



*fondazione per la ricerca  
sulla fibrosi cistica - onlus*

---

Seminario di Primavera - Verona 9-10 maggio 2003

---



**PROGRESSI RECENTI  
E SVILUPPI FUTURI  
NELLA RICERCA  
SULLA FIBROSI CISTICA**

---

Ricerca Clinica, Genetica Applicata, Terapie Molecolari

---

**RIASSUNTO DEI CONTRIBUTI**



*fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - Onlus  
italian cystic fibrosis research foundation*

## **Seminario di Primavera**

*Verona, 9-10 maggio 2003*

# **PROGRESSI RECENTI E SVILUPPI FUTURI NELLA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA**

Ricerca clinica, Genetica applicata, Terapie molecolari

### ***RIASSUNTI DEI CONTRIBUTI***

<b>Prof. Antonio Cao:</b> Introduzione	<i>pag. 3</i>
<b>Prof Steven Conway:</b> Ricerca clinica	<i>pag. 5</i>
<b>Prof. Claude Ferec:</b> Ricerca genetica	<i>pag. 11</i>
<b>Prof. Pamela Zeitlin:</b> Ricerca su terapie molecolari	<i>pag. 17</i>

---

*I riassunti qui riportati sono la traduzione letterale dei testi originali inviatici dai relatori, con qualche breve nota redazionale tra parentesi per termini o espressioni meno note ai lettori che hanno limitata consuetudine con la materia.*

---



## Prof. Antonio Cao

Direttore dell'Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia di Cagliari.  
Presidente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

*Il Dott. Antonio Cao è Professore di Clinica Pediatrica ed è stato il direttore dell'Istituto Regionale per le Microcitemie dell'Università degli Studi di Cagliari. Attualmente egli dirige l'Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia di Cagliari. I suoi interessi scientifici riguardano le malattie ereditarie del tessuto ematopoietico e specie le Talassemie e la genetica dell'asma e delle sindromi malformative multiple. Negli ultimi anni ha anche dato con il suo Gruppo qualche contributo alla genetica della Fibrosi Cistica. E' autore di 345 articoli scientifici pubblicati in larghissima parte su riviste straniere di larga circolazione internazionale. Ha ricevuto diversi prestigiosi premi tra cui "Allan Award" dell'American Society of Human Genetics, "Marta Philipson Award" dell'Accademia Scandinava di Pediatria, e "Maria Vilma e Bianca Querci" First International Award. Il Prof. Cao è Presidente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.*



## INTRODUZIONE AL SEMINARIO

In questi ultimi 15 anni abbiamo assistito ad un grande progresso nel campo delle nostre conoscenze sulla Fibrosi Cistica, specie nel settore della genetica e della biologia molecolare, ma anche nel campo, sicuramente più difficile ed arduo, della ricerca clinica. Anche la ricerca di nuove terapie molecolari ha fatto sicuramente notevoli passi avanti nel gettare le basi razionali per questa terapia ma non ha ancora raggiunto il livello di applicabilità clinica. Questi tre argomenti: La ricerca clinica, la ricerca genetica e la ricerca di nuove terapie molecolari costituiscono il programma del "Seminario di primavera" organizzato dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica.

Il tema della ricerca clinica sarà affrontato dal Prof. Steven Conway del centro regionale di Leeds del Regno Unito. Tra gli argomenti che verranno trattati, quelli più interessanti e promettenti per far progressi nel trattamento sono l'uso degli antibiotici di tipo macrolidico per il loro marcato effetto diretto sul processo infiammatorio tipico del polmone dei pazienti con CF; i regimi terapeutici eradicanti che pospongono e forse potrebbero prevenire la colonizzazione del polmone da parte della *Pseudomonas aeruginosa*, la prevenzione

e il trattamento dell'Osteoporosi, che ha un impatto estremamente negativo sulla qualità di vita del paziente e la messa a punto di nuovi sistemi di nebulizzazione. L'argomento del ruolo della infiammazione nella progressione della patologia polmonare è anche oggetto di diversi progetti che sono stati presentati alla valutazione critica del Comitato Scientifico della Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica. Queste ricerche cliniche potrebbero risultare in un allungamento della vita media ed in un miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Il secondo grande tema riguarda la genetica molecolare, nel cui campo si sono realizzati negli ultimi anni i più importanti progressi, che verrà trattato dal Prof. Claude Ferenc del Laboratorio INSERM di Brest. I temi più rilevanti in questo settore sono l'ulteriore definizione dello spettro di mutazioni causa di CF, la messa a punto di tecnologie accurate ed automatizzate di diagnosi molecolare come la D-HPLC, la chiarificazione del meccanismo patogenetico di ogni specifica mutazione quale presupposto di future terapie farmacologiche o molecolari ma soprattutto l'identificazione di geni capaci di modificare il fenotipo. Un discreto numero di progetti di ricerca presentati al Comitato Scientifico della Fondazione riguardano tematiche molecolari, in particolare identificazione di geni modificatori del fenotipo, sviluppo di nuovi farmaci mutazioni-specifici disegnati sulla base della specifica patogenesi molecolare e metodologie di identificazione di mutazioni in zone non ancora analizzate del gene o delle sue sequenze regolatrici. Le ricerche di biologia molecolare hanno avuto fino ad ora un notevole impatto sulla prevenzione della CF tramite consultazione genetica, screening neonatale, screening a cascata, diagnosi prenatale e preconcezionale. La definizione della patogenesi molecolare mutazione-specifica e l'identificazione di geni modificatori potrebbe ulteriormente migliorare le nostre attuali conoscenze sulle correlazioni genotipo-fenotipo ma forse aprire anche una strada per nuovi approcci terapeutici.

