. Tento lék je užíván inhalačně [56].

Dále je důležité včasné podání antibiotik, která zbavují pacienty nemocné CF nebezpečných bakterií popsanych v kapitole 1.3.1. Problém v léčení antibiotiky spočívá ve výskytu více bakteriálních kmenů najednou, což je pro pacienty trpící CF charakteristické. Léčba je z toho důvodu komplikovaná a musí se zpravidla podávat silná (agresivní) širokospektrá antibiotika již od zahájení terapie. Antibiotika se podávají orálně, intravenózně nebo inhalací. Nutná je však i prevence před vystavením nebezpečným bakteriím, spočívající v dodržování důkladných hygienických pravidel. Součástí prevence je i zamezení styku s ostatními nemocnými CF, protože, jak již bylo uvedeno, jsou druhy bakterií napadající dýchací cesty pacientů velice variabilní u každého jedince [5,55].

3.3.2 Symptomatická léčba problémů spojených s gastrointestinálním traktem

Hlavní pilíře symptomatické léčby problémů spojených s gastrointestinálním traktem jsou adekvátní substituce pankreatickými enzymy a vysokokalorická strava s vysokým obsahem proteinů. Léčbou těchto symptomů se rovněž zlepšuje činnost dýchací soustavy u pacientů nemocných CF. Podpora výživy a substituce pankreatickými enzymy by měly vést k normálnímu trávení, ale zároveň i k ochraně funkce plic [57].

Enzymy jsou potřebné dodávat kvůli jejich nedostatečné produkci následkem dějů popsaných v kapitole 1.3.2. Díky těmto enzymům je možný proces trávení potravy v GIT a s ním spojené vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Důležitými enzymy v tomto procesu jsou lipázy. Léčba spočívá v dodávání dávek těchto enzymů v řádu 10 000 jednotek lipázy na kilogram tělesné váhy pacienta za den [58].

Jedním z nejčastěji užívaných léků je tzv. Kreon. Tento lék obsahuje kombinaci tří enzymů – konkrétně lipázu, proteázu a amylázu. Jsou to enzymy zodpovědné za vstřebávání tuků, proteinů a cukrů. Tento lék se užívá zpravidla orálně během jídla [59].

3.4 Genová terapie v léčbě cystické fibrózy

Délka života pacientů trpících CF se neustále prodlužuje, ale základní léčebné metody popsané v předchozích podkapitolách nevedou ani potencionálně k vyléčení nebo prevenci onemocnění. Od objevení *CFTR* genu a konkretizování příslušných mutací se však nabídla nová možnost léčby CF. Transport správně fungujícího *CFTR* genu do příslušných buněk, jejichž genetická informace je defektní, se zatím jeví jako jediná možná cesta, která by v budoucnu mohla zajistit jednotnou léčbu pro pacienty s různými mutacemi. Genová terapie tedy znamená velkou naději pro pacienty s neobvyklými mutacemi, pro které nejsou navrženy *CFTR* modulátory (viz dále), a kteří musí spoléhat na symptomatickou léčbu [60].

Prozatím není schválena žádná forma genové terapie k léčbě CF. Mnoho variant je však aktuálně ve vývoji a probíhá velký počet klinických studií. Implementace funkčního *CFTR* genu pro pacienty s CF se ukázala být náročnější, než se původně uvažovalo. Nicméně i v této oblasti se neustále dělají pokroky a mnohé výzkumy ukazují spíše na to, že se nejedná o slepou kolej v léčbě CF. V současné době se stupňuje úsilí o zavedení genové terapie pro buňky plicního epitelu, který stojí za potížemi s dýchací soustavou. Následně by byl stále

problém například s GIT, ale při úspěšné genové terapii cílící na dýchací soustavu by vývoj genové terapie pro GIT už neměl trvat dlouho [61,62].

Téma genové terapie je velmi rozsáhlé a přesahuje rámec této bakalářské práce.

3.5 CFTR modulátory

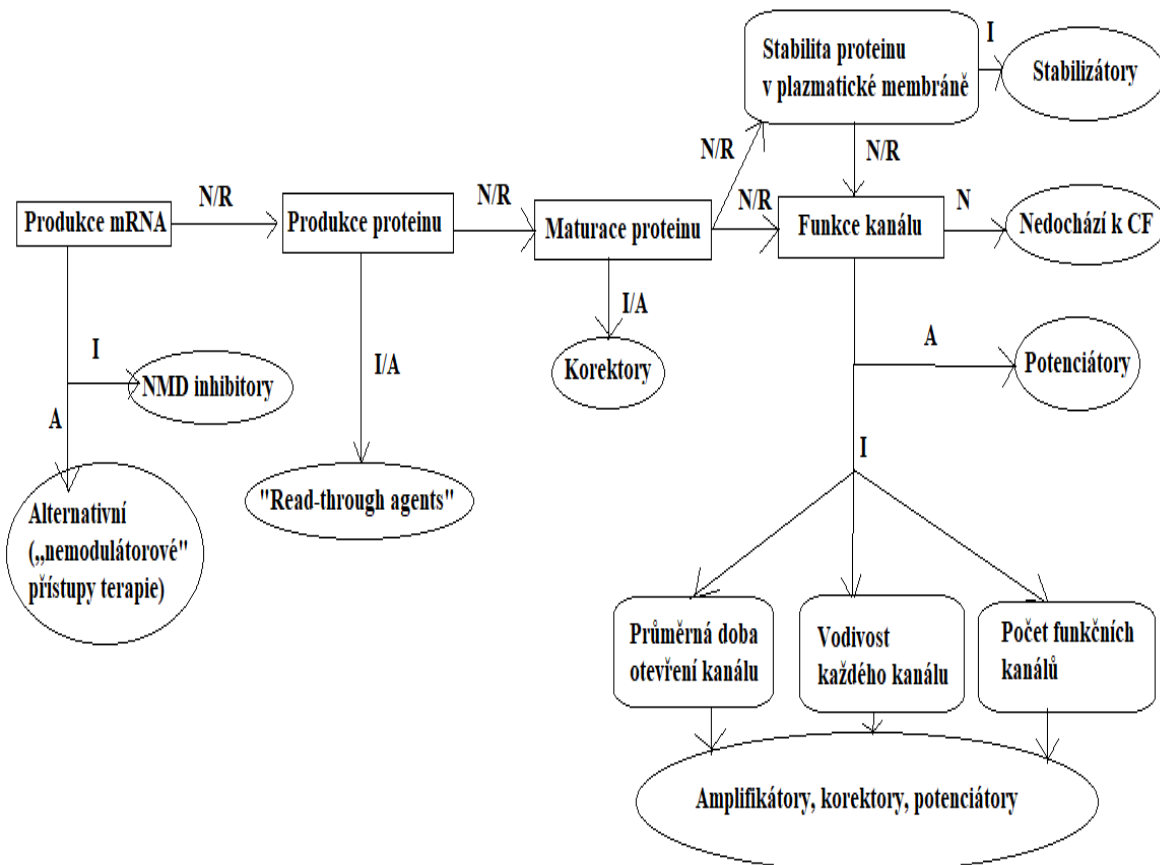
Na počátku roku 2011 byla objevena a následně schválena nová forma terapie CF, která nezahrnovala pouze léčbu symptomatickou. Jednalo se o objev ivacaftoru (označeným také VX-770) vydaným pod obchodním názvem Kalydeco firmou Vertex Pharmaceuticals. Tato molekula patří k CFTR modulátorům [63].

Léčbu CFTR modulátory bylo možné objevit díky detailnímu porozumění funkci CFTR kanálu.

Biologicky aktivní molekuly vhodné pro zmíněnou léčbu jsou identifikovány pomocí testování s vysokou propustností (dále HTS z anglického “High Throughput Screening“). Jedná se o automatický screening potenciálních účinných látek ve fluorescenčních buněčných testech, kdy je testována funkce CFTR kanálu prostřednictvím membránového potenciálu a měřením koncentrace halogenidových iontů. Screeningem prochází přes milion molekul. Cílem testování je objevení sloučenin, které jsou schopny obnovit funkci CFTR kanálu v testech *in vitro*. Takových potenciálních molekul je jen několik stovek a ty jsou poté označeny jako hity. Následnými testy se z hitů stávají validované hity a poté tzv. leady. Z milionu testovaných látek se do klinických studií dostane zpravidla jedna až dvě molekuly [64,65].

CFTR modulátory se dělí do pěti hlavních skupin podle mechanismu jejich účinku a to na CFTR potenciátory, korektory, stabilizátory, amplifikátory a tzv. CFTR read-through agents [65]. Potenciátory jsou první schválené a dodnes využívané molekuly v terapii CF. Jsou to látky se schopností prodlužovat dobu otevření CFTR kanálu a díky tomu zefektivnit tok iontů přes CFTR kanál. Korektory jsou schopny stabilizovat strukturu CFTR proteinu a dopravit ho na příslušné místo v buněčných membránách. Další skupinou jsou stabilizátory, které upevňují stabilitu CFTR proteinu v plazmatické membráně. Amplifikátory zvyšují expresi syntetizovaného CFTR proteinu. Read-through agents jsou látky schopné napravit chyby v syntéze CFTR proteinu u nemocných CF [66].

Na obrázku 8 na straně 30 jsou znázorněna možná místa zásahu CFTR modulátorů v syntéze samotného CFTR proteinu. Rovněž jsou zde uvedena další možná místa jiných terapeutických metod využitelných k napravení syntézy CFTR proteinu. Jednotlivým skupinám modulátorů jsou věnovány následující kapitoly.