L'ultimo grande argomento della giornata riguarderà la terapia genica, che fino ad ora si è fondata sull'uso di vettori adenovirali, vettori derivati dall'"adeno-associated virus" (AAV) e vettori costituiti da liposomi. L'argomento verrà svolto dalla Prof.ssa Pamela Zeitlin del Johns Hopkins School of Medicine. I risultati della terapia genica sono stati finora relativamente deludenti, ivi compresi quelli recentemente ottenuti con l'uso di vettori derivati dalla AAV. Vi sono indubbiamente numerosi ostacoli verso il successo della terapia genica specifici della CF, tra cui la localizzazione baso-laterale dei recettori per l'AAV, le difficoltà nel trasporto del vettore al nucleo e l'eventuale effetto negativo sul costrutto di proteasi e di anticorpi neutralizzanti. Accanto a questi fattori vanno ricordati ostacoli più generali alla terapia genica tramite vettori quali la modesta efficienza della transfezione, la scarsa espressione del gene transfettato e la sua possibile rapida inattivazione. Accanto alla terapia genica vanno sviluppandosi terapie farmacologie alternative, cui abbiamo accennato in precedenza, volte a regolare la funzione del gene CFTR, ad attivare il trasporto ionico della proteina CFTR o la sua localizzazione sulla membrana cellulare.

Nonostante i risultati modesti fino ad ora ottenuti con queste terapie alternative occorre sottolineare che, grazie alle ricerche di questi anni, si sono potute stabilire le basi biologiche di questi approcci terapeutici ed individuarne le problematiche e gli ostacoli. E' pertanto lecito nutrire per il futuro un cauto ottimismo riguardo possibili successi ottenibili sia tramite il miglioramento dei vettori in sperimentazione, l'uso di nuovi vettori, strategie di diverso tipo di riparazione del RNA e di ricombinazione omologa e/o uso di nuovi farmaci attivi sulla proteina CFTR o su funzioni alternative di compenso.

## Prof. Steven Conway

Direttore della Regional Paediatric Cystic Fibrosis Unit  
St. James Hospital  
Leeds, Gran Bretagna

*Formatosi alla scuola di due rilevanti Maestri del mondo medico britannico, il Dr John Batten del Brompton Hospital di Londra, pioniere nelle cure ai malati CF adulti, e il Dr Jim Littlewood, fondatore dell'Unità CF di Leeds e grande referente inglese per la fibrosi cistica, il Dr Conway istituì presso il St. James Hospital una Unità CF per adulti. Egli divide il suo tempo tra le due Unità CF di Leeds, quella pediatrica (200 bambini in carico) e quella per adulti (quasi 300 pazienti). Egli ha condotto o partecipato a numerosi studi clinici nel campo della fibrosi cistica: tra essi, meritano di essere citati quelli inerenti aspetti nutrizionali della malattia, con particolare riguardo anche ai problemi comportamentali dell'alimentazione, quelli sulla trasmissione di Pseudomonas aeruginosa, sulle infezioni da batteri meno comuni (Stenotrophomonas, Alcaligenes, Stafilococco multiresistente), sul metabolismo osseo e l'osteoporosi, sulla qualità di vita degli adolescenti ed adulti CF, e parecchi altri.*



### RECENTI E SIGNIFICATIVI PROGRESSI NELLA RICERCA CLINICA IN FIBROSI CISTICA

Mi è stato chiesto di discutere con voi di alcuni importanti sviluppi nell'ambito clinico della fibrosi cistica, concentrandomi sui trattamenti che avranno un impatto sull'assistenza ai malati ora e nei prossimi pochi anni, ma anche con uno sguardo ai possibili sviluppi futuri. Naturalmente c'è una grande quantità di argomenti tra cui scegliere, dal momento che parliamo del trattamento di una malattia che colpisce così tante e diverse parti del corpo. Tuttavia, stanti i limiti di tempo che abbiamo, mi limiterò alle seguenti aree:

1. Antibiotici macrolidi, per esempio azitromicina, claritromicina, eritromicina: come agiscono? Qual è il loro ruolo nel trattamento CF?
2. Importanza dei regimi di eradicazione batterica e di segregazione dei pazienti: fino a qual punto dovremmo adottare la segregazione?
3. Osteoporosi (ossa rarefatte): quale ne è la causa in fibrosi cistica? Come dovremmo tentare di prevenirla? Come dovremmo trattarla?

4. Strumenti "adattativi" per l'aerosolterapia delle vie aeree: migliorano le cure ai pazienti?

### **1. Impiego di antibiotici macrolidi nella fibrosi cistica**

Al fine di comprendere i benefici che si possono ottenere dal trattamento con il gruppo degli antibiotici macrolidi, è innanzitutto necessario descrivere brevemente che cosa accade una volta che si sia stabilita una infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. Con il persistere dell'infezione noi troviamo che i batteri crescono in microcolonie e si sviluppano nella forma cosiddetta "mucoide", caratterizzata dalla secrezione di alginato, una pellicola gelatinosa che li avvolge e li protegge. Questa viene descritta come modalità di crescita "in biofilm". La *Ps. aeruginosa* all'interno del biofilm è molto resistente sia agli antibiotici sia alle difese immunitarie del paziente.

Spostiamoci per un momento al Giappone e ad una malattia chiamata "Panbronchiolite diffusa (DPB)". Questa è una malattia degli adulti che ha molte somiglianze con la fibrosi cistica, per esempio la tosse persistente, lo sputo purulento, la sinusite cronica e le bronchiectasie. Circa il 70% dei pazienti con DPB hanno infezione cronica da *Ps. aeruginosa* e i batteri mostrano lo stesso comportamento di crescita in biofilm mucoide che noi vediamo nella CF. Per puro caso si trovò che il trattamento con eritromicina (un antibiotico appunto del gruppo macrolidi) in pazienti con DPB e infezione cronica da *Ps. aeruginosa* miglioravano la loro sopravvivenza a 5 anni dal 26% al 94%.

Potrebbero l'eritromicina o altri antibiotici macrolidi ottenere lo stesso effetto in fibrosi cistica? Se così fosse essi potrebbero agire con qualcuna delle seguenti modalità.

- a. Le singole unità di *Ps. aeruginosa* "parlano" le une con le altre per formare i biofilms, usando un sistema di segnali chiamato "quorum sensing". I macrolidi bloccano questi segnali.
- b. Basse concentrazioni di macrolidi inibiscono la produzione di alginato e pertanto la formazione di biofilms mucoidi.
- c. I macrolidi inibiscono la motilità batterica, impedendo così la formazione di biofilm. Ancora una volta sono necessarie per questo basse concentrazioni di farmaco.
- d. In CF c'è una eccessiva risposta infiammatoria all'infezione polmonare. I macrolidi bloccano questa risposta infiammatoria e possono di conseguenza ridurre il danno polmonare.
- e. I macrolidi compromettono l'attitudine di *Ps. aeruginosa* ad attaccarsi alle cellule respiratorie e possono così ridurre la gravità dell'eventuale infezione.
- f. I macrolidi riducono la viscosità dello sputo cosicché l'espettorazione può essere più facile.

Discuterò dei più importanti studi clinici condotti con macrolidi in fibrosi cistica. In sintesi, questi dimostrano un miglioramento della funzione respiratoria, una migliore qualità di vita, meno infiammazione, meno uso di antibiotici per vena e meno giornate di degenza in ospedale con il trattamento a base di macrolidi. Ma non tutti i pazienti traggono beneficio da tale trattamento ed alcuni possono andare addirittura peggio. Inoltre, noi non conosciamo ancora quale sia la sicurezza di questi farmaci nel lungo termine. Forse il loro uso dovrebbe essere riservato ai pazienti che mostrano una scarsa risposta al trattamento convenzionale o come aggiunta al trattamento della colonizzazione precoce?

## **2. Infezione da *Pseudomonas aeruginosa*: segregazione dei pazienti ed eradicazione dell' infezione precoce.**

L'infezione da *Ps. aeruginosa* è associata con una peggiore funzione respiratoria, una più forte morbilità ed una minore attesa di vita. Negli USA la maggioranza dei bambini CF sono infetti da *Ps. aeruginosa*. In Francia l'età media della prima infezione da *Ps. aeruginosa* è di 5 anni.

Ma con una combinazione di trattamento intensivo della prima infezione e delle successive infezioni intermittenti da *Ps. aeruginosa* e la separazione in ospedale dei pazienti con infezioni da quelli senza infezione da pseudomonas, la prevalenza di infezione cronica può essere dilazionata nel tempo per anni (e forse prevenuta?). Questo fu inizialmente dimostrato dal Centro CF di Copenaghen e io vi mostrerò i loro dati. Noi abbiamo seguito il loro indirizzo e, mediante la pratica di screening neonatale (1975), di trattamento intensivo dei primi isolamenti di *Ps. aeruginosa* dai pazienti (1985), e segregazione dei pazienti con e senza infezione da pseudomonas (1991), noi abbiamo ridotto la prevalenza di infezione cronica da *Ps. aeruginosa* nel nostro reparto pediatrico dal 24% al 18% nel corso degli ultimi 11 anni. Similmente, la prevalenza di infezione cronica nei bambini al di sotto degli 11 anni di età è caduta dal 24% al 4%.

Vi mostrerò i nostri dati e discuterò i nostri protocolli di trattamento.

Io credo che questa riduzione nel tasso di infezione da *Ps. aeruginosa* sia il più importante successo ottenuto nelle cure della fibrosi cistica negli anni recenti ed il suo frutto sarà raccolto per molti anni. Se sostanzialmente noi dilazioniamo o preveniamo l'infezione cronica noi dilazioneremo o preverremo la reazione infiammatoria associata con l'infezione e il danno polmonare. Io credo che noi vedremo in seguito aumentare la sopravvivenza media di questi bambini ben oltre i 40 – 45 anni che sono stati predetti per loro.

Nei bambini con fibrosi cistica quindi l'infezione cronica da *Ps. aeruginosa* non è inevitabile.

Io discuterò con voi anche la questione dei ceppi trasmissibili di *Ps. aeruginosa*, di recente riportati. Che cosa significano questi per l'assistenza al paziente? Sono essi clinicamente importanti? Dovremmo noi modificare la nostra pratica a causa di essi?

## **3. Osteoporosi**

Sulla base di parecchi recenti studi noi sappiamo oggi che l'osteoporosi (ossa rarefatte)



colpisce molti adulti con fibrosi cistica. Questo è importante perché l'osteoporosi sarà silente finché queste ossa più fragili non si romperanno, con conseguente dolore. Se le costole si fratturano la tosse e la fisioterapia saranno dolorose e difficoltose, compromettendo pertanto la rimozione delle secrezioni bronchiali.