Obrázek 8: Schematické znázornění možných míst zásahu CFTR modulátorů a „nemodulátorových“ terapií při syntéze CFTR proteinu. Vysvětlivky: A – nefunkční (z anglického abrogated); I – porušené (z anglického impaired); N – normální; R – opravené (z anglického rescued); NMD inhibitory (z anglického nonsense-mediated mRNA decay).

Převzato a upraveno z [67].

3.5.1 CFTR potenciátory

CFTR potenciátory jsou malé biologicky aktivní molekuly, které jsou schopné v případě nemocných CF zlepšovat tok chloridových iontů přes CFTR protein na buněčných membránách. Potenciátory působí přímo na samotný iontový kanál a jsou schopny stimulovat jeho otevření nebo prodlužovat dobu, kdy je kanál v otevřeném stavu [66].

Díky popsaným schopnostem jsou CFTR potenciátory schopny pozitivně ovlivňovat následky mutací *CFTR* genu III. a IV. třídy, které zabraňují propustnosti chloridových iontů přes CFTR kanál z důvodu jeho neschopnosti štěpit ATP (III. třída) nebo je CFTR kanál v otevřeném stavu menší dobu, než je tomu u zdravých jedinců (IV. Třída). Mutace, jež se vyskytují v alelách *CFTR* genu u nemocných CF nejčastěji, na které se potenciálně dá působit léčivem typu CFTR potenciátoru, jsou R117H, G551D, R334W, S549R, R347P [46,47].

Bylo zjištěno, že látky, které by mohly mít charakter CFTR potenciátorů, by měly být buď upravené molekuly ATP nebo molekuly na podobné bázi nebo molekuly, které by zvyšovaly podíl cAMP v intracelulárním prostoru. Problémem, se kterým se však látky zlepšující funkci CFTR kanálu mohou potýkat, je jejich mnohdy nízká specifita. Působí sice pozitivně na proces přenosu iontů přes zmiňovaný protein v membráně, mohou však negativně ovlivňovat jiné fyziologické procesy [67].

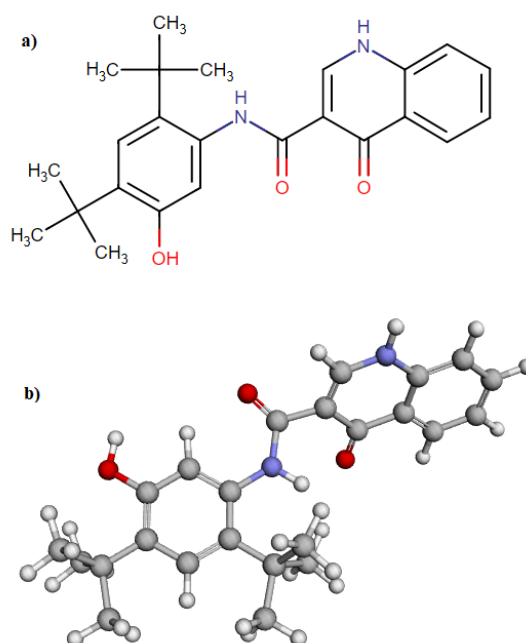
Mezi látky, které měly velký potenciál v terapii CF, se řadí např. fenyglycinová molekula pod označením PG-01, VRT-532 nebo Genistein, což je izoflavon. Genistein inhibuje tyrosinkinázu, čímž zvyšuje podíl cAMP v intracelulárním prostoru. To vede ke stimulu funkce CFTR kanálu. Klinických testů se však tyto molekuly nedočkaly, protože jejich předklinické testování nepřineslo dostatečné důkazy o jejich přínosu v léčbě CF [67].

První zavedenou terapií pro léčbu CF byl zmiňovaný potenciátor ivacaftor. Tento lék byl schválen organizací FDA pro klinické využití v lednu roku 2012 pro pacienty starší 6 let s výskytem mutace *CFTR* genu G551D [68].

Ivacaftor byl primárně testován na mutaci *CFTR* genu G551D, která se vyskytuje z tříd III a IV nejčastěji a již v prvotních studiích bylo patrné zvýšení efektivity chloridového transportu v epitelu buněk dýchací soustavy. Ve studiích testujících buňky s nejčtenější mutací *CFTR* genu F508del se prokázalo, že nezlepšuje funkci CFTR proteinu. V případě G551D mutací však přinesl tento lék pozitivní výsledky jako snížení koncentrace chloridů v potu pacientů nebo zlepšení FEV₁ (objem vydechnutý s největším úsilím za první sekundu po maximálním nádechu) až o 10% nebo snížení rizika plicní exacerbace o 55% [69]. Longitudiální studie rovněž prokázaly vliv ivacaftoru na delší dobu dožití pacientů. Byl zjištěn nižší výskyt bakterie *Pseudomonas aeruginosa* nebo zlepšení funkce pankreatu [70].

Lék byl postupně schválen pro pacienty starší dvou let a rovněž byl rozšířen seznam mutací *CFTR* genu, jejichž dopady lze léčit ivacaftorem. Byly to např. mutace G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D [69].

Ivacaftor je malá molekula se souhrnným chemickým vzorcem $C_{24}H_{28}N_2O_3$. Strukturální vzorec v provedení 2D i 3D je znázorněn na obrázku 9 na straně 32. Molekula ivacaftor obsahuje ve své struktuře dvě iminové skupiny, dvě ketonické skupiny a jednu hydroxyskupinu. Rovněž obsahuje tři aromatické kruhy. Systematický název ivacaftoru je N-(2,4-di-terc-butyl-5-hydroxyfenyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid [71].



Obrázek 9: Znázornění strukturálního vzorce účinné látky ivacaftor (obchodní název Kalydeco) o souhrnném chemickém vzorci $C_{24}H_{28}N_2O_3$. Části obrázku: část a) – 2D strukturální vzorec ivacaftoru s barevným odlišením funkčních skupin molekuly; část b) – 3D znázornění struktury ivacaftoru s totožným barevným odlišením funkčních skupin molekuly odpovídajícím části a) obrázku 8. Převzato a upraveno z [71].

Samotný mechanismus účinku ivacaftoru na CFTR protein zatím nebyl kompletně popsán. Při detailním zkoumání této látky a jejího vlivu na otevírání CFTR kanálu však bylo zjištěno, že se tato látka váže přímo k příslušnému proteinu. To znamená, že pozitivně ovlivňuje mechanismus otevření kanálu vazbou na samotný protein, nikoliv vazbou na enzym kinázy či fosfatázy. Rovněž bylo zjištěno, že je schopen otevírat CFTR kanál i bez

přítomnosti jinak potřebného množství ATP (konkrétně v komplexu MgATP), což ukazuje na zvláštní mechanismus bez nutné vazby ATP a jeho následné hydrolyzy. Výsledky studie s ivacaftorem ukázaly to, že tato látka upravuje spíše strukturu CFTR kanálu a váže se na alosterické než na katalytické místo na NBD. Vazba na alosterické místo CFTR proteinu skýtá výhodu ve větší selektivitě těchto látek [72].

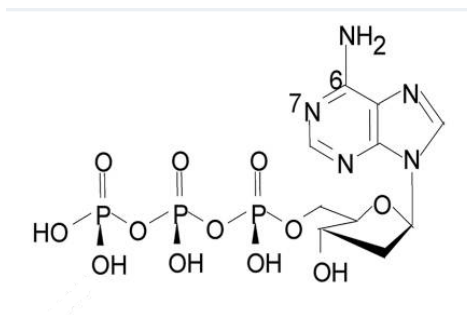
V dalších pokusech o objasnění mechanismu ivacaftoru se ukázalo, že by se ivacaftor mohl vázat na aminokyseliny CFTR proteinu na rozhraní domén NBD1 a NBD. Tento předpoklad se opíral o nízkou vazebnou energii mezi těmito aminokyselinami a ivacaftorem [73]. Roku 2019 bylo za užití elektronové kryomikroskopie prokázáno, že ivacaftor interaguje na úrovni rozhraní jednotek TMD v CFTR proteinu. Vzhledem ke složitosti samotného procesu otevírání kanálu se však předpokládá, že vazebná místa ivacaftoru se mohou lišit v závislosti na tom, v jaké konformaci se CFTR protein v dané chvíli nachází [67].

Nejčastěji se ivacaftor užívá ve formě dvou 150 mg tablet podávaných dvakrát denně jednou za dvanáct hodin. Problém se objevuje u pacientů, kteří trpí vážnějším poškozením jater, protože je v nich ivacaftor metabolizován. Tito rizikovní pacienti musí mít upravené dávkování tohoto léku [1,74].

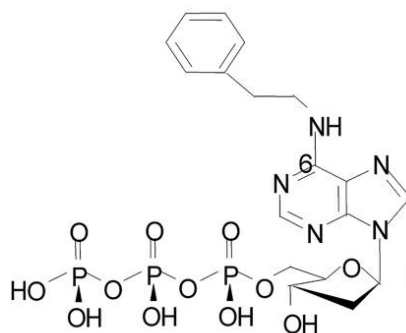
Nevýhodou terapie CFTR modulátory je vysoká cena této léčby, která je způsobena náklady na vývoj samotného léku. Cena terapie se pohybuje kolem 297 tisíc dolarů ročně, přičemž je nutné, aby pacient užíval léky po celou dobu života. Aktuálně je léčba v určitých zemích plně hrazena pojišťovnou nebo existuje možnost spoluúčasti nebo u novějších terapií CFTR modulátory existují programy plné úhrady pro pacienty od samotného výrobce Vertex Pharmaceuticals [1]. V České republice je lék Kalydeco plně hrazen pojišťovnami pro pacienty od 6 let věku a s tělesnou hmotností nad 25 kg, kteří mají v *CFTR* genu mutaci G551D a splňují určité podmínky spojené s funkcí plic a prevencí jejich poškození [75].