Vi sono tre domande cui bisogna dare risposta:

- a. L'osteoporosi è anche un problema dei bambini con CF o è solo confinata agli adulti?
- b. Che cosa causa l'osteoporosi?
- c. Come possiamo trattarla nel migliore dei modi?

Io discuterò la letteratura nel tentativo di rispondere a queste domande e mostrerò alcuni dati nuovi ottenuti da nostri studi su bambini e su adulti presso il Centro di Leeds. Io sostengo che in tutti i bambini CF, a parte quelli che stanno realmente bene, l'osteoporosi è un problema, che la causa di essa è multifattoriale (dipende da parecchi fattori) e che la famiglia dei farmaci bifosfonati mostra risultati promettenti nel trattamento di questa condizione. Sono necessari però studi clinici randomizzati di questi farmaci nell'osteoporosi CF prima che il loro impiego diventi generalizzato senza una adeguata base di evidenza.

La prevenzione dell'osteoporosi dovrebbe essere un obiettivo maggiore. Io discuterò l'importanza di una nutrizione ottimale, specialmente con l'apporto di calcio e vitamina D (ma discuterò anche la probabile importanza della vitamina K nella salute dell'osso), l'importanza dell'attività fisica e del tempestivo trattamento di ogni nuova infezione respiratoria.

#### **4. Erogazione "adattativa" di aerosol alle vie aeree** (*Adaptive Airways Delivery – AAD*)

Parecchi farmaci nella cura della fibrosi cistica sono somministrati mediante nebulizzazione, una procedura noiosa ed universalmente impopolare. Molta parte dell'aerosol viene dispersa quando si impiega una tecnica inalatoria inadeguata e molto tempo viene sprecato, mentre l'aerosol fuoriesce, per tossire, per parlare, etc. La nuova tecnica AAD genera aerosol solo quando il paziente respira correttamente nella mascherina ed eroga il farmaco solo nella prima metà dell'atto inspiratorio. Questa tecnica inoltre si adatta al modello individuale di respiro, cosicché se il paziente attua respiri più lunghi e più profondi più aerosol sarà somministrato ad ogni inspirazione. Il risultato è che c'è meno dispersione di aerosol e che il trattamento può essere completato più rapidamente. Questo dovrebbe, noi lo speriamo, permettere ai pazienti un piano di trattamento più semplice e pertanto più facile per essi da accettare e praticare.

Riferirò dei risultati di uno studio internazionale che compara il trattamento mediante il sistema AAD con quello basato su un nebulizzatore convenzionale. Lo studio ha coinvolto oltre 250 pazienti. La maggior parte dei pazienti preferiva l'apparecchio AAD e attuava

con esso più correttamente il loro trattamento. Benché non si siano trovate differenze nell'impiego di antibiotici, nel numero di giorni di degenza in ospedale, o nella funzione polmonare con i due diversi sistemi di nebulizzazione, c'è stata tuttavia qualche evidenza che lo strumento AAD era complessivamente più efficiente ed aveva un effetto positivo sulla FEV1 sia nel breve che nel lungo termine.

Io sono certo che i pazienti preferiranno usare il sistema AAD. E' probabile che essi assumeranno con questo sistema più trattamento, dal momento che esso è più rapido e più facile. Più trattamento, assunto con meno dispersione, dovrebbe portare a un migliore stato di salute. Sarà molto interessante valutare questo nuovo sistema di erogazione di aerosol nell'uso clinico giorno per giorno.

## **Riferimenti bibliografici**

*Equi A, Balfour-Lynn, Bush A et al. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. Lancet 2002;360:978-84.*

*Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment at time of initial colonisation with Pseudomonas aeruginosa postpones chronic infection and prevents deterioration in pulmonary function in patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997;23:330-5.*

*Wolter J, Seeney S, Bell S. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. Thorax 2002;57:212-6.*

*Conway SP, Dodd M, Marsden R, et al. Comparison of compliance in cystic fibrosis patients using either a HaloLite adaptive aerosol delivery system or a conventional high output nebuliser system. J Cys Fib 2002;1(suppl):S67*

*Marsden R, Conway SP, Dodd M, et al. A multi-centre randomised study comparing the HaloLite adaptive aerosol delivery system with a high output nebuliser system in patients with cystic fibrosis. J Cys Fib 2002;1(suppl):S105*

*Lee T et al. Reduction in prevalence of chronic Pseudomonas aeruginosa infection at a regional paediatric CF Unit. (submitted to Pediatr Pulmonol 2003)*

*Elkin SL, Vedi S, Bord S, et al. Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of adults with cystic fibrosis. Am J Resp Crit Care Med 2002;166:1470-74*

*Sood M, Hambleton G, Super M, et al. Bone status in cystic fibrosis. Arch Dis Child 2001;84:516-20*

*Conway SP, Wolfe S, Brownlee KG, et al. Vitamin K status in children with cystic fibrosis and its relationship to bone mineral density and turnover. Presented at the 26th European CF Conference, Belfast, 2003.*

*Conway SP, Oldroyd B, Brownlee KG, et al. Bone mineral and body composition in children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 2001;suppl 22:332*



## Prof. Claude Ferec

Professore di Genetica e Direttore dell'Istituto EMI U 0115 di "Genetica Molecolare ed Epidemiologia Genetica" presso l'Università di Brest-Bretagna – Francia

*Il prof. Ferec ebbe la sua formazione tra Rennes, Brest e Parigi, conseguendo dapprima una laurea in Farmacia, poi in Medicina, quindi in Biologia con abilitazione a dirigere la ricerca.*