Mezi potenciátory, které byly také testovány, se řadí i analogy ATP ovlivňující otevírání CFTR kanálu svou vazbou na vazebná místa ATP CFTR. Mezi nejprozkoumanější analogy ATP patří N^6 -(2-fenylethyl)-ATP nebo 2'-deoxy-ATP, jejichž vzorce jsou znázorněny na obrázcích 9 a 10 na straně 34. Další skupinu tvoří sloučeniny, které působí na rozhraní TMD, aby stabilizovaly otevřenou konformaci CFTR kanálu. Sem se řadí zmíněný ivacaftor. NPPB (5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)benzoát) je sloučenina, která

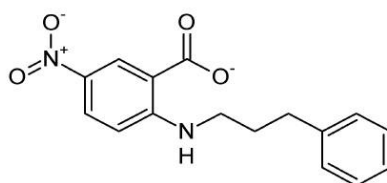
potencuje otevírání CFTR kanálu zatím nezjištěným mechanismem. Její chemická struktura je na obrázku 11 na straně 34 [76].



Obrázek 9: Chemická struktura 2'-deoxy-ATP. Převzato a upraveno z [77].



Obrázek 10: Chemická struktura N^6 -(2-fenylethyl)-ATP. Převzato a upraveno z [77].



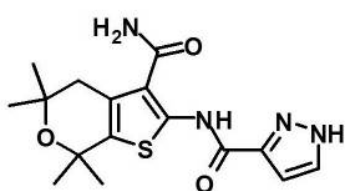
Obrázek 11: Chemická struktura NPPB. Převzato a upraveno z [76].

Kromě firmy Vertex Pharmaceuticals, jejíž produkty jsou již na trhu, vyvíjí CFTR modulátory i další farmaceutické firmy. V klinických studiích byly testovány dvě slibné molekuly GLPG1837 a GLPG2451 od firmy Galapagos. Obě tyto molekuly měly v dosavadních testech stejné nebo i lepší výsledky než ivacaftor [78,79].

Zmíněné analogy ATP v kombinaci s GLPG1837 fungují v synergii a vykazují lepší výsledky, než když jsou testovány samostatně. Avšak kombinovaná terapie GLPG1837 s ivacaftorem má zhruba stejný účinek na CFTR protein jako samotný ivacaftor. Z toho lze

vyvodit, že tyto molekuly pravděpodobně působí na stejné místo CFTR proteinu a mají podobný mechanismus účinku [76]. Strukturální vzorce GLPG1837 a GLPG2451 jsou znázorněny na obrázku 12 na straně 35.

Dalším subjektem zabývajícím se vývojem potenciátorů je firma Novartis, která má v klinických testech svůj potenciátor QBW251. Tato sloučenina pozitivně ovlivňuje funkci CFTR kanálu v kombinaci s korektorem lumacaftorem (viz níže) u pacientů s alespoň jednou mutací třídy III nebo IV v alespoň jedné z alel a u některých homozygotů s mutací F508del. Firma Concert spustila klinické testování sloučeniny CTP-656. Byla vyvinuta modifikací ivacaftoru deuteriem. Deuterium nahrazuje vodík ve vazbách s uhlíkem, což je výhodné z hlediska pomalejšího metabolismu této látky. Pokud by se touto látkou ivacaftor podařilo nahradit, nebylo by nutné užívat lék tak často [79].



GLPG1837



GLPG2451

Obrázek 12: Chemické strukturální vzorce potenciátorů GLPG1837 a GLPG2451 od firmy Galapagos. Převzato a upraveno z [78].

3.5.2 CFTR korektory

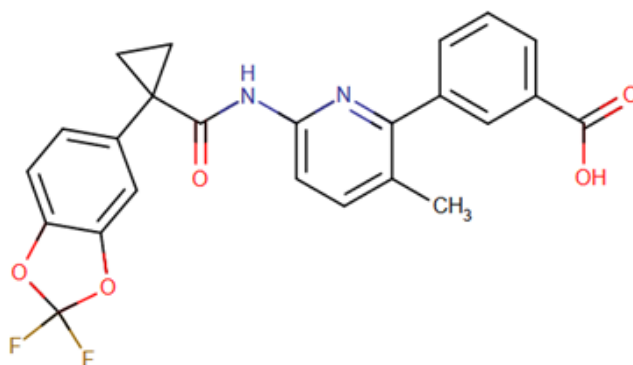
CFTR korektory jsou malé molekuly, které umožňují CFTR proteinu u pacientů s mutací F508del opustit ER bez toho, aby byla většina špatně složených proteinů zachycena kontrolními mechanismy buňky. Následkem toho se zvyšuje množství dopraveného CFTR proteinu na plazmatickou membránu, což vede ke zlepšení buněčné výměny chloridových iontů. CFTR korektory mohou působit jako farmakologické chaperony, kdy mohou interagovat přímo s F508del-CFTR a usnadňovat jeho skládání a buněčné úpravy. Rovněž mohou fungovat jako tzv. regulátory proteostáze, kdy by měly být schopny upravit buněčný proces kontroly kvality a rozpoznávání F508del-CFTR proteinu. Farmakologické chaperony mají sice velký potenciál díky své vysoké specifitě. Prozatím však regulátory proteostáze

vykazují větší potenciál k léčbě CF, protože vykazují pozitivní výsledky v kombinaci s jinými modulátory [80].

CFTR korektory jsou díky popsaným vlastnostem vhodné k léčbě pacientů s mutacemi *CFTR* genu třídy II. Následky těchto mutací spočívají v problémech ve skládání CFTR proteinu do finální struktury a v nízké stabilitě proteinu. Z tohoto důvodu je na ER protein zadržen kontrolním systémem. Díky tomu mají pacienti s těmito mutacemi významně redukován množství CFTR proteinu dopraveného na plazmatickou membránu oproti zdravým jedincům. Do této třídy spadá např. mutace *CFTR* genu s nejčastějším výskytem v alelách nemocných CF F508del, mutace N1303K nebo A561E [46].

Tyto látky mohou být dále rozděleny do tří základních tříd podle jejich mechanismu působení. První třída zahrnuje CFTR korektory, které působí přednostně na korekci primárního konformačního defektu na rozhraní NBD1-TMD1/TMD2. Korektory, které napravují následné chyby ve stabilitě a složení NBD2 domény na rozhraních s ostatními doménami CFTR proteinu spadají do druhé třídy. Třetí třídu tvoří korektory, které přímo působí na NBD1 tak, že tuto doménu stabilizují [81].

První schválenou látkou ke klinickému využití ze třídy korektorů byla látka lumacaftor vyvinutá firmou Vertex Pharmaceuticals. Jedná se o korektor první generace. Jiné označení tohoto korektoru je VX-809 se souhrnným vzorcem $C_{24}H_{18}F_2N_2O_5$ [82]. Jeho strukturální vzorec je uveden na obrázku 13 na straně 36.



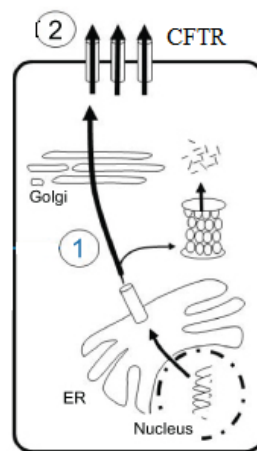
Obrázek 13: Strukturální vzorec lumacaftoru o souhrnném chemickém vzorci $C_{24}H_{18}F_2N_2O_5$ s barevným odlišením funkčních skupin molekuly. Převzato a upraveno z [82].

Testování samotného lumacaftoru na F508del-CFTR protein bylo z hlediska zlepšení funkce kanálu neúspěšné. Jeho efektivita byla prokázána až při jeho užití v kombinaci

s potenciátorem ivacaftorem. Tento objev byl zásadním krokem ke kombinovaným terapiím [80]. Stejně jako u ivacaftoru a obecně u potenciátorů není přesný mechanismus působení korektorů, potažmo lumacaftoru zcela objasněn. Lumacaftor se však řadí do první výše zmíněné třídy korektorů. Měl by interagovat s aminokyselinami proteinu na rozhraní NBD1-TMD1/TMD2, přičemž stabilizuje složenou strukturu proteinu [81]. Právě na doméně NBD1 byla totiž zjištěna chybějící aminokyselina následkem mutace *CFTR* genu F508del [83].

Kombinace lumacaftoru a ivacaftoru byla schválena roku 2015 americkou organizací FDA pro léčbu pacientů starších dvanácti let s výskytem mutace *CFTR* v genu F508del. Terapie byla uvedena na trh firmou Vertex Pharmaceuticals pod názvem Orkambi. Roku 2016 byla tato terapie schválena pro léčbu dětí ve věku šesti až jedenácti let se dvěma kopiemi mutace *CFTR* genu F508del [84]. Klinickými testy bylo prokázáno, že Orkambi přináší pozitivní výsledky u homozygotních jedinců s mutací F508del. U heterozygotních nebyl přínos prokázán [85].

Obecné schematické naznačení synergické spolupráce *CFTR* modulátorů ze dvou různých tříd je znázorněn na obrázku 14 na straně 37.



Obrázek 14: Schematické naznačení mechanismu fungování dvojkombinace *CFTR* modulátorů ze třídy korektorů a potenciátorů. Bod 1) Působení korektoru usnadňuje skládání a přepravu *CFTR* proteinu k plazmatické membráně. Bod 2) Působení potenciátoru napomáhá otevření *CFTR* kanálu a prodlužuje délku tohoto stavu.
Vysvětlivky: ER – endoplazmatické retikulum; nukleus – buněčné jádro; Golgi – Golgiho aparát, *CFTR* – *CFTR* kanál. Převzato a upraveno z [86].

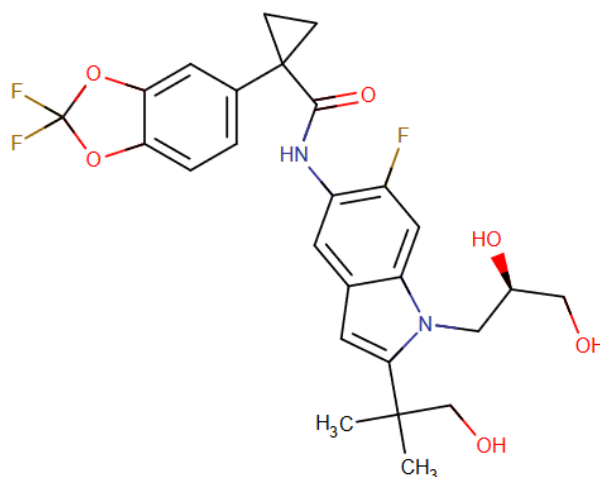
Tato kombinovaná terapie však přinesla jen zlomek očekávaného zlepšení ve funkci F508del-CFTR proteinu. Bylo zjištěno, že přítomnost ivacaftoru negativně ovlivňuje mechanismus působení lumacaftoru při skládání a stabilizaci proteinu. Z tohoto důvodu byla stále velká část proteinů zachycena kontrolním systémem ER. I když došlo ke zvýšení množství CFTR proteinu v plazmatické membráně, nevedla tato terapie k dostatečnému obnovení výměny chloridových iontů. Pacientům tato terapie pomohla jen z části. K podobným výsledkům se vědci dobrali i u jiných mutací II. třídy, např. R170G [73].

Popsaná problematika byla alespoň částečně redukována snížením množství ivacaftoru podávaným pacientům [87]. Problémem kombinované terapie je i to, že lumacaftor pravděpodobně indukuje cytochrom P450 3A4, který katalyzuje přeměnu ivacaftoru a tím snižuje jeho koncentraci [88].

Posun přinesla látka tezacaftor, což je CFTR korektor druhé generace od firmy Vertex Pharmaceuticals. Struktura této látky je velmi podobná lumacaftoru, přičemž se zároveň předpokládá i velmi podobný mechanismus účinku. Na rozdíl od ivacaftoru však není induktorem cytochromu P450 3A4. Při samostatném testování tezacaftoru studie potvrdily zlepšení ve funkci CFTR kanálu, čímž se rovněž liší od lumacaftoru, který v samostatné léčbě výsledky nepřinesl. V kombinované terapii s ivacaftorem byly pak výsledky ještě příznivější [89].

Jiné označení tezacaftoru je VX-661 a v kombinované terapii s ivacaftorem byl uveden na trh pod jménem Symdeko. Tato terapie byla schválena americkou organizací FDA roku 2018 k léčbě pacientů starších dvanácti let trpících CF, kteří nesou alespoň v jedné alele *CFTR* genu mutaci F508del [90,91]. Na rozdíl od Orkambi měla totiž tato terapie pozitivní vliv i na heterozygotní pacienty s touto mutací [92].

Tezacaftor je malá molekula o souhrnném chemickém vzorci $C_{26}H_{27}F_3N_2O_6$. Její strukturální vzorec je znázorněn na obrázku 15 na straně 39 [90].



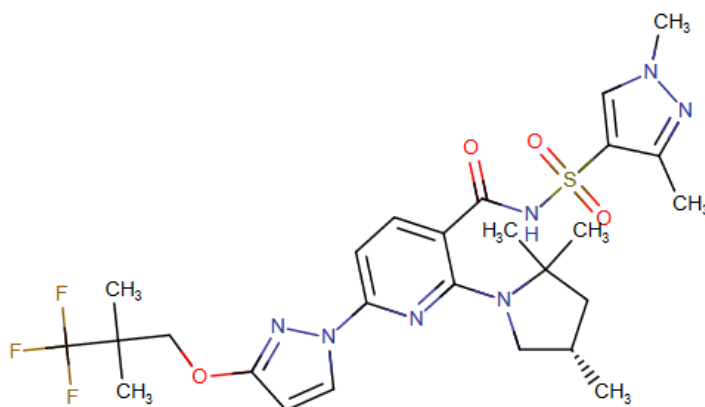
Znázornění strukturního vzorce účinné látky tezacaftor (VX-661) o souhrnném chemickém vzorci $C_{26}H_{27}F_3N_2O_6$ s barevným odlišením funkčních skupin molekuly. Převzato a upraveno z [90].

Firma Vertex Pharmaceuticals začala testovat tzv. korektory další generace (z angl. next-generation correctors) v kombinaci s ivacaftorem a korektorem druhé generace tezacaftorem, který byl upřednostněn před lumacaftorem vzhledem k menšímu negativnímu ovlivňování působení ivacaftoru [85].

Do pozdějších fází testování se dostaly korektory další generace např. elaxacaftor (VX-445), VX-152 a VX-659 vždy v kombinaci s tezacaftorem a ivacaftorem. Mají jinou strukturu a působí jiným mechanismem než předchozí dvě generace korektorů. [84]. Váží se na různá místa CFTR proteinu a tím stabilizují jinou část tohoto proteinu. Do nejpokročilejších fází studií se dostaly VX-659 a VX-445. VX-659 má podobnou strukturu a mechanismus jako elaxacaftor na rozdíl od korektorů předchozích generací. Z tohoto důvodu byly tyto látky testovány se staršími korektory [93].

Ze zmiňovaných testovaných korektorů měl nejlepší výsledky v klinických studiích právě elaxacaftor. Jeho souhrnný chemický vzorec je $C_{26}H_{34}F_3N_7O_4S$ a její struktura je znázorněna na obrázku 16 na straně 40 [94]. Podávání trojkombinace VX-445 s tezacaftorem a ivacaftorem k léčbě CF byla schválena FDA 21. října 2019 pro pacienty starší 12 let díky skvělým výsledkům této kombinované modulátorové terapie. Na trh byla uvedena pod obchodním názvem Trikafta. Dalším pozitivem je i okruh pacientů, na které je možné tuto terapii aplikovat. Podle výsledků studií totiž pozitivně ovlivňuje činnost CFTR proteinu u pacientů, kteří mají alespoň v jedné alele mutaci F508del, což odpovídá zhruba 90 %

nemocných CF [95,96]. U těchto pacientů bylo sledováno zlepšení FEV₁ až o 13,8 % a snížení chloridových iontů v potu nemocných dosahovalo až o 51,4 mmol/l [85,97].



Obrázek 16: Znázornění strukturního vzorce účinné látky elaxacaftor (VX-445) o souhrnném chemickém vzorci C₂₆H₃₄F₃N₇O₄S s barevným odlišením funkčních skupin molekuly. Převzato a upraveno z [94].

Kromě zmiňovaných látek od Vertex Pharmaceuticals jsou aktuálně ve vývoji i látky jiných firem či vědeckých laboratoří. Žádná z nich však nebyla zatím schválena ke klinickému použití při léčení CF [70].

Za zmínku stojí korektory od firmy Galapagos, která vyvinula korektory GLPG2222 a GLPG2851, přičemž molekula GLPG2222 má strukturu podobnou tezacaftoru a lumacaftoru, nicméně z dosavadních testů vyplývá, že by mohla být účinnější než tyto sloučeniny, zvláště potom u homozygotních pacientů s mutací *CFTR* genu F508del [98].

Flatley Discovery Lab zkoumala molekulu FDL169, jejíž účinnost by mohla být stejná jako u tezacaftoru. Předpokládá se, že mechanismus účinku této látky by měl být shodný s tezacaftorem, protože v kombinované terapii s touto sloučeninou vykazovala stejné výsledky jako při samostatném podání. V kombinaci s ivacaftorem měla FDL169 lepší výsledky, než Orkambi [67].

Testují se i korektory třetí generace např. firma Proteostasis Therapeutics testuje molekulu PTI-801 v trojkombinaci s Orkambi a amplifikátorem PTI-428. Potenciátor této firmy PTI-808 v kombinaci s korektorem PTI-801 a amplifikátorem PTI-428 má zatím ve studiích dobré výsledky a vykazuje obnovení funkce CFTR kanálu téměř k normálu. Další generaci korektorů testuje i firma Galapagos. Přidání sloučeniny GLPG2737 k VX-809 a

VX-770 zvyšuje jejich účinnost. Rovněž se ukazuje, že jejich potenciátor GLPG1837 v kombinaci s korektory první generace GLPG2222 nebo GLPG2851 a korektory další generace GLPG2737 nebo GLPG3221 vykazuje lepší výsledky než Orkambi [98].

Byly objeveny nové molekuly 4172, 6258 a 3151 stabilizující specifické defekty v F508del-CFTR proteinu na rozhraních domén NBD1, NBD2 a TMD. Jsou to látky, které synergicky míří na specifická místa poškozeného proteinu [98].