*Dal 1986 al 2000 è stato direttore di alcuni centri e laboratori per le banche del sangue. Dal 2000 dirige l'Istituto di Genetica Molecolare ed Epidemiologia Genetica dell'Università di Brest.*

*Egli è stato tra i più fecondi studiosi in Europa di molti aspetti genetici della fibrosi cistica. Tra i molti studi di cui è stato leader o importante collaboratore, vanno citati quelli sui geni modificatori del gene CFTR, quelli sulla pancreatite cronica, sullo screening neonatale, sulla messa a punto di tecnologie avanzate per l'identificazione di mutazioni nel gene CFTR, tra cui la tecnica DHPLC, sull'epidemiologia delle mutazioni CFTR in Francia, sullo screening prenatale della CF mediante ultrasonografia dell'intestino ecogeno. Egli ha contribuito recentemente con il suo Gruppo anche a mettere a punto tecniche di valutazione di efficacia della terapia genica.*



### **RECENTI PROGRESSI NELLA RICERCA GENETICA APPLICATA ALLA DIAGNOSI E POTENZIALMENTE ALLA TERAPIA DELLA FIBROSI CISTICA**

La fibrosi cistica è la più comune malattia severa su base genetica autosomica recessiva che colpisce i bambini nelle popolazioni di origine caucasica. La malattia porta ad infezioni polmonari croniche e a disturbi digestivi, quali l'insufficienza pancreatica.

L'aspettativa mediana di vita dei pazienti è fortemente aumentata nel corso dei 50 anni trascorsi, ma la fibrosi cistica rimane una malattia letale e costituisce un serio problema di salute pubblica.

Il gene responsabile della CF, identificato nel 1989, è il gene denominato "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)". Esso codifica per una proteina di 1480 aminoacidi, chiamata CFTR. In aggiunta alla mutazione DF508, che interessa circa il 66% di tutti gli alleli CF nel mondo, più di mille mutazioni, distribuite sui 27 esoni del gene

CFTR, sono state a tutt'oggi riportate dal Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Queste mutazioni sono situate nell'intera sequenza codificante del gene ma anche nel suo promotore. Tuttavia, ci sono regioni del gene dove le mutazioni sono più comuni, come quelle che codificano per alcune parti della proteina denominate "Nucleotide Binding Fold" e "Regulatory Domain".

Mutazioni CF sono state trovate anche in altre malattie, come l'assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD), che comporta infertilità da azoospermia nei maschi, le bronchiectasie disseminate o la pancreatite cronica.

## **1. Lo sviluppo di nuove tecnologie per l'analisi di mutazioni CFTR**

Nel corso degli ultimi 10 anni, lo sviluppo di tecnologie avanzate per l'identificazione di mutazioni è stata estremamente produttiva, con la messa a punto di tecniche potenti come la "Polymerase Chain Reaction (PCR)", la tecnica "Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)", le scissioni chimiche ed enzimatiche, la "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)", e più recentemente la "Denaturing Ion-paired Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC)". La tecnica ideale per l'identificazione di mutazioni richiede di essere sensibile (assenza di risultati falsi negativi *ndr*), specifica (assenza di risultati falsi positivi *ndr*) e robusta. La tecnica DGGE è stata probabilmente la tecnica più potente a disposizione per l'identificazione di mutazioni puntiformi (in genere quelle che interessano un singolo aminoacido della catena proteica *ndr*) ma essa richiede molto tempo. Questa è la ragione per cui noi abbiamo sviluppato la tecnica D-HPLC, che permette la separazione di "homoduplexes" da "heteroduplexes" nelle molecole di DNA in doppia elica. Noi abbiamo dimostrato che la sensibilità di questa tecnica è del 100%.

## **2. Le Classi di mutazioni CFTR**

Questo nuovo mezzo migliora fortemente il tasso di rivelazione delle mutazioni, permettendo di assegnare i genotipi (la base genetica della malattia *ndr*) ad una di cinque classi di mutazioni, sulla base dei risultati dell'analisi molecolare. Le mutazioni di Classe 1 compromettono la biosintesi della proteina. Ci si aspetta che il 50% delle mutazioni CFTR impedisca una appropriata sintesi di proteina normale: sono queste le cosiddette mutazioni "non senso" o "stop", le mutazioni "frameshift" (che modificano la struttura del gene *ndr*) o quelle che determinano un accoppiamento aberrante di RNA messaggero ("mis-splicing"). Questa classe di mutazioni include i fenotipi (espressione clinica della malattia *ndr*) più severi, in causa dell'assenza di proteina sintetizzata. La più comune di queste mutazioni è la G542X (nel Veneto e Trentino-Alto Adige è assai frequente la mutazione R1162X *ndr*). Alcune mutazioni di Classe 1 comportano peraltro anche alcuni tra i fenotipi meno gravi: sono le mutazioni precedentemente incluse nella classe 5, dovute a "mis-splicing", che consentono peraltro la produzione di una piccola quantità di proteina CFTR normale.

Una possibile via per correggere una mutazione di classe 1 sarebbe la sua sostituzione con una tecnica di terapia genica. Inoltre, studi recenti hanno mostrato che l'aggiunta di

antibiotici aminoglicosidi (es. gentamicina) potrebbe sopprimere alcuni codoni "stop" (piccole porzioni di DNA che comandano l'interruzione di sintesi della catena proteica *ndr*) e un trattamento sistemico con gentamicina nei pazienti CF potrebbe determinare un piccolo incremento della secrezione di cloro dipendente da CFTR.