3.5.3 CFTR amplifikátory

CFTR amplifikátory jsou modulatory s potenciálem léčby CF. Jsou schopny selektivně zvyšovat expresi a funkci CFTR proteinu. Cílí na neefektivní biosyntézu CFTR proteinu. Amplifikátory se svým mechanismem liší od korektorů a potenciátorů [99]. Při studiu těchto molekul bylo zjištěno, že jde o malé molekuly, které kotranslačně zvyšují stabilitu CFTR mRNA, čímž by měly zvyšovat biosyntézu CFTR proteinu k normálním hodnotám [100].

Jsou to látky, které by měly být využitelné v terapiích pacientů CF, jejichž onemocnění je způsobeno mutací *CFTR* genu z V. třídy. Do této třídy spadají např. 3849+10kbC>T, 2789+5G>A a A455E. Amplifikátory zlepšují expresi CFTR proteinu, čímž zároveň zvyšují množství CFTR proteinu v ER a následně na plazmatické membráně. Mohou být použity v kombinovaných terapiích s korektory a potenciátory [67,98].

Prvním amplifikátorem zkoumaným v klinických studiích je nesolicaftor, jiným názvem PTI-428 (Proteostasis Therapeutics) [67]. Výsledky studií s touto látkou ukázaly, že při využití v terapii s lumacaftorem a ivacaftorem se může účinek těchto dvou modulátorů až zdvojnásobovat. Rovněž bylo zjištěno, že je tento amplifikátor schopný navyšovat množství CFTR mRNA (mechanismus zatím ještě není známý). Díky tomu navyšuje množství CFTR proteinu, který je dále možné zaměřit jinými modulatory užitými v ko-terapii [100].

PTI-428 v kombinaci s tezacaftorem a lumacaftorem přináší příznivé výsledky i u pacientů s CF s méně častými mutacemi *CFTR* genu (např. Δ I1234_R1239-CFTR) [98].

3.5.4 CFTR stabilizátory

CFTR stabilizátory jsou chemická individua, která cílí na CFTR proteiny v buňkách nemocných CF, které jsou funkční a zanořené do plazmatické membrány, ale mají oproti

CFTR proteinům u zdravých jedinců redukovaný poločas životnosti. Bylo zjištěno, že CFTR proteiny, které jsou původně defektní a vyhnou se díky působení korektorů kontrolnímu mechanismu ER, bývají rozpoznány jako defektní po ukotvení v plazmatické membráně buňky. Tento děj výrazně limituje léčbu CF korektory a potenciátory. Ukázalo se, že mechanismus, který tyto CFTR proteiny odstraňuje, zajišťují dva chaperony, které se označují PPQC (z anglického peripheral protein quality control), protože slouží jako kontrola proteinů na periferní oblasti buňky. Stabilizátory jsou látky, které stabilizují CFTR protein v plazmatické membráně a zamezují rozpoznání defektního proteinu PPQC i jeho následnému odstranění a degradaci, čímž prodlužují životnost proteinu v membráně [67,101].

Tyto molekuly jsou schopny opravit vnitřní nestabilitu proteinu a buď navýšit dobu, po kterou je CFTR protein ukotven v plazmatické membráně, nebo snížit degradaci množství CFTR proteinu z plazmatické membrány. Problémy s redukovanou dobou životnosti proteinu v plazmatické membráně se vyskytují vlivem mutací *CFTR* genu třídy VI a třídy II po záchraně proteinů CFTR korektory a potenciátory. Do této skupiny se řadí i nejčtenější mutace F508del [98].

PPQC odstraňují nesprávně složené proteiny z plazmatické membrány přes mechanismus řízený proteazomem E3 ubiquitin ligáza CHIP (z anglického carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein), přičemž dochází k proteolytické reakci porušující peptidové vazby [102].

Bylo zjištěno, že až 50 % CFTR proteinů je vázáno na aktinová filamenta. Tato vazba umožňuje interakci C konce CFTR proteinu s kofaktorem regulace výměny Na^+/H^+ iontů NHERF-1. Přes protein ezrin kotví NHERF-1 na základě této interakce CFTR protein do plazmatické membrány. Nejvýznamějšími regulátory, které ovlivňují aktinový cytoskelet jsou malé GTPázy z Rho rodiny. Do této skupiny se řadí Rac1 nebo RhoA. Právě tato skupina GTPáz a protein ezrin regulují ukotvení proteinů v plazmatické membráně. Bylo prokázáno, že navýšení množství Rac1 zvyšuje množství CFTR proteinu v plazmatické membráně a prodlužuje jeho životnost. Fyziologickým aktivátorem Rac1 je růstový faktor hepatocytů a je tedy prospěšný v kotvení CFTR proteinu, což je proces, jehož mediátorem je Rac1. Potenciálním vývojem v léčbě CFTR stabilizátory je taková kombinace modulátorů, která zajistí korekci ve skládání proteinu na ER, zlepší aktivitu proteinu a zajistí jeho ukotvení v plazmatické membráně. Růstový faktor hepatocytů vykazuje zajímavé

výsledky a má potenciál stát se součástí těchto modulátorových kombinovaných terapií [103].

Další látkou, u které se prokázala schopnost dopravovat a ukotvovat CFTR protein na plazmatickou membránu, byl vazoaktivní střevní peptid. U této molekuly byla rovněž pozorována schopnost zvýšit interakci CFTR proteinu s proteinem NHERF1 [104].

Protein EPAC1 by mohl být dalším stabilizátorem CFTR proteinu. Jedná se o výměnný faktor guaninového nukleotidu přímo aktivovaný cyklickým AMP (cAMP). Fosforylace protein kinázy A aktivovaná cAMP reguluje otevírání CFTR proteinu. Bylo prokázáno, že v lidských buňkách plicního epitelu signalizace cAMP přes EPAC1 snižuje endocytózu CFTR kanálu a tím stabilizuje tento protein v plazmatické membráně. EPAC1 a CFTR interagují přes zmiňovaný NHERF1. Interakce je způsobena aktivací EPAC1, po níž dochází k translokaci tohoto proteinu do plazmatické membrány a vazbě na NHERF1 [105].

Endogenní signalizační molekula S-nitrosoglutathion a jí podobné sloučeniny schopné S-nitrosylace napomáhají maturaci F508del-CFTR proteinu, zvyšují jeho expresi a zlepšují jeho funkci. Zatímco vysoké koncentrace S-nitrosoglutathionu inhibují transkripci a posilují degradaci CFTR, nižší posilují jeho expresi a maturaci. Bylo zjištěno, že S-nitrosoglutathion působí na Hop, což je homodimer, který spojuje Hsp70 a Hsp90, což jsou hlavní regulátory v přepravě CFTR proteinu na plazmatickou membránu. Konkrétně je S-nitrosoglutathion schopen inhibovat expresi Hop a tím snižovat jeho interakci s CFTR proteinem. Maturace defektního proteinu poté proběhne alternativní cestou bez interakce s Hop a není tedy zachycen kontrolním mechanismem buňky. Vliv adekvátní koncentrace S-nitrosoglutathionu vykazuje lepší účinky v synergii s CFTR korektory a potenciátory [106].

U nemocných CF je koncentrace S-nitrosoglutathionu v buňkách nižší než u zdravých jedinců. Zvýšení množství této sloučeniny bylo cílem výzkumů. Cavosonstat je CFTR stabilizátor, který funguje jako inhibitor enzymu S-nitrosoglutathion reduktázy a tím navyšuje množství S-nitrosoglutathionu v buňce. Díky tomu dochází k maturaci proteinu a jeho stabilizaci na plazmatické membráně. Mechanismus této látky je komplementární k mechanismům CFTR korektorů a potenciátorů [107]. Tato látka je aktuálně v II. fázi testování v kombinované terapii s tez/iva [98].

3.5.5 CFTR read-through agents

Read-through agents jsou látky, které mají potenciál v léčbě nemocných CF s výskytem mutací *CFTR* genu, jejichž následkem je v *CFTR* mRNA předčasný terminační kodon (PTC). Ten způsobuje předčasné ukončení translace a vzniká nekompletní *CFTR* protein. PTC mutaci má v *CFTR* genu zhruba 10 % nemocných s CF. Nejčastěji se vyskytující mutace jsou G542X a W1282X. Read-through agents jsou látky schopné indukovat překlenutí PTC při čtení mRNA na ribosomu. Tento mechanismus umožňuje zařazení jiné aminokyseliny a dokončení translace [67].

Nejlépe prozkoumanými látkami patřícími k *CFTR* read-through agents jsou aminoglykosidy. Dále byly zkoumány další molekuly jako např. PTC124, RTC13, RTC14 nebo escin. Poslední zmiňovaná sloučenina také navyšuje počet *CFTR* transkriptů. Stejný efekt měl inhibitor NMD (nonsense-mediated mRNA decay), což je pretranslační proces zabráňující produkci zkrácených proteinů vinou přítomnosti PTC [108]. Účinnost aminoglykosidů byla potvrzena na transgenních myších, kde tyto látky potlačily STOP kodonové mutace [109]. Bylo však zjištěno, že terapie aminoglykosidy je velmi agresivní a vedlejší účinky této varianty léčby jsou nepřijatelné pro léčení CF. Konkrétně se to týká např. geneticinu nebo gentamicinu [110]. V poslední době se začaly vyvíjet chemicky modifikované aminoglykosidy pro léčbu CF. Hlavním důvodem bylo nalezení sloučeniny podobného charakteru bez dlouhodobých vedlejších účinků. Podobné pozitivní výsledky jako zmiňované aminoglykosidy bez tak závažných vedlejších účinků ukázal chemicky modifikovaný aminoglykosid NB54. Další vyvinutou látkou byla (S)-11. Stejně jako NB54 nemá tak agresivní vlastnosti, ale nepodařilo se dosáhnout takové efektivity jako např. u geneticinu [111,112].

Syntetický aminoglykosid NB124 přinesl pozitivní výsledky u mutací G542X, R1162X a W1282X PTC mutací *CFTR* genu. V kombinaci s ivacaftorem byla jeho efektivita ještě podpořena. Výsledky této kombinované terapie byly lepší než u gentamicinu. Zároveň nebyly zjištěny závažné vedlejší účinky [113]. Další látkou, která se vykazuje jako účinnější než gentamicin je např. ELX-02 [114].

Vzhledem k podobnému účinku NMD inhibitorů a modifikovaných aminoglykosidů se nabízí asociace těchto látek při léčbě CF. Amlexanox a escin jsou dvě látky, které jsou testovány. Problémem nahrazení PTC jinou aminokyselinou ale může být špatné složení

proteinu. Proto by měly být read-through agents kombinovány v terapiích s korektory a potenciátory [67].

3.6 Vyhlídky do budoucna

Jednoznačným cílem terapie CFTR modulátory je nalezení takové kombinace těchto malých molekul, která by dokázala kompletně obnovit činnost CFTR kanálu v buňkách plicního epitelu u pacientů trpících CF. To však zatím není možné. Důležitým cílem tedy je, aby se funkce CFTR kanálu alespoň přiblížila zdravým jedincům a co nejvíce se zmírnily dopady na všechny orgánové soustavy nemocných jedinců, zejména na soustavu dýchací, jejíž selhávání bývá nejčastější příčinou úmrtí.

CFTR modulátory byly uvedeny na trh teprve v roce 2012. Představuje to přelomový bod u léčby CF. Od té doby byly zaznamenány velké pokroky, zvláště velký úspěch slaví poslední trojkombinace CFTR modulátorů Trikafta. Tato terapie slibuje velký potenciál v cílení na pacienty s CF, kteří mají alespoň v jedné alele mutaci F508del, což odpovídá zhruba 90 % nemocných CF. Z tohoto důvodu byla terapie velmi rychle schválena FDA ke klinickému využití [95].

Právě do Trikafty je aktuálně vkládána největší naděje, protože je možné ji použít pro velké množství pacientů. Dosavadní výsledky vykazují ohromný úspěch oproti předchozím duálním terapiím. Aktuálně je v USA Trikafta předepisována vhodným pacientům. Evropa na schválení stále čeká, nicméně Vertex Pharmaceuticals projevil zájem zásobovat evropský trh a očekává se brzké schválení evropskou lékovou organizací EMA (European Medicines Agency) [115].

Pozorovaná zlepšení u pacientů s CF v FEV₁ a snížení koncentrace chloridových iontů v potu jedinců v reakci na doposud schválené modulátorové terapie jsou uvedeny v tabulce 1 na straně 46.

Tabulka 1: Zjištěné změny v FEV₁ a snížení koncentrace chloridových iontů v potu jedinců v reakci na doposud schválené modulátorové terapie u takových pacientů, u nichž se vyskytují mutace *CFTR* genu, na které dané modulátory působí [69,93,97,116,117,118]

Terapie CFTR modulátory	Zlepšení FEV ₁	Snížení c (Cl) v potu
Kalydeco	10-12 %	40-50 mmol/l
Orkambi	3-4 %	6,5 mmol/l
Symdeko	6-7 %	9,5 mmol/l
Trikafta	13-14 %	30-40 mmol/l

Úspěšnost Trikafty v léčbě pacientů trpících CF jednoznačně ukázala další cestu a možnosti kombinování nových CFTR modulátorů s modulátory předchozích generací. Nevýhodou léčby CF CFTR modulátory jsou však jednoznačně finanční náklady. Jenom vývoj jednotlivých léčiv představuje astronomické částky a ceny terapií na pacienta se pohybují v každém případě kolem 300 tisíc dolarů ročně. K ulehčení situace pacientům Vertex Pharmaceuticals často otevírá programy pro pacienty, kdy mají lék dostupný zdarma nebo se finančně spolupodílí. Rovněž by léky měly být propláceny pojišťovny. V České republice je pojišťovny hrazen pouze lék Kalydeco, SÚKL zaregistroval i lék Orkambi a o hrazení tohoto léku se aktuálně jedná [75,119]. Cesta k Trikaftě v České republice tak může být ještě poměrně dlouhá.

Důsledkem vysoké ceny terapií jsou velké náklady na vývoj a testování těchto léků. Všechny zavedené CFTR modulátorové terapie cílí na nejčastěji se vyskytující mutace. Aktuálně nejsou příliš testovány zavedené ani nové potenciální CFTR modulátory na mutace *CFTR* genu s menší četností výskytu. Tento trend se pravděpodobně nebude v nejbližší budoucnosti výrazněji měnit z hlediska toho, že finanční návratnost za vývoj léku pro vzácnou mutaci by nebyla dostatečná. V tomto ohledu jsou farmaceutické firmy limitovány [69]. Základnu léčených pacientů však může výrazně rozšířit Trikafta, která pomáhá pacientům s různými druhy mutací *CFTR* genu. Stačí, když mají alespoň v jedné alele mutaci F508del [96]. Zbýlých cca 10 % pacientů však musí spoléhat na symptomatickou léčbu, pokrok v genové terapii nebo v objevu účinnějších modulátorů pro jejich vzácnější mutaci.

Další problém představují dlouhodobé vedlejší účinky CFTR modulátorů na pacienty, které lze hrubě odhadovat u monoterapie ivacaftorem nebo teoreticky u kombinované terapie ivacaftorem s lumacaftorem. U zbylých dvou terapií, které byly zavedeny roku 2019, nelze s jistotou tvrdit, zda budou mít vliv na prodloužení délky dožití či zlepšení funkce CFTR kanálu v dlouhodobém hledisku.

Přínos v léčbě pacientů s nejčastější mutací F508del by mohla přinést i zmiňovaná trojkombinace CFTR modulátorů od firmy Galapagos, která má podobný charakter jako Trikafta.

Pokrok pro tyto pacienty slibují další kategorie modulátorů, které jsou aktuálně ve vývoji. Konkrétně vhodné CFTR read-through agents by mohly pomoci v léčbě většině pacientů s PTC mutacemi *CFTR* genu. Cesta k této terapii však bude zřejmě dlouhá, protože aktuálně jsou tyto modulátory v raném vývoji a v budoucnu bude potřeba nalézt správnou kombinaci těchto individuů s vhodnými korektory a potenciátory.

Stejný problém se objevuje i u amplifikátorů či stabilizátorů, nicméně všechny tyto tři nové typy CFTR modulátorů se prozatím používají v kombinaci se známými a prověřenými korektory a potenciátory.

Důležitým krokem pro pozitivní budoucnost léčby by mohlo být kompletní zmapování vazebných míst jednotlivých modulátorů na CFTR protein a jejich přesně popsání mechanismus účinku. Nedostatečné informace o působení modulátorů stále limitují výzkumy nových nebo i aktuálně testovaných látek.

Pro léčbu co největšího počtu lidí z populace nemocných CF do budoucna je podstatná optimalizace dávkování. Jde o nalezení takového léku, který by pomaleji podléhal přeměně a mohl tak v těle působit déle. Léčba by poté nemusela být tak nákladná a zároveň by se tím usnadnil život pacientům, kteří by mohli lék užívat např. pouze jednou denně.

Léčba CFTR modulátory je zatím ve velmi raném období, nicméně za několik let dosáhla zajímavých výsledků. Zhruba 20 CFTR modulátorů je aktuálně zařazeno do klinického testování a postupně se budou přidávat další [70].

V tabulce 2 na straně 48 je výčet tříd mutací *CFTR* genu a příslušných modulátorových terapií, které se hodí k léčení jejich důsledků v CF. V tabulce lze vidět, že téměř pro všechny třídy mutací byly navrženy modulátorové terapie a je pravděpodobně jen

otázka času, kdy doposud neschválené třídy CFTR modulátorů budou schváleny pro léčbu v kombinaci s doposud schválenými a využívanými potenciátory a korektory. V tabulce 3 na straně 48 jsou uvedeny CFTR modulátory a příslušné sloučeniny, které jsou či byly testovány.

Tabulka 2: Třídy mutací *CFTR* genu s příslušnými CFTR modulátory vhodnými k léčbě jejich dopadů [46,98].

Třída mutace	Terapie modulátory
I	Read-through agents, NMD inhibitory
II	Korektory, Korektory a potenciátory, potencionálně s amplifikátory a stabilizátory
III	Potenciátory
IV	Potenciátory
V	Amplifikátory, NMD inhibitory
VI	Stabilizátory
VII	-

Tabulka 3: Třídy CFTR modulátorů s příslušnými příklady sloučenin [98].

Třída CFTR modulátorů	Příklad sloučenin (fáze testování)
Read-through agents	Geneticin (předklinická), Gentamicin (neúspěšná předklinická), NB124 (klinická)
Potenciátory	ATP analogy (předklinická), IBMX (preklinická), PTI-808 (klinická), , Geninstein (neúspěšná předklinická), ivacaftor (na trhu), GLPG1837 a GLPG2451 (klinická)
Korektory	Curcumin (předklinická), GLPG222 (klinická), GLPG28511 (klinická), GLPG2737 (klinická), GLPG3221 (klinická), lumacaftor (na trhu), tezacaftor (na trhu), elaxacaftor (na trhu)
Amplifikátory	PTI-428 (klinická)
Stabilizátory	Cavosonstat (klinická), růstový faktor hepatocytů (předklinická), vazoaktivní intestinální peptid (předklinická)

V budoucnu se pravděpodobně dostane hned několik CFTR modulátorů do léčby CF. Velký potenciál má rozvinutí léčby pomocí terapie Trikafta o amplifikátory a stabilizátory, kdy by mohlo dojít k téměř úplnému napravení funkce CFTR kanálu.