Le mutazioni di Classe 2 determinano un alterato sviluppo della proteina pur sintetizzata, che porta in definitiva ad una mancanza di proteina funzionante a livello di membrana cellulare. Alcune delle cosiddette mutazioni "missense" (che comportano nella proteina la sostituzione di un aminoacido con un altro *ndr*) e la mutazione DF508 sono incluse in questa classe. La mutazione DF508 determina un alterato avvolgimento ("misfolding", alterata conformazione spaziale della proteina *ndr*) e pertanto una errata collocazione nella cellula della proteina matura. Il "misfolding" di questa proteina mutante porta alla sua degradazione selettiva ad opera del sistema di controllo di qualità della cellula. La terapia per le mutazioni di classe 2 richiederebbe farmaci con la capacità di aumentare i livelli di proteina funzionante, anche parzialmente, sulla membrana cellulare.

Le mutazioni di Classe 3 colpiscono la regolazione (apertura e chiusura *ndr*) del canale del cloro. La proteina è correttamente trasportata alla membrana cellulare ma poi non risponde alla stimolazione da parte di AMP ciclico. Queste mutazioni, localizzate a livello delle frazioni di proteina denominate "nucleotide binding fold" compromettono probabilmente il legame dell'ATP per l'attivazione del canale. La G551D è il prototipo di tali mutazioni. Ci si può aspettare che la terapia per queste mutazioni debba richiedere una attivazione della proteina CFTR parzialmente funzionante che è presente sulla membrana cellulare.

La Classe 4 include mutazioni che consentono un corretto trasporto alla membrana cellulare di una proteina CFTR che risponde agli stimoli di attivazione ma che genera una ridotta corrente di cloro.

L'ultima classe, la Classe 5, recentemente proposta, comprende mutazioni di stabilità proteica, che comportano una proteina mancante degli ultimi 70-98 aminoacidi nella regione terminale C. L'analisi del processo di biosintesi ha dimostrato che gli ultimi 82 aminoacidi non sono essenziali per lo sviluppo di conformazione della proteina ma l'emivita della CFTR troncata è ridotta di 5-6 volte.

Ci si può aspettare per i futuri approcci terapeutici che vengano probabilmente disegnate nuove molecole, dirette allo specifico difetto molecolare della proteina CFTR che sta alla base e che la determinazione del preciso genotipo sia critica nella scelta di tale terapia.

### **3. Lo screening neonatale CF**

Negli anni passati noi abbiamo anche dimostrato la fattibilità dello screening neonatale in Bretagna, impiegando un protocollo a due gradini che combina l'analisi IRT (tripsina immuno-reattiva *ndr*) con l'analisi di mutazioni CFTR. Le analisi di IRT e di mutazioni possono essere fatte utilizzando piccolissimi campioni di sangue essiccato sulla stessa carta da filtro. Questo approccio analitico è utile in ogni popolazione che presenti la maggior parte delle mutazioni attualmente conosciute.

#### **4. Malattie associate a CFTR**

Gli individui con CBAVD (atresia bilaterale congenita dei vasi deferenti – infertilità maschile *ndr*) portano frequentemente mutazioni nel gene CFTR ma non mostrano abitualmente le classiche manifestazioni CF. Circa il 70% dei pazienti con CBAVD hanno una mutazione e il 15% ne posseggono due. La proporzione di pazienti con CBAVD che hanno l'allele 5T (una particolare mutazione "intronica" che porta alla mancanza dell'intero esone 9 nell'RNA messaggero e quindi impedisce in larga misura, ma non completamente, la sintesi di CFTR normale *ndr*) è 5-6 volte più alta che nella popolazione normale. I pazienti CBAVD non hanno in genere malattia polmonare poiché essi conservano comunque una certa quantità di RNA messaggero CFTR normale nel tessuto polmonare .

Più recentemente si è trovato che anche la pancreatite cronica è associata a mutazioni nel gene CFTR e diversi studi hanno riportato una frequenza variabile tra il 20% e il 30% di mutazioni CFTR nei casi di pancreatite cronica sporadica.

---

La fibrosi cistica è un disordine complesso associato ad uno spettro ampio e complesso di manifestazioni cliniche. Il tipo di mutazioni nel gene CFTR è con chiarezza direttamente legato al fenotipo clinico CF per quanto riguarda la funzione pancreatica (ma non altrettanto per la funzione polmonare *ndr*) . La conoscenza del difetto molecolare associato al gene CFTR ha fortemente migliorato la nostra attitudine a fare una diagnosi clinica corretta ed un corretto accertamento di fibrosi cistica. I nuovi mezzi molecolari finora sviluppati hanno molto migliorato la consulenza genetica per la fibrosi cistica, lo screening neonatale, la diagnosi prenatale e noi ci aspettiamo per il prossimo futuro che la fisiopatologia della CF sia chiarita e che nuove terapie siano proposte per curare definitivamente questa malattia, grazie alla scoperta del gene CFTR.

#### **Riferimenti bibliografici**

*Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the Cystic Fibrosis Gene : Genetic analysis. Science, 1989, 245:1073-1080.*

*Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989, 245:1066-1073.*

*Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. Science, 1989, 245:1059-1064.*

Ferec C, Audrezet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quere I, Verlingue C. Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nature Genetics*, 1992, 1, 188-191.

Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (ed. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle) New York, McGraw Hill, 1995, 3:3799-3876.

Scotet V, De Braekeleer M, Roussey M, Rault G, Parent P, Dagonne M, Journel H, Lemoigne A, Codet JP, Catheline M, David V, Chaventre A, Dugueperoux I, Verlingue C, Quere I, Mercier B, Audrezet MP, Ferec C. Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis. *Lancet* 2000, 356 (9232) : 789-794.

Chen JM, Cutler C, Jacques C, Boeuf G, Denamur E, Lecointre G, Mercier B, Cramb G, Ferec C. A combined analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: implications for structure and disease models. *Mol Biol Evol* 2001, 18 (9) : 1771-1788.

Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Raguenes O, Langonne S, Ferec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001, 108 (4) : 290-298.

Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C, Ruzniewski P, Robaszkiewicz M, Raguenes O, Quere I, Scotet V, Ferec C. Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2002, 10 (2) : 100-106.

Tsui LC Cystic Fibrosis Mutation Database. 2002, <http://www.genet.sickkids.on.ca>.





## Prof. Pamela Zeitlin

Professore di Pediatria, Direttore della Divisione "Eudowood" di Scienze Respiratorie Pediatriche  
The Johns Hopkins University Hospital  
Baltimora – Stati Uniti d'America

*La prof.ssa Zeitlin ha avuto una formazione composita in medicina, biologia e biologia cellulare presso le Università statunitensi di Stanford e Yale.*

*Docente di Pediatria presso la Johns Hopkins University School di Medicina in Baltimora, componente del board editoriale di due prestigiose riviste mediche, Pediatric Research e Respiratory Research, dirige oggi la divisione di scienze respiratorie pediatriche presso l'Ospedale Johns Hopkins di Baltimora ed assiste presso lo stesso ospedale pazienti con fibrosi cistica.*

*La sua attività di ricerca di maggior rilievo comprende studi sul trasporto ionico di membrana, con particolare riguardo ai canali alternativi per il cloro e alla funzione di maturazione conformazionale della proteina CFTR, ma soprattutto studi mirati a terapie innovative dirette al difetto di base della CF: tra questi vi sono importanti ricerche su un nuovo vettore virale "adeno-associato" (AAV) per la terapia genica, ricerche sull'effetto ristoratore della funzione CFTR da parte di nuovi farmaci, sperimentati in parte anche sull'uomo, come il fenilbutirato e i bioflavonoidi, oppure farmaci attivi sui canali alternativi del cloro, ma anche su un nuovo peptide antimicrobico, la duramicina.*



### LE TERAPIE MIRATE AL DIFETTO DI BASE DELLA FIBROSI CISTICA

**con particolare riguardo alle ricerche in campo di terapia genica**

La prof.ssa Zeitlin offrirà una panoramica delle terapie potenzialmente utili a correggere il difetto di base della CF, sulle quali ha investito molto della sua attività di ricerca e di divulgazione scientifica negli ultimi anni. Tuttavia questo sommario si riferisce soltanto alle conoscenze sviluppate con l'impiego di un nuovo vettore virale, il virus adeno-associato (AAV).

***La terapia genica della fibrosi cistica: abbiamo fatto qualche progresso da quando il gene è stato identificato?***

Fin quasi dal momento in cui il gene CFTR fu identificato, sequenziato e pubblicato nel

1989, gli scienziati medici avevano predetto che la guarigione della malattia tramite terapia genica poteva essere raggiunta. Una serie di differenti vettori genici furono disegnati e testati, ma pochi di essi sono sopravvissuti alle sperimentazioni pre-cliniche e a quelle cliniche iniziali, dette di fase 1. L'obiettivo è quello di raggiungere un trasferimento stabile alle cellule epiteliali delle vie aeree e con un adeguato livello di espressione di CFTR normale. Si è assunto che livelli maggiori del 10% di CFTR normale dovrebbero essere sufficienti a correggere le proprietà elettriche dell'epitelio delle vie aeree (1). Sfortunatamente rimangono significative barriere contro una efficace terapia genica per la fibrosi cistica.

Vi sono due differenti sistemi di somministrazione del vettore che hanno avuto qualche successo nelle prime sperimentazioni cliniche: i liposomi cationici non virali e il virus adeno-associato sierotipo 2 (AAV2). La mia conversazione sarà focalizzata sul vettore virale AAV2.

### ***Il vettore virale adeno-associato (AAV2) per la terapia genica CF***

L'AAV2 fu scoperto per la prima volta come un "contaminante" nelle colture cellulari di adenovirus e per la prima volta identificato nell'uomo durante un'epidemia di infezione da adenovirus (2). Non si sono visti sintomi di malattia associati direttamente all'AAV e questo sembra pertanto essere un virus innocuo. L'AAV è un "dependivirus" (virus dipendente *ndr*) della famiglia dei parvovirus. Esso manca della capacità di replicazione, il che significa che esso deve contare su funzioni aggiuntive da parte di virus di supporto (helper virus) per poter riprodursi. Le funzioni di helper virus possono essere fornite sia da un adenovirus che da un herpesvirus. Questo consente un teorico margine di sicurezza, poiché un vettore genico virale AAV2 puro non può replicarsi nell'epitelio respiratorio umano. L'AAV è molto piccolo, circa 20 nM (nanometri), e contiene appena due geni virali, *rep* e *cap*. Questi geni possono essere rimossi e sostituiti con il cDNA che si vuole impiegare per il trasferimento genico.