Ukázalo se, že kombinování CFTR modulátorů je správným postupem a potenciaální kombinace či jednotlivé třídy modulátorů by mohly napomoci k léčbě CF většiny pacientů.

8. Seznam použité literatury

1. Condren M. E., Bradshaw M. D. (2013) Ivacaftor: A Novel Gene-Based Therapeutic Approach for Cystic Fibrosis. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, **18 (1)**, 8-13.
2. Kerem B., Rommens J., Buchanan J. a kolektiv (1989) Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic analysis. *Science*, **4922 (245)**, 1073-1080.
3. Cohen T.S., Prince A. (2012) Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature Medicine*, **18 (4)**, 509-519.
4. Van Mourik I. (2017) Liver disease in cystic fibrosis. *Pediatrics and Child Health*, **27 (12)**, 552-555.
5. Skalická V. (2014) Terapeutické trendy cystické fibrózy. *Pediatric pro praxi*, **15 (6)**, 340-343.
6. Prickett M., Jain M. (2013) Gene therapy in cystic fibrosis. *Translational Research*, **161 (4)**, 255-264.
7. ECFS Patient Registry. *European Cystic Fibrosis Society* [online]. [vid. 2019-9-22]. Dostupné z: <https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/project/>.
8. About the ECFS. *European Cystic Fibrosis Society* [online]. [vid. 2019-9-22]. Dostupné z: <https://www.ecfs.eu/about-us/>.
9. Český registr cystické fibrózy. [online]. [vid. 2019-9-22]. Dostupné z: <https://cfregistr.cz/>.
10. European Cystic Fibrosis Society (2019) ECFS Patient Registry Annual Data Report 2017, staženo z: <https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports>.
11. Cystic Fibrosis Foundation (2018) 2017 Patient Registry Annual Data Report, staženo z: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/>.
12. ECFS Clinical Trial Network. *European Cystic Fibrosis Society* [online]. [vid. 2019-9-22]. Dostupné z: <https://www.ecfs.eu/ctn/>.
13. Vávrová V. a kolektiv: Cystická fibróza. Grada Publishing a.s., Praha (2006).
14. Busch A., Hodson M., Geddes D.: Cystic Fibrosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton (2007).
15. Andersen D.H. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American Journal of Diseases of Children*, **56(2)**, 344–399.

16. di Sant'Agnesse P.A. (1955) Fibrocystic disease of the pancreas with normal or partial pancreatic function. *Pediatrics*, **15 (6)**, 683-697.
17. Quinton P.M. (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, **301**, 421-422.
18. Who is Cystic Fibrosis Worldwide? *Cystic Fibrosis Worldwide* [online]. [vid. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.cfw.org/>.
19. Poslání a činnost spolku. *Klub cystické fibrózy* [online]. [vid. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.klubcf.cz/poslani-a-cinnosti-spolku/poslani-a-cinnosti.html/>.
20. Hyánek J. Historie novorozeneckého screeningu v ČR. *Novorozenecký screening* [online]. [vid. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/historie-ns-cr/>.
21. Balaščíková M., Holubová A., Skalická V. a kolektiv (2009) Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *Journal of Cystic Fibrosis*, **8 (3)**, 224-227.
22. About Cystic Fibrosis. *Cystic Fibrosis Foundation* [online]. [vid. 2019-1-12]. Dostupné z: <https://www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/>.
23. di Sant'Agnesse P.A., Darling R.C., Perera G.A. a kolektiv (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics*, **12 (5)**, 549-563.
24. Gibson L.E., Cooke R.E. (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilokarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, **23 (3)**, 545-549.
25. Button B., Cai L., Ehre C. a kolektiv (2012) Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science*, **6097 (337)**, 937-941.
26. Gilligan P.H. (1991) Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, **4 (1)**, 35-51.
27. Konstan M.W., Berger M. (1997) Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: Onset and etiology. *Pediatric pulmonology*, **24 (2)**, 137-142.
28. Shak S., Capon D.J., Helmiss R. a kolektiv (1990) Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87 (23)**, 9188-9192.
29. Amaral M.D. (2015) Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine*, **277 (2)**, 155-166.

30. Singh V. K., Schwarzenberg S. J. (2017) Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, **16**, 70-78.
31. Wilschansky M., Novak I. (2013) The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **3 (5)**, a009746.
32. Strausbaugh S. D., Davis P. B. (2007) Cystic Fibrosis: A Review of Epidemiology and Pathobiology. *Clinics in Chest Medicine*, **28 (2)**, 279–288.
33. Riordan J. R., Rommens J., Kerem B. a kolektiv (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **4922 (245)**, 1066-1073.
34. Carter S. C., McKone E. F. (2016) Pharmacogenetics of cystic fibrosis treatment. *Pharmacogenomics*, **17 (13)**, 1453–1463.
35. How do genetics indicate the location of a gene? *Genetics Home Reference* [online]. [vid. 2019-3-22]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/genelocation/>.
36. Cutting G.R. (2015) Cystic fibrosis genetics- from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*, **16 (1)**, 45-56.
37. Castellani C., Cuppens H., Macek M. Jr. a kolektiv (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of Cystic Fibrosis*, **7 (3)**, 179-196.
38. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Uniprot* [online]. [vid. 2019-10-8]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13569/>.
39. Hwang T. C., Kirk K. L. (2013) The CFTR Ion Channel: Gating, Regulation, and Anion Permeation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **3(1)**, a009498.
40. Sheppard D. N., Welsh M. J. (1999) Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*, **79(1)**, 23–45.
41. Moran, O. (2016) The gating of the CFTR channel. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74(1)**, 85–92.
42. Chappe V., Hinkinson D.A., Zhu T. a kolektiv (2003) Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PAK. *The Journal of physiology*, **548 (1)**, 39-52.
43. Gadsby D.C., Nairn A.C. (1999) Control of CFTR Channel Gating by Phosphorylation and Nucleotide Hydrolysis. *Physiological reviews*, **79 (1)**, 77-107.

44. Gadsby D.C., Vegani P., Csanády L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*, **7083 (440)**, 477-483.
45. Welsh M.J., Smith A.E. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, **73 (7)**, 1251-1254.
46. De Boeck K., Amaral M. D. (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine*, **4 (8)**, 662–674.
47. Busch A.: Cystic fibrosis in 21st century. Karger, Basel (2006).
48. Cheng S. H., Gregory R. J., Marshall J., Paul S., Souza D. W., White G. A., O’Riordan C.R., Smith, A. E. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, **63 (4)**, 827–834.
49. Rogan M. P., Stoltz D. A., Hornick D. B. (2011) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Intracellular Processing, Trafficking, and Opportunities for Mutation-Specific Treatment. *Chest*, **139 (6)**, 1480–1490.
50. Rowntree R.K., Harris A. (2003) The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of Human Genetics*, **67 (5)**, 471-485.
51. Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro J.D. (2016) Classification of CFTR mutation classes. *The Lancet Respiratory Medicine*, **4 (8)**, 37-38.
52. DeSimone E., Tilleman J., Giles M.E. a kolektiv (2018) Cystic fibrosis: Update on Treatment Guidelines and New Recommendations. *US Pharmacist*, **43 (5)**, 16-21.
53. Edmondson C., Davies J. C. (2016) Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, **7 (3)**, 170–183.
54. Cox N.S., Alison J.A., Holland A.E. (2013) Interventions for promoting physical activity in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, 1-51.
55. Konstan M. W., Ratjen F. (2012) Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: Potential role in the early treatment of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, **11 (2)**, 78–83.
56. Genentech (bezpečnostní list) *Pulmozyme® Inhalation Solution (2,5 mg)*. 2014. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: https://www.gene.com/download/pdf/pulmozyme_MSDS.pdf/.
57. Chmiel J. F., Aksamit T. R., Chotirmall S. H. a kolektiv (2014) Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis. I. The Microbiome, Methicillin-Resistant

- Staphylococcus aureus, Gram-Negative Bacteria, and Multiple Infections. *Annals of the American Thoracic Society*, **11** (7), 1120–1129.
58. Matel J., Milla, C. (2009) Nutrition in Cystic Fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **30** (5), 579–586.
 59. Sabharwal S. (2016) Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Gastroenterology and hepatology*, **12**(1), 43-47.
 60. Creon. *Drugs.com* [online]. [vid. 2019-10-8]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/creon.html/>.
 61. Donnelley M., Parsons D.W. (2018) Gene Therapy for Cystic Fibrosis Lung Disease: Overcoming the Barriers to Translation to the Clinic. *Frontiers in pharmacology*, **1381** (9), 1-9.
 62. Cooney A.L., McCray P.B., Sinn P.L. (2018) Cystic Fibrosis Gene Therapy: Looking Back, Looking Forward. *Genes*, **9** (11), 538.
 63. Chaudary N. (2018) Triplet CFTR modulators: future prospects for treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **14**, 2375–2383.
 64. Ong T., Ramsey B. W. (2016) New Therapeutic Approaches to Modulate and Correct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Pediatric Clinics of North America*, **63** (4), 751–764.
 65. Habib A.-R.R., Kajbafzadeh M., Desai S. a kolektiv (2019) A Systematic Review of the Clinical Efficacy and Safety of CFTR Modulators in Cystic Fibrosis. *Scientific Reports*, **9** (1), 7234.
 66. Lopes-Pacheco M. (2016) Correctors rescue CFTR mutations in nucleotide-binding domain 1 (NBD1) by modulationg proteostasis. *Chembiochem*, **17** (6), 493-505.
 67. Lopes-Pacheco M (2020) CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in pharmacology*, **1662** (10), 1-29.
 68. Kalydeco Approval History. *Drugs.com* [online]. [vid. 2019-12-15]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/history/kalydeco.html/>.
 69. Hudock K. M., Clancy J. P. (2017) An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, **22** (4), 331–346.
 70. Gentzsch M., Mall M. A. (2018) Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest*, **154** (2), 383–393.
 71. Ivacaftor. *Drugbank*. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08820 DRUGBANK/>.