L'AAV2 selvaggio, dotato di *rep* e *cap*, si integra preferibilmente a livello del sito AAVS2 nel genoma umano (3). Questa integrazione appare essere sicura (senza effetti biologici dannosi *ndr*) e può avvenire con copie multiple del virus. Il virus integrato appare anche essere in equilibrio stabile con le forme episomiche (extra-cromosomiche) del virus. Anche l'AAV2 ricombinante con CFTR cDNA (il virus in cui è stata inserita la sequenza DNA del gene CFTR *ndr*) si integra, ma il sito S2 non è più quello privilegiato (4). Le copie episomiche appaiono essere stabili e dominanti rispetto alle copie integrate in colture cellulari. Questa combinazione di copie integrate ed episomiche pare conferire espressione persistente del gene, che raggiunge il suo picco a 28 giorni e può durare per mesi, in dipendenza dalla riserva di tessuto disponibile e dalla natura del cDNA inserito nel vettore.

La Targeted Genetics Corporation, Seattle WA USA, ha sviluppato il vettore genico tgAAVCF. Questo vettore usa le sequenze ITR come promotore e il cDNA umano CFTR in tutta la sua lunghezza.

Il primo studio clinico cominciò alla Johns Hopkins School of Medicine testando il tgAAVCF con somministrazione nasale e bronchiale. 25 soggetti ricevettero una dose singola secondo un protocollo "dose finding" (basato sulla ricerca della dose utile e sicura *ndr*)

che dimostrò sicurezza e trasferimento del gene. Non ci fu invece consistente evidenza di espressione del gene (attività del gene con produzione di RNA messaggero *ndr*) attraverso l'analisi RT-PCR. Un secondo studio clinico fu condotto presso l'Università di Stanford sui seni paranasali, impiegando sia la dose singola che la dose ripetuta (5). Furono studiati 25 soggetti e venne dimostrata sia la sicurezza della somministrazione che il trasferimento genico nel lungo termine. Si ottenne indicazione di efficacia in base al reperto di un minor numero di episodi di sinusite nei seni trattati con il vettore genico rispetto a quelli trattati con placebo.

Uno studio con singola dose per via aerosolica fu in seguito condotto negli USA nell'ambito del "Cystic Fibrosis Therapeutics Network". Un totale di 16 soggetti ricevettero per nebulizzazione sia il placebo che il farmaco in studio. Fu dimostrata sia la sicurezza della somministrazione che l'effettivo trasferimento genico. Recentemente è stato completato nell'ambito dello stesso Network un trial clinico di fase II per via aerosolica con dose ripetuta. Tre dosi alla distanza di un mese hanno portato ad un significativo miglioramento della FEV1 un mese dopo la prima dose, in comparazione con il placebo. Circa allo stesso tempo le concentrazioni di IL-8 (interleukina-8, sostanza ad effetto infiammatorio *ndr*) nello sputo provocato si sono abbassate. Questo effetto era meno pronunciato un mese dopo la seconda dose. Nonostante tutto, questi risultati sono incoraggianti ed ora si sta allestendo un trial clinico di follow-up in un più largo gruppo di pazienti.

### ***Le barriere che ostacolano una efficace terapia genica***

L'epitelio delle vie aeree possiede recettori a livello di membrana cellulare che legano i capsidi (involucro a tentacoli *ndr*) del vettore AAV2. I recettori usati da AAV sierotipo 2 sono concentrati sulla membrana basolaterale delle cellule. Questo riduce l'efficienza di un vettore somministrato per aerosol alla membrana cellulare che guarda il lume bronchiale (membrana apicale). Una volta che il virus sia internalizzato nella cellula, esso deve viaggiare verso il nucleo ed entrare nel nucleo. Sembrano esservi delle limitazioni all'efficienza di questo trasporto. Nel nucleo, il destino più comune del virus è la costituzione di un episoma (minuto corpuscolo al di fuori dei cromosomi *ndr*), tuttavia una frazione di genomi virali può integrarsi con il genoma della cellula ospite secondo modalità random (a caso). Le vie aeree CF sono ostruite a causa di infezione ed infiammazione. Le proteasi (enzimi che agiscono sulle proteine, liberati dai leucociti o dai batteri *ndr*) possono contrastare l'efficacia del trasferimento genico attaccando le proteine del capsido virale. Anticorpi neutralizzanti il capsido sono stati trovati negli studi clinici sull'uomo e questi appaiono aumentare con la ripetizione delle dosi. La risposta immunitaria potrebbe in definitiva limitare l'utilità di ripetere le somministrazioni.

Tra gli approcci rivolti a migliorare la terapia genica con AAV vanno annoverati l'impiego di sierotipi AAV alternativi che siano in grado di riconoscere recettori della membrana apicale, farmaci costituiti da piccole molecole che siano in grado di migliorare il trasporto di AAV al nucleo, il pretrattamento con antiproteasi ed antibiotici per ripulire le vie aeree prima della somministrazione, la pseudotipizzazione del vettore per consentire somministrazioni ripetute nonché la soppressione immunitaria transitoria, fatta al momento della somministrazione del vettore.

## Riferimenti bibliografici

1. Johnson,L.G. et al. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 2, 21-25 (1992).
2. Berns,K.I., Pinkerton,T.C., Thomas,G.F. & Hoggan,M.D. Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 68, 556-560 (1975).
3. Samulski,R.J. et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10, 3941-3950 (1991).
4. Kearns,W.G. et al. Recombinant AAV vectors demonstrate episomal expression in immortalized human bronchial epithelial cells. *American Society of Human Genetics* 55, A225 (1994).
5. Wagner,J.A. et al. A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 9, 889-909 (1998).



*fondazione per la ricerca  
sulla fibrosi cistica - onlus*

Sede: Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona  
Tel. 045 8073604 - Fax 045 8073568  
e-mail: [fondazione.ricercafc@azosp.vr.it](mailto:fondazione.ricercafc@azosp.vr.it)