72. Eckford P. D., Li C., Ramjeesingh M. a kolektiv (2012) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, **287** (44), 36639–36649.
73. Veit, G., Avramescu, R. G., Perdomo, D. a kolektiv (2014) Some gating potentiators, including VX-770, diminish $\Delta F508$ -CFTR functional expression. *Science translational medicine*, **246** (6), 246ra97.
74. European Medicines Agency (příbalový leták) *Kalydeco, INN-ivacaftor*. [online]. [vid. 2020-1-2]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kalydeco-epar-product-information_cs.pdf/.
75. Kalydeco. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [online]. [vid. 2019-11-13]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0185303&tab=prices/>.
76. Yeh H. I., Sohma Y., Conrath K. a kolektiv (2017) A common mechanism for CFTR potentiators. *The Journal of general physiology*, **149** (12), 1105–1118.
77. Miki H., Zhou Z., Li M. a kolektiv (2010) Potentiation of disease-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutants by hydrolyzable ATP analogs. *The Journal of biological chemistry*, **285** (26), 19967–19975.
78. Gees M., Musch S., Van der Plas S. a kolektiv (2018) Identification and Characterization of Novel CFTR Potentiators. *Frontiers in pharmacology*, **1221** (9).
79. Hudock K. M., Clancy J.P. (2017) An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, **22** (4), 331-346.
80. Rowe S. M., Verkman A. S. (2013) Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **3** (7), a009761.
81. Okiyoneda T., Veit G., Dekkers J. F. a kolektiv (2013) Mechanism-based corrector combination restores $\Delta F508$ -CFTR folding and function. *Nature chemical biology*, **9** (7), 444–454.
82. Lumacaftor. *Drugbank*. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09280/>.
83. Cholon D. M., Quinney N. L., Fulcher M. L. a kolektiv (2014) Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis. *Science translational medicine*, **6** (246), 246ra96.
84. Orkambi Approval History. *Drugs.com* [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/history/orkambi.html/>.

85. Taylor-Cousar J. L., Mall M. A., Ramsey B. W. a kolektiv (2019) Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two *F508del* alleles. *ERJ open research*, **5** (2), 00082-2019.
86. Connett G. (2019) Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy. *Dovepress*, **13**, 2405-2412.
87. Matthes E., Goepp J., Carlile G. W. a kolektiv (2016) Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *British journal of pharmacology*, **173** (3), 459–470.
88. Schneider E. K. (2018) Cytochrome P450 3A4 Induction: Lumacaftor versus Ivacaftor Potentially Resulting in Significantly Reduced Plasma Concentration of Ivacaftor. *Drug metabolism letters*, **12** (1), 71–74.
89. Shiferaw D., Faruqi S. (2019). Profile of tezacaftor/ivacaftor combination and its potential in the treatment of cystic fibrosis. *Therapeutics and clinical risk management*, **15**, 1029–1040.
90. Tezacaftor. *Drugbank*. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11712/>.
91. Symdeko approval history. *Drugs.com* [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/history/symdeko.html/>.
92. Taylor-Cousar J. L., Munck A., McKone E.F., a kolektiv (2017) Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *The New England Journal of Medicine*, **377** (21), 2013-2023.
93. Davies J. C., Moskowitz S.M., Brown C. a kolektiv (2018) VX-659-tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two phe508del alleles. *The New England Journal of Medicine*, **379** (17), 1599-1611.
94. Elaxacaftor. *Drugbank*. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB15444/>.
95. U.S. Food and Drug Administration. (tisková zpráva) *FDA approves new breakthrough therapy for cystic fibrosis*. 2019. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-breakthrough-therapy-cystic-fibrosis/>.
96. Hoy S. M. (2019) Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. *Drugs*, **79**, 2001-2007.

97. Keating D., Marigowda, G., Burr L. a kolektiv (2018) VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *The New England Journal of Medicine*, **379 (17)**, 1612-1620.
98. Pranke I., Golec A., Hinzpeter A. a kolektiv (2019) Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Frontiers in pharmacology*, **10**, 121.
99. Dukovski D., Vilella A., Bastos C. a kolektiv (2020) Amplifiers co-translationally enhance CFTR biosynthesis via PCBP1-mediated regulation of CFTR mRNA. *Journal of Cystic Fibrosis*, **S1569-1993 (20)**, 30052-7.
100. Guilano K. A., Wachi S., Drew L. a kolektiv (2018) Use of a High-Throughput Phenotypic Screening Strategy to Identify Amplifiers, a Novel Pharmacological Class of Small Molecules That Exhibit Functional Synergy with Potentiators and Correctors. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, **23 (2)**, 111–121.
101. Okiyoneda T., Barrière H., Bagdány M. a kolektiv (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, **5993 (329)**, 805-810.
102. Loureiro C.A., Matos A.M., Dias-Alves Â. A kolektiv (2015) A molecular switch in the scaffold NHERF1 enables misfolded CFTR to evade the peripheral quality control checkpoint. *Science Signaling*, **377 (8)**, ra48.
103. Moniz S., Sousa M., Moraes B.J. a kolektiv (2013) HGF stimulation of Rac1 signaling enhances pharmacological correction of the most prevalent cystic fibrosis mutant F508del-CFTR. *ACS Chemical Biology*, **8 (2)**, 432-442.
104. Rafferty S., Alcolado N., Norez C. a kolektiv (2009) Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **331 (1)**, 2-13.
105. Lobo M.J., Amaral M.D., Zacco M., Farinha C.M. (2016) EPAC1 activation by cAMP stabilizes CFTR at the membrane by promoting its interaction with NHERF1. *Journal of Cell Science*, **129 (13)**, 2599-2612.
106. Marozkina N.V., Yemen S., Borowitz M. a kolektiv (2010) Hsp 70/Hsp 90 organizing protein as a nitrosylation target in cystic fibrosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107 (25)**, 11393-11398.

107. Donaldson S.H., Solomon G.M., Zeitlin P.L. a kolektiv (2017) Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR. *Journal of Cystic Fibrosis*, **16 (3)**, 371-379.
108. Pranke I., Bidou L., Martin N. a kolektiv (2018) Factors influencing readthrough therapy for frequent cystic fibrosis premature termination codons. *ERJ open research*, **4 (1)**, 00080-2017.
109. Du M., Jones J.R., Lanier J. a kolektiv (2002) Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cfr-/- mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, **80 (9)**, 595-604.
110. Prayle A., Watson A., Fortnum H. a kolektiv (2010) Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax*, **65 (7)**, 654-658.
111. Rowe S.M., Sloane P., Tang L.P. a kolektiv (2011) Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*, **89 (11)**, 1149-1161.
112. Kandasamy J., Atia-Glikin D., Shulman E. a kolektiv (2012) Increased selectivity toward cytoplasmic versus mitochondrial ribosome confers improved efficiency of synthetic aminoglycosides in fixing damaged genes: a strategy for treatment of genetic diseases caused by nonsense mutations. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, **55 (23)**, 10630-10643.
113. Xue X., Mutyam V., Tang L. a kolektiv (2014) Synthetic aminoglycosides efficiently suppress cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations and are enhanced by ivacaftor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **50 (4)**, 805-816.
114. Leubitz A., Frydman-Marom A., Sharpe N. a kolektiv (2019) Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single Ascending Doses of ELX-02, a Potential Treatment for Genetic Disorders Caused by Nonsense Mutations, in Healthy Volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, **8 (8)**, 984-994.
115. European Regulators Take Step Toward Possible Approval of Vertex's New Combo Therapy for 90% of CF Patients. *Cystic Fibrosis News Today*. 2019. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/2019/11/01/european-medicines-agency-validates-vertex-approval-request-cf-triple-combo-therapy/>.
116. Pettit R.S., Fellner C. (2014) CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Pharmacy and Therapeutics*, **39 (7)**, 500-511.

117. Connett G. (2019) Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy. *Dovepress*, **13**, 2405-2412.
118. Lommatzsch S. T., Taylor-Cousar J. L. (2019) The combination of tezacaftor and ivacaftor in the treatment of patients with cystic fibrosis: clinical evidence and future prospects in cystic fibrosis therapy. *Therapeutic advances in respiratory disease*, **13**.
119. Léčba Orkambi pro CF pacienty s dvěma mutacemi delF508 (a starší 12 let) byla schválena Evropskou komisí. *Klub cystické fibrózy*. [online]. [vid. 2020-1-1]. Dostupné z: <https://www.klubcf.cz/novinky/lecba-orkambi-pro-cf-pacienty-s-dvema-mutacemi-delf508-a-starsi-12-let-byla-schvalena-evropskou-komisi.html/>.

Souhlasím k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka