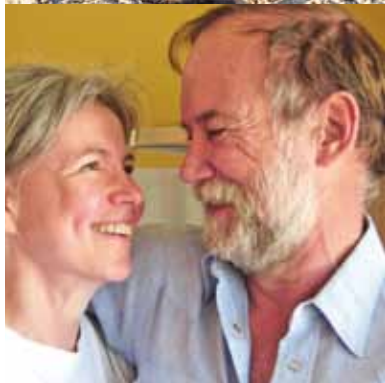




Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
fibrosicisticaricerca.it



XVIII SEMINARIO DI PRIMAVERA UNA CURA PER TUTTI



VERONA, SABATO 30 MAGGIO 2020

In collaborazione con



**Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata
Verona**



Main partner



In collaboration with



Redazione:

Gianni Mastella, Graziella Borgo, Stefania Chignola

Grafica e impaginazione:

Porpora ADV di Michela Chesini

Stampa:

Maggio 2020, Gruppo Sinergia Srl



**Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus**
fibrosicisticaricerca.it

XVIII SEMINARIO DI PRIMAVERA

Sviluppi della Ricerca in Fibrosi Cistica

UNA CURA PER TUTTI

**Contributi per un bilancio di ricerca FC
proiettato al futuro**

VERONA, SABATO 30 MAGGIO 2020

Sommario

PRESENTAZIONE	5
<i>Prof. Gianni Mastella</i>	
PANDEMIA COVID-19	
Quanto è cambiata la nostra vita e quanto cambierà a causa della pandemia Covid-19	6
<i>Dott. Roberto Buzzetti</i>	
I NUOVI FARMACI PER LE MUTAZIONI CFTR TRATTABILI	
1. Stato della Ricerca internazionale	7
<i>Prof. Cesare Braggion</i>	
2. Contributi della Fondazione Ricerca FC (FFC) alle terapie con modulatori della proteina CFTR	12
<i>Prof. Gianni Mastella</i>	
MOLTI ANCORA SONO IN ATTESA	
1. Stato degli studi internazionali su terapie per mutazioni CFTR "orfane"	16
<i>Dott. Laura Minicucci</i>	
2. Il contributo della ricerca FFC per terapie mirate a mutazioni "orfane"	21
<i>Dott. Graziella Borgo</i>	
LE STRATEGIE DI CURA PRIMA E DOPO I NUOVI FARMACI MODULATORI DELLA PROTEINA CFTR	
1. Le strategie di cura che hanno cambiato la storia della fibrosi cistica	25
<i>Prof. Giuseppe Magazzù</i>	
2. Contributi recenti della ricerca FFC alle strategie di cura tradizionali	29
<i>Dr. Graziella Borgo</i>	
IL FUTURO: LA FIBROSI CISTICA CHE MALATTIA SARÀ?	33
<i>Prof. Carlo Castellani</i>	
LA RICERCA FFC OLTRE IL CORONAVIRUS	
Linee per un piano strategico triennale (2021-2023)	39
<i>Prof. Gianni Mastella</i>	



Presentazione

Da 20 anni, questa Fondazione per la Ricerca in Fibrosi Cistica si è data la missione di promuovere in Italia un percorso rivolto ad inserire nel quadro internazionale contributi e proposte di ricerca che integrassero conoscenze già acquisite o in corso di elaborazione, per contribuire ad un destino migliore per le persone con fibrosi cistica. Grazie ad uno sforzo congiunto di ricerca e di qualificazione dell'intervento sanitario, la storia di questa malattia e di chi ne è colpito è sostanzialmente cambiata.

I 18 Seminari di Primavera che questa Fondazione ha finora organizzato hanno tracciato l'articolazione e lo sviluppo di questo percorso, che ha raggiunto oggi un livello di incoraggiante prospettiva solo immaginato (o sognato) fino a 20 anni orsono.

Il 18° Seminario è rivolto a chiunque, in varia misura e con ruoli diversi, è coinvolto nei problemi della fibrosi cistica, in particolare a coloro che ne sostengono l'impegno di ricerca scientifica. Esso intende fare il punto, a grandi linee, sui livelli cui siamo arrivati e sulle sfide che ci attendono nel prossimo futuro. E intende farlo partendo da un rapido sguardo sulla situazione di emergenza che caratterizza questo momento, la pandemia Covid-19, che sta ponendo nuove sfide alla ricerca scientifica e all'azione sanitaria e non sarà indifferente anche per tutto ciò che riguarda il mondo della fibrosi cistica.

Coloro che hanno elaborato gli appunti che seguono e ne daranno sintesi nel Seminario in streaming del 30 maggio, sono medici con una lunga storia di impegno primario nella cura alle persone con fibrosi cistica, congiunto a quello di un investimento formativo continuo per la comunità dei professionisti italiani attivi in questo campo e a significativi interventi di ricerca clinica. Essi sono entrati recentemente a far parte organica e attiva di questa Fondazione, che rivolge loro un segno di forte riconoscenza per lo spirito, le idee e il tempo che hanno deciso di dedicare alla comune Causa.

Gianni Mastella
(Direttore Scientifico Fondazione Ricerca FC)



QUANTO È CAMBIATA LA NOSTRA VITA E QUANTO CAMBIERÀ A CAUSA DELLA PANDEMIA COVID-19

Dott. Roberto Buzzetti

Epidemiologo, Statistico medico, Bergamo

Su questo tema molti si sono già espressi e c'è dunque il rischio di ripetere per l'ennesima volta un ritornello già sentito. A noi basterà qui riflettere sull'ondata di incertezza che ci ha investiti: da dove arriva questo virus? Come si trasmette? Gli asintomatici sono contagiosi? Il virus vive nell'aria? Quanto resiste fuori dal corpo? Quando una persona è contagiosa? Perché colpisce così tanto gli anziani? Perché i bambini si ammalano di meno? Perché le donne si ammalano di meno? Quali farmaci sono utili? Quando il vaccino? Perché non mi fanno il tampone? Sono utili i test sierologici? Se sono positivo al test sierologico, sono immune? Quanto dura l'immunità? Quando finirà? Come ne usciremo? E dal punto di vista economico, politico, sociale, psicologico...?

E poi il nuovo dizionario fatto di *lockdown*, *smart-working*, assembramenti, mascherine, fase 2, "non abbassiamo la guardia"; un nuovo gergo virologico, immunologico, epidemiologico, e poi sociologico/economico (MES, Eurobond...), la scoperta di luoghi fin qui ignoti (Codogno, Alzano, Nembro...). E ancora le nuove abitudini, la riscoperta di attività nascoste o dimenticate e la perdita di altre attività usuali. Tutto questo per una cosa che non si può neppure considerare un essere vivente, ma piuttosto una scatoletta rotonda con un po' di "spine" (le proteine *spike* con cui si attacca alle cellule), una scatoletta avvelenata di dimensioni ridottissime: se immaginiamo di ingrandire centomila volte una nostra cellula "media" (10-20 micron), questa avrebbe un diametro di 1-2 metri. Una cellula batterica, ad esempio uno *Pseudomonas*, avrebbe allora le dimensioni di un'anguria, e un Coronavirus sarebbe grande come una ciliegia... (continuando, un alveolo polmonare avrebbe un diametro di una trentina di metri e l'uomo o la donna di cui la nostra cellula fa parte sarebbero lunghi 170-180 chilometri). Quando veniamo investiti da una ondata (migliaia? milioni?) di queste scatolette, nel migliore dei casi (bassa quantità e buon funzionamento dell'immunità immediata) esse provocano soltanto un'infezione delle alte vie respiratorie; se invece l'ondata è molto forte e il sistema immunitario un po' debole (come negli anziani), le scatolette arrivano negli alveoli polmonari

e scatenano una reazione addirittura "eccessiva" (*"tempesta citochinica"*) che non fa che peggiorare il quadro, insieme con il danno ai piccoli vasi sanguigni e la "cascata coagulativa" che si traduce in una coagulazione all'interno dei polmoni, con esito spesso letale.

Ma i malati di fibrosi cistica, come stanno vivendo questo momento così particolare? All'inizio della pandemia si erano diffuse opinioni preoccupate, se non addirittura allarmistiche, sui rischi per i malati CF, molti dei quali, come sappiamo, non sono purtroppo in condizioni brillanti dal punto di vista polmonare. A tutt'oggi però [mentre scriviamo, fine aprile] non sembra di cogliere gravi problemi. Questo potrebbe dipendere da vari fattori:

- La persona con FC è già abituata alla superinfiammazione e spesso è in terapia antinfiammatoria.
- Ha un'età decisamente più giovane della media della popolazione generale. Applicando ai malati FC i tassi di incidenza e di letalità da COVID per classi di età riscontrate nella popolazione generale, ci attenderemmo, a fine aprile, 6 casi e 0,049 decessi tra tutti i soggetti FC italiani!
- Conosce già molto bene le misure per prevenire il contagio. Mascherina, disinfezione delle superfici, lavaggio delle mani, distanziamento e altro fanno già parte della sua vita quotidiana. Questo insieme di misure potrebbero, se non annullare il rischio di essere contagiati da COVID, quantomeno ridurre l'entità (carica virale).
- Forse può essere favorito da alcune vaccinazioni routinariamente eseguite, come l'antinfluenzale.
- ... altro...? Lo sapremo tra qualche tempo.

Dal punto di vista psicologico, il malato FC è poi senz'altro abituato a vivere l'incertezza nella quotidianità e nella sua idea di futuro. E infine, la ricerca. A metà aprile nel mondo erano già in corso oltre 650 studi su COVID, ma nessuno di questi riguardava la fibrosi cistica. Ci auguriamo in ogni caso che questa enorme mole di studi, che certo non si fermerà presto, possa contribuire a portare qualche chiarimento utile anche ai nostri malati FC, come ad esempio i rapporti tra proteina CFTR, recettori cellulari, infiammazione e attecchimento dell'infezione virale.



I NUOVI FARMACI PER LE MUTAZIONI CFTR TRATTABILI

1. Stato della Ricerca internazionale

Prof. Cesare Braggion
Ospedale "Meyer", Firenze

Dopo che nel 2011 è stato approvato il primo dei farmaci modulatori della proteina CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), il Kalydeco®, per la correzione del difetto prodotto dalle mutazioni di classe III, il 2019 ha segnato un passaggio importante, l'approvazione negli USA del Trikafta®, una triplice combinazione di modulatori per correggere il difetto della mutazione F508del, la più frequente della fibrosi cistica (CF). Entrambi questi farmaci hanno dimostrato nei trials clinici registrativi di fase III sia un effetto positivo sulla funzione della proteina CFTR che una buona efficacia clinica (1-4).

La ricerca di base: il metodo

Occorre ricordare che questo filone di ricerca, rivolto a correggere la proteina CFTR difettosa nella FC, si è avvalso di una lungimirante strategia della ricerca di base, quella dello "screening su larga scala" (*high-throughput screening*), finalizzata ad accorciare i tempi per l'identifi-

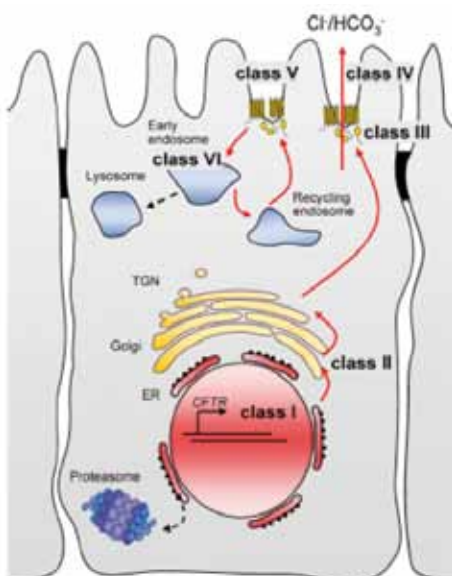
cazione di farmaci incisivi sul difetto di base. Un sistema robotizzato consente infatti di fare dei saggi su cellule *in vitro* per dimostrare se l'aggiunta di un composto riesce ad attivare il trasporto di ioni attraverso la proteina CFTR, che funziona come canale a livello della membrana cellulare (5).

È stato così possibile fare il saggio *in vitro* su centinaia di migliaia di piccole molecole per identificare quelle più promettenti sul piano terapeutico, successivamente perfezionate per diventare farmaci con il miglior profilo di efficacia e sicurezza. Sono state così identificate diverse molecole, che agiscono su difetti diversi della proteina CFTR e che dipendono a loro volta dal tipo di mutazioni presenti nelle persone con FC.

Le mutazioni CFTR e la diversa azione dei modulatori sulla proteina CFTR mutata

La classificazione delle mutazioni sulla base del difetto prodotto sulla proteina CFTR aiuta a comprendere verso quali bersagli i farmaci sono indirizzati. La Figura 1 mostra i 6 diversi difetti della proteina CFTR prodotti dalle ri-

LE MUTAZIONI DEL GENE CFTR - CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE



Classe	Funzione CFTR	Esempi
I	Difetto sintesi	G542X
II	Difetto maturazione	F508del
III	Difetto apertura canale	G551D
IV	Difetto conduttanza canale	D1152H
V	Riduzione quantità	2789+5G>A
VI	Instabilità	Q1412X

Figura 1.

La figura a sx illustra una cellula con i suoi organuli. La proteina CFTR viene sintetizzata a livello del ribosoma e poi trasportata verso la membrana cellulare, dove funziona come un canale per il trasporto del cloro e bicarbonati. È indicata sulla destra la classificazione delle mutazioni del gene CFTR, che riporta lo specifico difetto della proteina CFTR per ciascuna classe di mutazioni.

spettive classi di mutazioni. La proteina CFTR svolge una funzione di canale del cloro e del bicarbonato, influenza il canale del sodio ed ha probabilmente altri effetti ancora poco noti. In sostanza, un difetto nel passaggio di ioni attraverso la membrana cellulare comporta un difetto di acqua sulla superficie delle cellule ed una riduzione del pH, responsabili a livello polmonare di un difetto di movimento delle ciglia, ciò che favorisce un ristagno di muco denso e poco idratato, da cui consegue il circolo vizioso infezione-infiammazione che caratterizza la malattia polmonare FC.

I farmaci deputati a correggere il difetto della proteina CFTR agiscono a diverso livello: i) aumento del tempo di apertura della proteina-canale sulla membrana cellulare o aumento della sua conduttività (*potenziatori*); ii) correzione della maturazione della proteina e del trasporto verso la membrana cellulare (*correttori*); iii) eliminazione dello stop prematuro nella sintesi della proteina (*rettificatori di stop*); iv) aumento della sintesi di proteina per favorire l'intervento di altri farmaci con meccanismi diversi (*amplificatori*); v) stabilizzazione della proteina CFTR sulla membrana cellulare (*stabilizzatori*).

È stato recentemente riconosciuto che la maggior parte delle mutazioni non si caratterizza per un solo difetto della proteina CFTR ma per una combinazione di difetti. Ad esempio, la mutazione più comune, la F508del, comporta un difetto di maturazione e trasporto verso la membrana cellulare, un difetto di apertura del canale ed una instabilità sulla membrana cellulare. Da ciò deriva che serve una combinazione di più farmaci diretti a correggere i diversi difetti.

Oltre a questa strategia terapeutica, che riconosce le quattro categorie di farmaci sopra descritte, la ricerca si sta rivolgendo anche alla correzione del difetto della proteina CFTR in modo indipendente dal tipo di mutazioni, ad esempio modificando direttamente il DNA o l'RNA (*editing* di DNA ed RNA) o portando nelle cellule un DNA (gene) normale (terapia di trasferimento genico). Questi ultimi filoni della ricerca sono ancora in una fase di sviluppo pre-clinico o nelle fasi iniziali della ricerca clinica.

Metodologia dei trial clinici che hanno validato gli attuali modulatori

Per comprendere e seguire il percorso che ha portato ai due principali farmaci mutazione-specifici, occorre soffermarsi brevemente sulla

ricerca clinica di fase III, che rappresenta l'ultimo step per arrivare all'impiego e alla commercializzazione di un farmaco. Per avere la conferma dell'efficacia e della sicurezza di un farmaco la ricerca clinica di fase III deve avere le seguenti caratteristiche, che si riassumono nel termine "trial randomizzato controllato" (RCT): i) arruolare diverse centinaia di persone affette dalla malattia, utilizzando definiti criteri di inclusione ed esclusione; ii) confrontare il farmaco in studio con il placebo, una sostanza inerte (controllo con placebo); iii) dividere con criterio "random" (casuale) le persone arruolate in due gruppi con caratteristiche simili, un gruppo in cui le persone assumeranno il farmaco, l'altro in cui assumeranno il placebo (randomizzazione); iv) impedire che sia le persone arruolate che i medici che li seguono nel percorso della ricerca siano a conoscenza di chi assume il farmaco e chi il placebo (doppio cieco); v) utilizzare delle misure di efficacia ben collaudate e semplici, il cui significato clinico e prognostico sia stato ben stabilito.

Come si misura l'efficacia

Tutti gli studi clinici in FC ed anche in questo specifico campo, utilizzano, come misure di efficacia, la spirometria ed il suo parametro principale, il FEV1 (Forced expiratory volume in 1 second, *volume espiratorio forzato al primo secondo*), il numero delle esacerbazioni polmonari ed i sintomi respiratori riferiti dalle persone con FC nonché la misura dello stato nutrizionale (rapporto peso corporeo/altezza al quadrato). La spirometria è ritenuta la misura di esito principale, perché è ben correlata alla prognosi. Per gli studi sui modulatori della proteina CFTR è stato introdotto, come marker biologico, la concentrazione del cloro nel sudore: oltre ad essere la misura su cui si basa la diagnosi di malattia, il cloro sudorale correla, in una certa misura, con la quantità di proteina CFTR funzionante presente nelle cellule e perciò differenzia la normalità (inferiore a 30 mmol/L) dalle condizioni di patologia cosiddetta "CFTR-associata" (30-60 mmol/L) e dalle forme di malattia con sufficienza digestiva (60-80 mmol/l) o con insufficienza digestiva (>80 mmol/L) (6).

Risultati dei trial clinici preliminari sui modulatori di CFTR

Per avere una visione d'insieme e la possibilità di confrontare i risultati dei trials di fase III, ho scelto di presentarli, raggruppandoli per ciascuna misura di efficacia (Figura 2). Questa semplificazione aiuta ad interpretare i risultati

dei trials, ma occorre anche considerare che i diversi progetti di ricerca possono presentare alcune differenze nel campione di soggetti reclutati. I due studi clinici che hanno utilizzato il Kalydeco®, il **potenziatore ivacaftor**, negli adolescenti ed adulti con mutazioni di classe III (ridotto tempodi apertura della proteina-canale) hanno dimostrato un aumento del FEV1 di circa 10 punti in % del valore predetto per l'età e per l'altezza, un miglioramento dei sintomi, una riduzione del rischio di esacerbazioni polmonari del 55% e, sorprendentemente, una riduzione del cloro sudorale di quasi 50 mmol/L, avvicinando il suo valore a quello della normalità (Figura 2) (1, 2).

La **combinazione del correttore lumacaftor e del potenziatore ivacaftor**, denominata Orkambi®, è stata sostituita da Vertex Pharmaceuticals con quella del correttore tezacaftor e del potenziatore ivacaftor, denominata Symdeko®, che ha dimostrato, rispetto alla prima combinazione, di non essere associata a sintomi respiratori all'avvio della terapia, ciò che ha limitato l'impiego di Orkambi®, come hanno mostrato anche gli studi nella vita reale (7). Entrambi i farmaci hanno dimostrato un'efficacia paragonabile negli omozigoti per la mutazione F508del, ma l'effetto clinico è stato inferiore rispetto a quanto ottenuto dal Kalydeco® nelle persone con mutazioni di classe III (1, 2, 8, 9). La Figura 2 mostra che il FEV1 era aumentato di circa 4 punti di percentuale predetta e che la riduzione del cloro sudorale

associata al Symdeko® era di soli 10 mmol/L (8, 9).

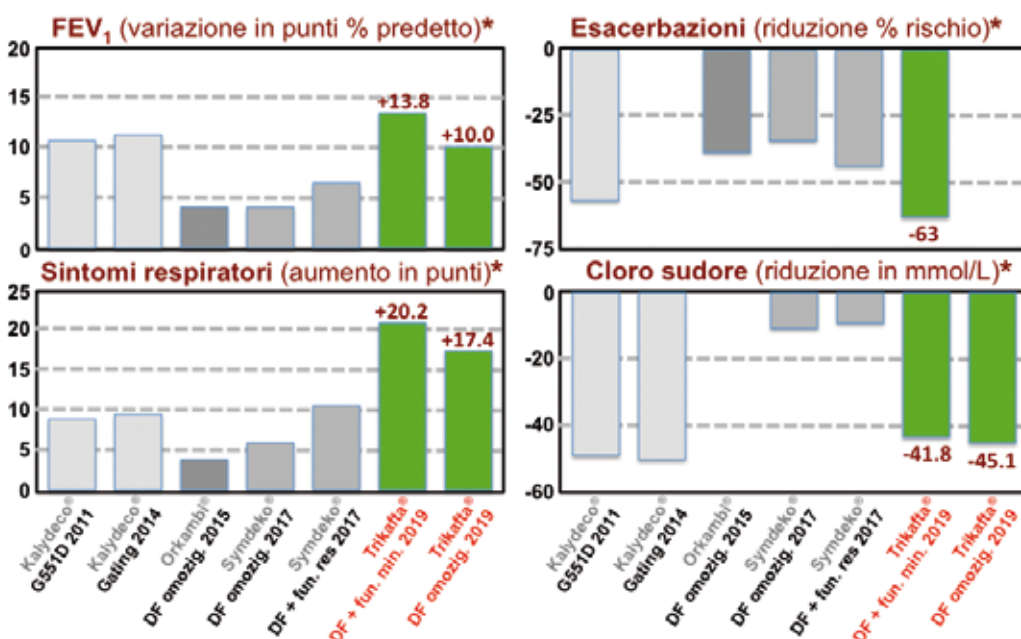
Questi studi di fase III, che hanno arruolato circa 1600 persone di età uguale o maggiore di 12 anni con la doppia mutazione F508del, non sono stati condotti in coloro che avevano una sola mutazione F508del, perché i farmaci erano risultati inefficaci negli studi di fase II in soggetti con una sola copia della mutazione. L'Orkambi®, oltre al Kalydeco®, è stato approvato anche in Italia e reso disponibile per gli adolescenti ed adulti con doppia mutazione F508del.

Risultati migliori rispetto ai soggetti omozigoti per la mutazione F508del sono stati ottenuti somministrando il Symdeko® nei soggetti eterozigoti composti per la mutazione F508del ed una mutazione a "funzione residua". Queste sono mutazioni associate a sufficienza digestiva e a un andamento clinico mediamente migliore rispetto a coloro che hanno mutazioni di classe I, II o III. Il FEV1 aumentava di quasi 7 punti di percentuale predetta in queste persone, i sintomi respiratori miglioravano di 11 punti, il rischio di esacerbazioni polmonari si riduceva del 46%, mentre la riduzione del cloro sudorale era ancora modesta e pari a circa 10 mmol/L (Figura 2) (10).

La triplice combinazione di modulatori CFTR

Gli studi in vitro hanno dimostrato che nelle cellule bronchiali con la mutazione F508del sia

RICERCA CLINICA: I PROGETTI DI FASE 3 - I risultati dei nuovi modulatori: Primavera 2020



* Le variazioni indicate tengono conto dell'effetto ottenuto con placebo (effetto del trattamento).

Figura 2.

Ciascuno dei 4 quadranti riporta le variazioni delle principali misure di efficacia registrate nei trials di ricerca clinica, indicati con il nome del farmaco modulatore della proteina CFTR utilizzato. In ciascun quadrante si possono confrontare i risultati ottenuti nei diversi trials: l'aumento del FEV1 e la riduzione del rischio di esacerbazioni in alto, l'aumento (miglioramento) del punteggio dei sintomi respiratori e la riduzione del cloro sudorale in basso. Kalydeco® e Trikafta® hanno ottenuto i migliori risultati clinici ed i migliori effetti sulla proteina CFTR (variazione del cloro sudorale).

in eterozigosi che in omozigosi si otteneva una correzione maggiore della funzione di canale della proteina CFTR se alla doppia combinazione (correttore di prima generazione più potenziatore ivacaftor) si aggiungeva un secondo correttore di nuova generazione, con bersaglio diverso rispetto a quello di lumacaftor e tezacaftor. La tripla combinazione di *elexacaftor*, *tezacaftor* ed *ivacaftor*, denominata Trikafta®, ha dimostrato una efficacia clinica ed una riduzione del cloro sudorale paragonabili a quelle ottenute con Kalydeco® nelle persone con una mutazione di classe III (Figura 2) (1-4).

Il Trikafta® è risultato inoltre ugualmente efficace sia nelle persone con la doppia mutazione F508del che in coloro che avevano una sola copia di mutazione F508del accompagnata ad una mutazione a cosiddetta "funzione minima", cioè associata a scarsa o nulla presenza di proteina CFTR sulla membrana cellulare (3, 4).

Il Trikafta® è stato approvato ed immesso in commercio negli USA nei soggetti di 12 o più anni di età, mentre si attende l'approvazione da parte dell'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) e delle agenzie dei rispettivi stati euro-

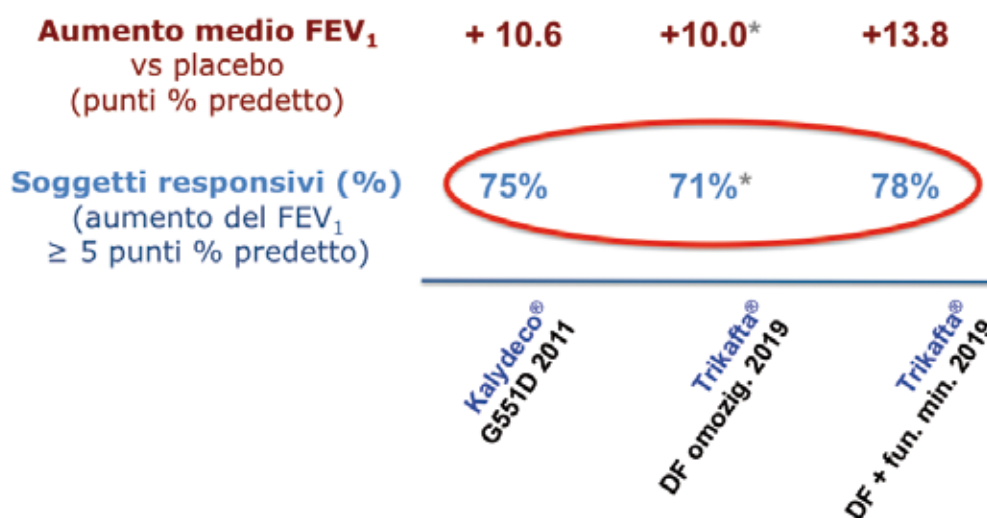
pei. E si attende anche dalla ricerca di valutare Trikafta in soggetti di età inferiore a 12 anni, fino ai neonati-lattanti.

Quesiti per il futuro sui modulatori risultati più efficaci

Kalydeco® e Trikafta® rappresentano un notevole avanzamento nella terapia della fibrosi cistica.

Occorre però tener conto di alcuni quesiti, che si possono porre per il prossimo uso di entrambi, considerando l'ambito clinico complessivo: i) Quali altri farmaci dovranno essere utilizzati nel 25% delle persone che hanno dimostrato nei trial di fase III una scarsa risposta clinica ai due farmaci (Figura 3)? ii) Si raggiungeranno nella vita reale e si manterranno inalterati nel medio-lungo periodo il guadagno del FEV1 di 10-15 punti e la riduzione del 50-60% del rischio di esacerbazioni polmonari, ottenuti nei trials regolatori di fase III di entrambi i farmaci? iii) Potranno essere ottenuti gli stessi benefici anche nei soggetti con malattia lieve o in quella avanzata? iv) Coloro che hanno una malattia epatica o che devono assumere farmaci che interagiscono con i due modulatori potranno

RICERCA CLINICA: I PROGETTI DI FASE 3 Funzione respiratoria (FEV₁): la variabilità di risposta



* l'aumento medio e il numero dei soggetti responsivi è relativo alla terapia con Symdeco. NEJM 2001; 365:1633 - Lancet 2019; 394:940 - NEJM 2019; 381:1809

Figura 3.

Sono riportati l'aumento medio del FEV1 e la percentuale di soggetti "responsivi" nei trials regolatori che hanno valutato il Kalydeco® nei soggetti con la mutazione G551D (classe III) ed il Trikafta®, sia negli omozigoti per la mutazione F508del che negli eterozigoti per F508del ed una mutazione a funzione minima. "Responsivi" sono considerati coloro, nei quali il FEV1 è aumentato di almeno 5 punti di percentuale predetta: si tratta di circa i 3/4 dei soggetti che hanno partecipato ai trials clinici per entrambi i farmaci.

assumere questi ultimi e con quali benefici? v) Potranno migliorare i due farmaci la digestione del cibo e la funzione endocrina del pancreas e perciò il metabolismo del glucosio? Quali implicazioni di rischio nelle donne con FC in gravidanza? Altri quesiti si possono trovare nelle altre relazioni di questo Seminario.

Conclusioni

Per ottenere una risposta a queste ed altre domande occorre pianificare una ricerca clinica di fase IV. Questa modalità di ricerca clinica non considera una popolazione omogenea e ben selezionata, come quella arruolata nei trials di fase III, ma tutte le persone in cura presso i centri italiani, ciascuna con la propria peculiare storia e caratteristiche della malattia. In questo contesto andranno verificati l'efficacia e la sicurezza di Kalydeco® e Trikafta®.

La ricerca di base e quella clinica dovranno poi saggiare i farmaci per una età inferiore ai 12 anni, identificarne e saggiarne di altri per quel 30% circa di persone, che hanno mutazioni diverse dalla F508del, dalle mutazioni di classe III e da quelle a funzione residua, e per quelle persone comunque non responsive a Kalydeco® e Trikafta®.

Riferimenti bibliografici

- Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011; 365:1663-72
- De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros* 2014; 13:674-680
- Heijerman HGM, McKOne EF, Downey DG, et al. Efficacy and safety of the elxacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019; 394:1940-1948
- Middleton PG, Mall MA, Drevinek P, et al. Elxacaftor-tezacaftor-ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *N Engl J Med* 2019; 381:1809-1819
- Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, et al. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 2005; 115:2564-2571
- Accurso FJ, Van Goor F, Zha J, et al. Sweatchloride as a biomarker of CFTR activity: proof of concept and ivacaftor clinical trial data. *J Cyst Fibros* 2014; 13:139-147
- Burgel P-R, Munck A, Durieu I, et al. Real-life safety and effectiveness of lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 11 October (doi:10.1164/rccm.201906-12270OC)
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015; 373:220-231
- Taylor-Cousar JL, Munck A, McKOne EF, et al. Tezacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* 2017; 377:2013-2023
- Rowe SM, Daines C, Ringshausen FC, et al. Tezacaftor-ivacaftor in residual function heterozygotes with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2017; November 3, doi:10.1056/NEJMoa1709847

Farmaci Modulatori CFTR a maggio 2020*
Indicazioni e stato delle approvazioni da parte di FDA, EMA, AIFA

	FDA (Food and Drug Administration)	EMA (European Medical Agency)	AIFA (Agenzia Italiana Farmaci)
Kalydeco®	<p>Approvato per pazienti ≥ 6 mesi di età e peso minimo 5 kg con almeno una copia delle seguenti mutazioni con difetto <i>gating</i>: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R o almeno una copia di mutazione con difetto di permeabilità R117H.</p> <p>Approvato per pazienti ≥ 6 mesi con almeno una mutazione nel gene CFTR che risponde a KALYDECO sulla base di dati clinici e / o di analisi in vitro.</p>	<p>Approvato per pazienti ≥ 6 mesi di età e peso minimo 5 kg con almeno una copia delle mutazioni con difetto <i>gating</i>: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R o almeno una copia della mutazione con difetto di permeabilità R117H (la fase della variante poli-T identificata con la mutazione R117H deve essere determinata in conformità alle raccomandazioni cliniche locali).</p>	<p>Approvato, prescrivibile dai centri FC con prescrizione di fascia C-NN●●● per i pazienti ≥ 1 anno, e approvato, prescrivibile da parte dei centri FC e rimborsabile da parte del SSN, per i pazienti ≥ 2 anni con almeno una copia delle seguenti mutazioni con difetto <i>gating</i>: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R.</p> <p>Approvato e prescrivibile da parte dei centri per i pazienti ≥ 18 anni con una copia della mutazione R117H; rimborsabile da parte del SSN solo se, per R117H, è stata determinata la fase della variante poli-T e risulta presente la variante T5</p>
Orkambi®	<p>Approvato per pazienti ≥ 2 anni omozigoti F508del</p>	<p>Approvato per pazienti ≥ 2 anni omozigoti F508del</p>	<p>Approvato, prescrivibile dai centri e rimborsabile dal SSN per pazienti ≥ 12 anni omozigoti F508del.</p> <p>Approvato e prescrivibile dai centri con prescrizione di fascia C-NN●●● in soggetti ≥ 2 anni omozigoti F508del.</p>
Symdeko® (USA e Canada) oppure Symkevi® (Europa)	<p>Nome commerciale SymdeKo</p> <p>Approvato per pazienti ≥ 6 anni omozigoti F508del; inoltre pazienti con una copia di F508del associata ad una delle seguenti 23 mutazioni con funzione residua (caratteristica comune la sufficienza pancreatica): A455E, E193K, R117C, A1067T, F1052V, R347H, D110E, F1074L, R352Q, D110H, G1069R, R1070Q, D579G, K1060T, R1070W, L206W, S945L, D1270N, P67L, S977F, E56K, R74W, D1152H; inoltre i pazienti con una copia di F508del associata ad una delle seguenti 5 mutazioni con funzione residua con difetto splicing: 711+3A→G, 3272-26A→G, E831X, 2789+5G→A, 3849+10kbc→T.</p> <p>Viene considerata indicata al trattamento anche una (non specificata) mutazione responsiva a tezacaftor / ivacaftor sulla base di dati in vitro ● e/o in base all'evidenza clinica ●●</p>	<p>Nome commerciale Symkevi</p> <p>Approvato per pazienti ≥ 12 anni omozigoti F508del. Approvato anche per pazienti ≥ 12 anni con una copia di F08del associata a una delle 10 seguenti mutazioni CFTR con funzione residua: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, S945L, S977F, R1070W, D1152H; approvato anche per pazienti ≥ 12 anni con una copia di F508del associata ad una delle seguenti 4 mutazioni con funzione residua e difetto splicing: 2789+5G→A, 3272-26A→G, 3849+10kbc→T, 711+3A→G</p>	<p>Nome commerciale Symkevi</p> <p>Disponibilità in classe C-NN●●●, secondo le indicazioni stabilite dall'EMA</p>
Trikafta®	<p>Approvato per il trattamento della fibrosi cistica in pazienti di 12 o più anni con almeno una copia della mutazione CFTR F508del</p>	<p>In attesa di approvazione</p>	<p>In attesa di approvazione</p>

* Le informazioni della tabella sono in evoluzione e suscettibili di cambiamenti.

- I dati in vitro sono quelli ottenibili attraverso il saggio del farmaco su modelli cellulari (colture di cellule epiteliali bronchiali primarie, modelli cellulari tridimensionali come organoidi) allo scopo di dimostrare su questi che il farmaco recupera e potenzia la funzione di CFTR mutata in esame; se il farmaco funziona sul modello cellulare ha altissima probabilità di funzionare nell'uomo
- Si intende come evidenza clinica la risposta positiva al farmaco valutata secondo parametri abituali in FC (principalmente FEV1, diminuzione infezioni respiratorie).
- Sono inclusi nella fascia C-NN (Non Negoziata) farmaci la cui erogazione deve essere valutata caso per caso, esclusivamente in presenza di apposita e chiara relazione del medico specialista prescrittore, supportata da idonea documentazione scientifica, opportunamente validata dal Direttore Sanitario della Azienda Sanitaria e/o Ospedale di cura di concerto con il Direttore Sanitario della Azienda Sanitaria territorialmente competente, e da cui si evinca, tra l'altro, l'indispensabilità del trattamento terapeutico e la mancanza di farmaci alternativi.

I NUOVI FARMACI PER LE MUTAZIONI CFTR TRATTABILI

2. Contributi della Fondazione Ricerca FC (FFC) alle terapie con modulatori della proteina CFTR

Prof Gianni Mastella

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona

Gli inizi e le ragioni di una linea di ricerca

La Fondazione, fin dall'inizio della sua attività di ricerca (2002) si è posta il problema di esplorare possibili vie per correggere il difetto di base della malattia, legato alle mutazioni del gene CFTR.

La spinta venne dai primi studi, agli inizi del 2000, sui correttori della proteina CFTR difettosa a causa della mutazione F508del (Galietta dell'Istituto Gaslini di Genova e Verkman dell'Università di California avevano identificato i primi potenziali correttori, che aprirono la strada a successivi avanzamenti, approdati, con successo, alla clinica negli ultimi anni). L'intento, fondato su ricerca di base, era quello di fornire alla comunità scientifica internazionale spunti di nuove conoscenze per comprendere meglio i meccanismi attraverso cui la proteina CFTR si conforma nel suo percorso verso la membrana apicale della cellula ed esplica la sua funzione. L'obiettivo era quello di individuare i bersagli e le molecole correttive più appropriati per un intervento di recupero della proteina difettosa, altrimenti destinata alla degradazione. Con la consapevolezza che i progressi in questo campo, che l'industria farmaceutica ha mezzi per portare a soluzioni cliniche, maturano attraverso i contributi di molti gruppi di ricerca, tra cui quelli che FFC ha promosso e sostenuto in questi anni.

I progetti FFC mirati a terapie del difetto di base della fibrosi cistica

Su questo fronte delle terapie del difetto di base la Rete di Ricerca FFC ha sviluppato in 18 anni 154 progetti (il 40% dei 393 progetti finora sostenuti), con risultati resi pubblici in quasi altrettante pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali. Vi hanno partecipato, in varia misura e in tempi diversi, quasi 40 gruppi di ricerca con più di 300 ricercatori.

L'investimento economico della Fondazione è stato complessivamente di circa 12 milioni di euro (il 40% delle risorse complessive investite in ricerca in questo periodo).

Occorre peraltro ammettere che l'impegno complessivo si è rivolto prevalentemente al recupero di funzione della proteina CFTR difettosa per la più comune mutazione F508del, rimanendo ancora preliminare l'approccio ad altri difetti di base, su cui FFC si propone di investire più decisamente nel prossimo futuro.

Nella tabella 1 sono indicati i temi di studio che hanno raggiunto livelli più maturi negli ultimi anni, anche se il percorso complessivo dei progetti di questo ambito è molto articolato, anche nella ricerca di tecniche e metodologie di studio che hanno rappresentato un supporto fondamentale in quest'area. Mi limiterò a riportare alcuni esempi, ricordando che la identificazione di nuovi bersagli molecolari potrebbe portare ad elaborare farmaci con caratteristiche di nuovi modulatori, competitivi con quelli già esistenti, ma anche coadiutori di modulatori di CFTR noti o di futura invenzione

Tabella 1. Studi FFC di base o pre-clinici più significativi in tema di modulatori CFTR

- Screening e ottimizzazione di nuovi correttori di CFTR - F508del.
- Identificazione di bersagli molecolari cui orientare i modulatori (su proteina mutata o su percorso di maturazione difettosa).
- Identificazione di amplificatori CFTR.
- Co-modulatori e stabilizzatori di CFTR.
- Effetti dei modulatori CFTR indipendenti dall'azione su CFTR.
- Modelli predittivi per "personalizzare" interventi modulatori.

Nuovi correttori di CFTR

Da segnalare due percorsi che hanno prodotto risultati di possibile rilevanza terapeutica.

Il primo è il progetto strategico *Task Force for Cystic Fibrosis* che, iniziato nel 2014, è giunto ad una fase avanzata di studio preclinico. Attraverso la metodica di *High Throughput Screening*, con cui si sono analizzate migliaia di piccole molecole di potenziale interesse, si è giunti ad identificare e ottimizzare un composto (ARN23765), la cui caratteristica è l'elevata potenza con cui riesce a ristabilire la funzione di CFTR-F508del su modelli cellulari di epitelio bronchiali di malati FC sottoposti a trapianto polmonare (1): l'effetto si ottiene *in vitro* a concentrazioni mille volte inferiori a quelle necessarie per altri correttori noti. Ora si sono completati con risultati positivi i primi studi preclinici su modelli animali, rivolti soprattutto a testare la sicurezza del composto: questi studi dovrebbero concludersi con saggi più completi per definire *in vivo* l'adeguatezza del composto ad assumere le caratteristiche di farmaco (assorbimento intestinale, livelli nel sangue e nei tessuti, metabolismo, durata d'azione, eliminazione, predizione del dosaggio più adeguato per l'uomo).

Tuttavia, si è attivato un percorso per realizzare possibili partnership con industrie farmaceutiche che dispongano di un correttore di seconda generazione che sinergizzi con ARN23765 e di un potenziatore, per ottenere una combinazione farmacologica di efficacia clinica almeno comparabile, ma possibilmente migliore, rispetto alle combinazioni di proposta recente.

Nel frattempo, un'altra linea di ricerca FFC (2) sta procedendo all'identificazione e ottimizzazione di correttori di seconda generazione, con effetto potenzialmente sinergico/additivo con ARN23765.

Nuovi bersagli molecolari cui indirizzare interventi curativi

Parecchi progetti stanno tuttora lavorando nella direzione di evitare che la proteina CFTR mutata venga degradata entro la cellula ad opera di particolari proteine. Un esempio significativo sono due proteine: la UBL (ubiquitin-ligasi), che riconosce la CFTR anomala e la fa eliminare, e la DUB (deubiquitinasi), che tende a contrastare tale processo (3). Agendo in modo diverso su questa o su quella si può salvare CFTR mutata per favorire l'azione dei correttori. Un altro esempio di possibile bersaglio sul percorso maturativo di CFTR è quello di inibire un'altra proteina, la ligasi RNF5, sempre implicata nel processo di de-

molizione di CFTR anomala, utilizzando inibitori noti o di nuova sintesi (inh-2) che già si sono rivelati efficaci su modelli di cellule bronchiali FC (4).

Identificazione di amplificatori di CFTR

Il tema riguarda la possibilità di ottenere più quantità di proteina CFTR mutata da offrire all'azione dei correttori e potenziatori di CFTR.

Già qualcosa si è mosso nella ricerca internazionale, anche con iniziali trial clinici. Siamo ai primi passi, che pur si mostrano promettenti. Si tratta nel nostro caso di agire correggendo lo *splicing* (il meccanismo di trascrizione del codice genetico dal gene al messaggero RNA [mRNA], per la sintesi della proteina CFTR). Alcune varianti del gene possono compromettere questo processo limitando la quantità di proteina recuperabile dai modulatori. Dati preliminari suggeriscono che sia possibile intervenire sui fattori limitanti lo *splicing* (es. varianti Poli-T e poli-Tg), ottenendo più CFTR disponibile per la correzione (5).

Co-modulatori e stabilizzatori di CFTR

La proteina CFTR, comunque recuperata alla membrana apicale della cellula, deve fare i conti con la sua sopravvivenza e quindi con la sua durata di azione: in sostanza deve raggiungere sufficiente stabilità.

Alcuni progetti FFC si sono posti questo problema con varie proposte. Un esempio è quello di intervenire, come coadiuvante di modulatori, con il ganglioside GM1, una molecola lipidica già in uso per altre patologie: GM1 è costitutivo della membrana cellulare, specie nell'area dove si colloca il canale CFTR, ma è alquanto ridotta la sua presenza nelle cellule FC. In esperimenti su cellule FC, GM1 si è mostrato in grado di proteggere e stabilizzare la proteina CFTR recuperata ad opera di correttori (6). In questo ambito si colloca un altro esempio, quello di un peptide (cortissima proteina) derivato dall'enzima PIK3gamma, normalmente deputato ad aumentare la concentrazione di cAMP, l'attivatore fisiologico del canale CFTR (7). La molecola, che ha dimostrato capacità sia di potenziatore che di correttore CFTR, potrebbe collocarsi come partner di rinforzo di modulatori attuali e futuri.

Effetti dei modulatori CFTR indipendenti dall'azione su CFTR

C'è una ipotesi per cui alcuni modulatori di CFTR possano avere rilevanza su bersagli diversi dalla CFTR stessa. Tra questi sta emergendo un'azione antibatterica diretta su *Stafilococcus aureus* e un effetto di potenziamento di antibiotici anti-*Pseu-*

domonas, ma anche un interessante impatto positivo sulle difese dell'ospite (8).

Modelli predittivi *ex vivo* per "personalizzare" interventi modulatori

Questa dei modelli predittivi sta sollecitando negli ultimi anni largo interesse nella ricerca FC. Si tratta di cellule dell'epitelio nasale o di quello intestinale, ottenibili con relativa facilità dagli stessi malati (per spazzolatura della mucosa nasale o per mini-biopsia di quella rettale).

Da cellule staminali (progenitrici di cellule mature) di questo materiale si possono anche ottenere dei mini-organoidi (organoidi) a struttura tridimensionale, sui quali cimentare interventi farmacologici o genetici: Il flusso di cloro e acqua generato dagli interventi curativi fanno rigonfiare queste strutture e l'entità di rigonfiamento ne testimonia l'efficacia. Parecchi progetti FFC hanno lavorato e stanno lavorando in quest'area, con possibili applicazioni di ricerca ma anche per testare su singole persone la possibile efficacia di modulatori indicati per mutazioni diverse da quelle del soggetto, teoricamente non responsive a quei farmaci (mutazioni "orfane") (9, 10).

Su tali mutazioni orfane si sta studiando con successo, anche con approccio fisiologico diretto su cellule epiteliali nasali e su cellule bronchiali da malati FC (11).

Conclusioni

I più recenti esempi di studio forniti, una piccola parte di un percorso di 18 anni, lasciano intendere l'ampio spettro di ricerca messo in atto da FFC e dalla sua Rete di Ricerca. Essi testimoniano, seppur incompiutamente, le premesse su cui impostare nuove strategie, aperte a sempre più larghe collaborazioni, con l'intento di offrire idee e supporto alle straordinarie innovazioni terapeutiche che si stanno affacciando in campo FC.

Riferimenti bibliografici

1. Pedemonte N, Bertozzi F, Caci E, et Al. Discovery of a picomolar potency pharmacological corrector of the mutant CFTR chloride channel. *Sci Adv.* 2020 Feb 21;6(8):eaay9669. *Sci Adv.* 2020 Feb 21;6(8):eaay9669
2. Spanò V, Musante I, Montalbano A, et Al. Towards the discovery of new correctors based on nitrogen heterocyclic systems. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 43-44
3. Musante I, Renda M, Venturini A, Galiotta LJV. Identification of deubiquitinases and ubiquitin ligases that affect mutant CFTR rescue. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 32-33
4. Tomati V, Sondo E, Armirotti A, et Al. Genetic Inhibition Of The Ubiquitin Ligase Rnf5 Attenuates Phenotypes Associated To F508del Cystic Fibrosis Mutation. *Sci Rep.* 2015 Jul 17;5:12138.
5. Duga S, Straniero L, Perriera R, et Al. Small molecules modulating splicing as novel CFTR amplifier drugs. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 36-37
6. Tamanini A, Loberto N, Mancini G, et Al. Development of ganglioside GM1-based therapy to improve F508delCFTR rescue approaches. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 45-46
7. Ghigo A, Murabito A, Sala V, et Al. In depth-characterization of the molecular mechanisms underlying PI3K-mediated regulation of CFTR. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 44-45
8. Mancini G, Caslini C, Melessike M, et Al. Off-target effects of CFTR-modulators in pre-clinical infection models. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 38-39
9. Sorio C. Testing intestinal organoids for the prediction of response to CFTR potentiators and correctors used in clinic. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 11-12
10. Eramo A, Lucarelli M. Establishment of Conditionally Reprogrammed Airway Epithelial Stem Cell cultures from nasal epithelia of Cystic Fibrosis patients: exploring response to CFTR-modulating drugs for correlation with genetic profile (theratyping) and restoring CFTR function through gene editing approaches. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 10-11
11. Pedemonte N, Cavalli A. Theratyping orphan mutations in Italian cystic fibrosis patients: efficacy of CFTR modulators and RNF5 inhibitors. *Proc. 17th Convention of Investigators in Cystic Fibrosis.* 14-16 November 2019, Verona, pp 51-52



MOLTI ANCORA SONO IN ATTESA

1. Stato degli studi internazionali su terapie per mutazioni CFTR "orfane"

Dr Laura Minicucci
Istituto G. Gaslini, Genova

"Quando ho saputo di Trikafta, combinazione di tre modulatori della proteina CFTR - afferma, sul sito della CF Foundation, un malato con mutazioni diverse da quelle attualmente curabili - sono stato contento per i molti che potevano usufruire di questo nuovo farmaco, ma sono anche rimasto molto deluso: di nuovo, una terapia a disposizione per la FC ma, di nuovo, una terapia che non mi riguardava."

Queste parole potrebbero esprimere il sentimento diffuso delle persone con FC portatrici di mutazioni attualmente non "aggredibili" dai modulatori della proteina CFTR. Queste persone temono di essere lasciate indietro dai grandi progressi della ricerca in questo campo, credendo di non essere più "interessanti", perché rimasti in pochi o perché le difficoltà legate a terapie specifiche che li riguardano sono troppo grandi per essere affrontate (1, 2).

I soggetti con FC portatori di "mutazioni orfane" ad oggi esclusi dall'utilizzo dei nuovi modulatori CFTR

Ad oggi sono stati studiati e hanno dato risultati convincenti per quanto riguarda efficacia e sicurezza farmaci modulatori della CFTR per a) tutti i soggetti portatori di almeno una copia della mutazione F508del (classe 2); b) la maggior parte dei soggetti portatori di mutazioni *gating* (classe 3); c) i soggetti portatori di alcune mutazioni con funzione residua (classe 4 e 5). Si può vedere per questo la figura 1 della relazione del Dott. Braggion (pagina 7). Esistono però limiti di età (per i soggetti di età inferiori ai 12 anni mancano in gran parte trials dedicati) e l'autorizzazione all'uso e alla rimborsabilità è molto differente nell'ambito dei vari Paesi (vedi tabella pagina 12).

Volendo calare nella realtà italiana queste condizioni, sulla base dei dati del Registro italiano FC 2017, nell'ambito dei 5565 soggetti inclusi nel Registro stesso il 68% ha almeno 1 copia di mutazione F508del e il 3,4% ha almeno una copia di mutazione *gating* (Figura 1). Quindi, circa 1550 pazienti, il 28% del totale, indipendentemente dal criterio dell'età, sono portatori di un assetto genetico riferito alla proteina CFTR che non li rende trattabili con i modulatori di CFTR attualmente disponibili.

Tra questi 1550 sono compresi circa 350 soggetti portatori di mutazioni con funzione residua che per lo più si associano a quadri clinici meno gravi e che, in alcuni casi, possono usufruire del potenziatore Kalydeko, comunque non ancora approvato per tale indicazione in Europa e in Italia.

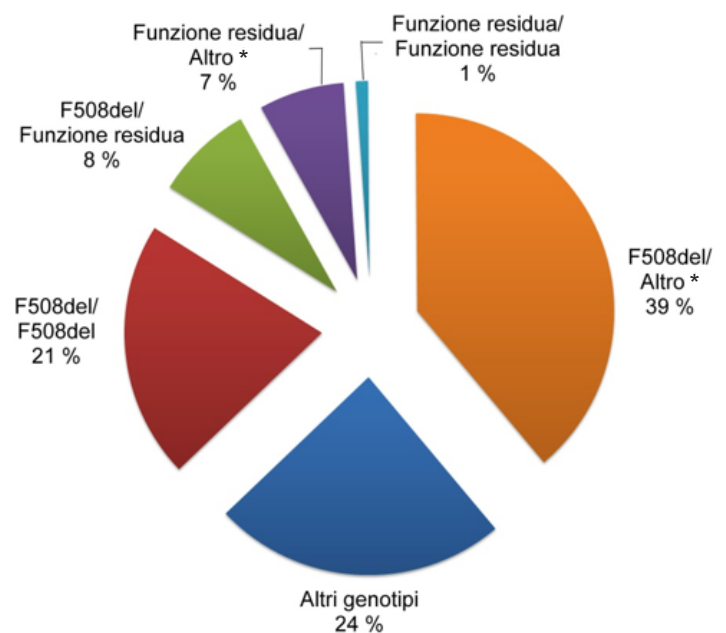


Figura 1. Registro Italiano Fibrosi Cistica 2017. Distribuzione della frequenza di mutazioni nei soggetti italiani con FC.

Numero di pazienti FC totali 5565. Il 68% è portatore di almeno 1 mutazione F508del e il 3,4% dei pazienti è portatore di almeno una mutazione *gating*.

*Altro: comprende tutte le mutazioni diverse da F508del e diverse da quelle con funzione residua.

Una terapia per tutte le persone con FC: le possibili strade da percorrere

1) Farmaci mutazione-orientati: sperimentazione clinica

Il gruppo più numeroso tra le "mutazioni orfane" è rappresentato da quelle con "meccanismo stop" (incluse nella classe 1 delle mutazioni CFTR). Per la più frequente mutazione stop, G542X, la ricerca punta all'identificazione di molecole con effetto "read-through" ("rettificatori o riavviatori di stop", che permettano cioè la lettura completa del messaggio genetico interrotto prematuramente, con conseguente sintesi incompleta della proteina. Un composto con questa azione era arrivato in fase di avanzata sperimentazione clinica ma poi si è rivelato non sufficientemente efficace (PTC 124), noto con il nome di Ataluren. Però è in corso un trial clinico (solo temporaneamente sospeso per le misure di prevenzione in atto nel corso della pandemia Covid-19) che indaga efficacia e sicurezza, sempre su pazienti portatori di almeno una copia di mutazione G542X, di un nuovo composto "read-through", definito con la sigla ELX-02 (Studio clinico NCT04135495, fase 2).

Il meccanismo d'azione dei composti "rettificatori di stop" non è ancora ben conosciuto e questo può spiegare la difficoltà di successo che in questo momento incontrano. Per questo la ricerca per le mutazioni stop ha intrapreso anche un'altra strada: indagare se fra i modulatori già disponibili vi possano essere composti efficaci, nonostante che la loro indicazione ufficiale sia per altri tipi di mutazione.

La modalità vien chiamata "studio degli effetti *off label*", vale a dire degli effetti al di fuori delle indicazioni ufficiali e riguarda farmaci già in commercio. Un esempio di questa linea è il *trial* in corso con il modulatore Symdeko, farmaco composto da un correttore e da un potenziatore, già in commercio (NCT03624101, in fase di reclutamento), di cui si sta studiando l'efficacia nei confronti della mutazione W1282X.

L'esempio più allargato di questa linea è un altro *trial* clinico che raccoglie soggetti portatori non solo di mutazioni stop ma di qualsiasi mutazione o combinazione di mutazioni diverse da quelle previste ufficialmente per i farmaci in commercio. Queste mutazioni, purché *in vitro* risultino responsive al farmaco, vengono incluse nel *trial* clinico. Si vuole conoscere in maniera controllata la risposta non solo a Symdeko, ma anche a Orkambi o Kalydeco in soggetti al di sotto di 12 anni (l'età al di sopra della quale è stato sperimentato finora Symdeko) (NCT03587961, fase 1). In questo modo si accetta la conoscenza che può esserci una risposta individuale e imprevedibile ai farmaci, legata al fatto che il difetto di CFTR per mutazioni rare e poco conosciute può essere "misto", con aspetti ascrivibili a varie classi di funzionamento, quindi sensibile a farmaci ufficialmente non indicati. Esempi concreti di questa possibilità sono stati di recente segnalati in alcuni soggetti con FC (3).

Il fine che si persegue è quello della medicina personalizzata a seconda dell'assetto genetico, infatti il *trial* si chiama: *Personalized Teratyping Trial* (Tabella 1).

TABELLA 1 - TERAPIE MUTAZIONE - ORIENTATE

Composto	Tipo di mutazione	Fase dello studio
ELX02	Mutazioni Stop (G542X)	Trial Clinico di fase 2
SYMDEKO	Mutazioni Stop (W1282X)	Trial Clinico speciale in fase di reclutamento
ORKAMBI KALYDECO SYMDEKO	Tutte le mutazioni escluse dalle indicazioni ufficiali dei farmaci in commercio, purché responsive <i>in vitro</i>	Trial Clinico speciale
NXV (FFC)	Mutazioni Stop (G542X)	Fase Preclinica (modelli animali e cellule epiteliali primarie FC)

2) Farmaci mutazione-orientati: sperimentazione su modelli "ex vivo"

A fronte dei citati trials, con disegno di studio tradizionale RCT (studio Clinico Randomizzato Controllato), stanno assumendo sempre maggiore importanza altre strategie di ricerca che intendono ovviare al problema della scarsa possibilità di arruolare negli studi un sufficiente numero di pazienti portatori di "mutazioni orfane". Queste mutazioni, infatti, sono complessivamente numerose, ma con difetti diversi tra di loro, per cui, soprattutto per quanto riguarda le mutazioni veramente rare, non sarebbe possibile arruolare un gruppo di pazienti omogeneo e numericamente sufficiente per valutare efficacia e sicurezza del composto in studio.

Sono, quindi, in atto progetti molto importanti per verificare la risposta *ex vivo* dei singoli pazienti, cimentando composti nuovi o modulatori già in uso per altre mutazioni, direttamente su cellule prelevate dai pazienti stessi. Si usano a questo scopo cellule della mucosa nasale prelevate con una tecnica di *brushing* (spazzolamento) nasale o versioni semplificate e miniaturizzate di un mini-organo in tre dimensioni prodotto *in vitro*, che assume caratteristiche più vicine alla complessità dell'organismo vivente e che viene creato a partire da cellule staminali di mucosa dell'intestino retto del malato: gli organoidi (4).

Se gli studi *ex-vivo* danno risultato positivo, i pazienti vengono reclutati per veri e propri studi clinici controllati oppure, in particolari circostanze (mutazioni molto rare oppure normative sanitarie che accettano la prova *ex-vivo* in sostituzione del trial clinico) i farmaci saggiati possono essere direttamente somministrati al malato (Figura 2).

Progetti internazionali

Vi sono già buone prospettive: è in corso un progetto europeo (HIT-CF) che si propone di raccogliere 500 pazienti con genotipi rari, in cura presso Centri FC di sedici Paesi Europei. Sugli organoidi, creati a partire dalle cellule dei pazienti arruolati, si testeranno i nuovi farmaci di due aziende farmaceutiche (Eloxx Pharmaceuticals e Proteostasis). Sulla base della risposta dell'organoide saranno reclutati circa ottanta pazienti che entreranno in trial clinici controllati. Proteostasis è un'azienda farmaceutica americana che, oltre a collaborare con il progetto HIT-CF, ha in corso un programma indipendente di studio (chiamato CHOICES) su 500 organoidi intestinali da pazienti con mutazioni rare, su cui testare i suoi nuovi composti.

Un'altra grande biobanca in fase di avanzata implementazione è ancora americana (studio chiamato RARE) e si propone di raccogliere campioni di sangue, cellule dell'epitelio nasale e dell'epitelio intestinale di soggetti con mutazioni o genotipi rari, per esempio soggetti con due mutazioni stop, oppure una mutazione stop e una mutazione particolarmente poco responsiva ai farmaci (es: N1303K). Gli organizzatori dicono che la biobanca è il primo passo per trovare farmaci, vecchi o nuovi, per questi soggetti attualmente orfani di trattamento modulatore.

L'approccio universale indipendente dal tipo di mutazione CFTR

Sono allo studio strategie terapeutiche, che mirano a risolvere il problema della malattia FC in tutti i soggetti, indipendentemente dal tipo di mutazione di cui sono portatori.

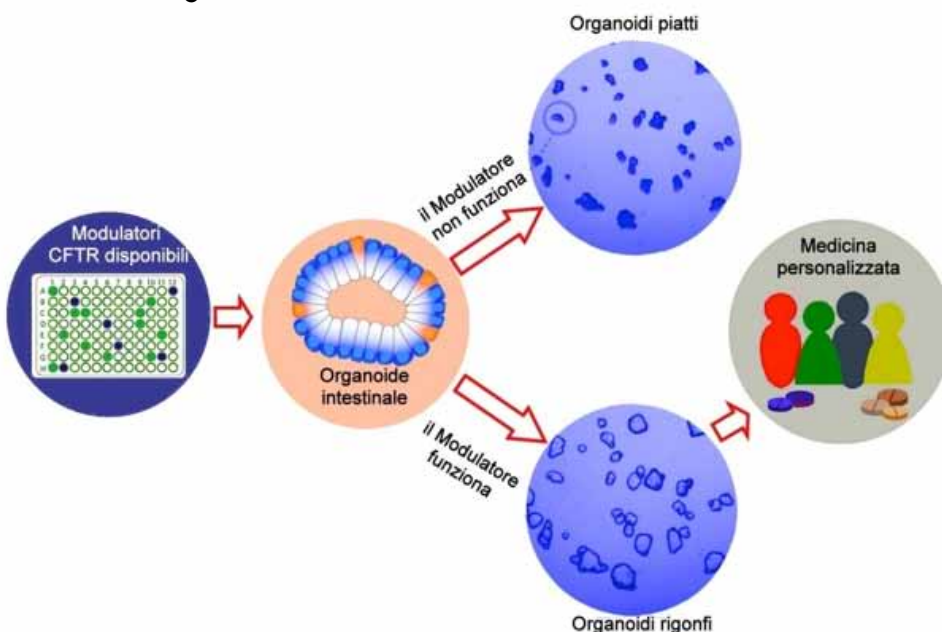


Figura 2. Saggio dei modulatori CFTR attraverso organoidi intestinali derivati dal malato FC.

Gli organoidi intestinali rappresentano un modello *ex vivo* per saggiare l'efficacia dei farmaci modulatori di CFTR. Se il modulatore è efficace agisce sulla proteina CFTR mutata delle cellule che compongono l'organoide, cosicché CFTR funziona trasportando cloro e acqua all'interno e l'organoide si rigonfia. Se il modulatore non è efficace non recupera la CFTR mutata e l'organoide resta schiacciato.

In questo approccio sono aperte varie strade, di cui accenniamo di seguito.

1. **Trovare nuovi modulatori efficaci su tutte le mutazioni**, incluse quelle "orfane", indipendentemente dal difetto che le caratterizza. Un esempio sono i composti cosiddetti "amplificatori", la cui funzione sarebbe quella di aumentare la quota di mRNA che porta il messaggio per la sintesi della proteina. Questo consentirebbe di ottenere una maggiore quantità di proteina, benché difettosa, su cui agirebbero, correggendola e potenziandola, adeguati modulatori. Siamo a studi ancora molto iniziali: citiamo il composto PTI-428 (Proteostasis Therapeutics) che è in trial di fase 1-2, usato da solo o in combinazione con un correttore e un amplificatore.
2. **Agire su canali diversi dal canale CFTR**. In questo filone si inseriscono gli studi su di una proteina che costituisce un canale alternativo per il Cloro: la proteina TME-16A. Un'azienda farmaceutica inglese ha recentemente messo a punto una molecola (ETX001) capace di agire come attivatore di TMEM16A e i risultati degli studi *in vitro* e *in vivo* su modelli animali sono incoraggianti. Un altro canale in gioco è il canale del sodio ENaC, la cui azione andrebbe invece limitata, per mantenere sodio e acqua fuori della cellula e consentire quindi fluidità alle secrezioni: ricerche su modello animale indicherebbero la possibilità di ottenere un tale effetto con speciali molecole, chiamate "oligonucleotidi antisenso".
3. Usare **nuove molecole trasportatrici di ioni: gli ionofori**. Sono piccole molecole in grado di facilitare il trasporto di ioni attraverso la membrana cellulare. Possono essere sintetizzati in laboratorio: si tratta di trovare degli ionofori in grado di far passare attraverso la membrana cellulare cloro e bicarbonato, in sostituzione della proteina CFTR difettosa (studi su modelli cellulari FC).
4. **Sperimentare tecniche che agiscono sul DNA del gene o su RNA messaggero**. Da qualche anno sentiamo parlare della tecnica del *Gene editing* (5), la straordinaria "forbice molecolare" che sotto opportuna guida RNA rimuove l'intero tratto di DNA che costituisce la mutazione e lo sostituisce con quello corretto.

L'*editing* (parola usata con il significato di correggere, modificare) può venire applicato anche all'acido nucleico RNAm che porta il messaggio dal DNA al ribosoma, sede della sintesi della proteina (Figura 3).

Va sottolineato che le nuove tecniche di *editing* si sono raffinate e mirano a intervenire su frammenti sempre più piccoli del materiale genetico. In sostanza si vuole restringere sempre più il bersaglio della correzione per avere meno ripercussioni sul genoma restante (evitare gli effetti "off target" = fuori bersaglio).

L'interesse per le nuove tecniche sta nel fatto che potrebbero essere applicate per mutazioni di vario tipo e vi sono studi preclinici in particolare per le mutazioni stop (vedi più avanti ricerca FFC). Vi è anche un'ipotesi ancora più innovativa, che consiste nel tentativo di introdurre nella cellula l'intero RNA messaggero nella sua versione comune, codificante la sintesi di proteina CFTR normale (invece che correggere quello mutato del malato).

È in corso un trial clinico di fase 1-2, il composto contenente l'RNAm si chiama MRT5005 e viene somministrato per via aerosolica.

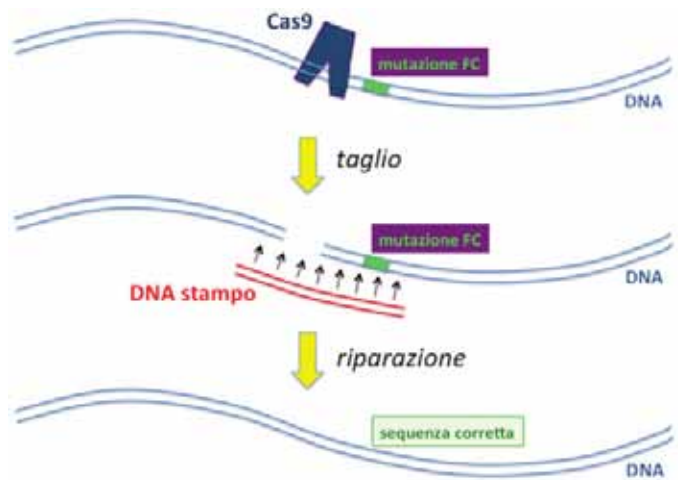


Figura 3. Strategia di "Gene editing" per la correzione delle mutazioni FC.

L'enzima Cas 9, che funziona tagliando i due filamenti di DNA, viene posizionato precisamente in prossimità di una mutazione utilizzando degli RNA guida (non raffigurati). Le cellule tendono normalmente a riparare i tagli al DNA utilizzando un meccanismo (chiamato "non homologous end joining", NHEJ) che incolla le estremità tagliate. Tuttavia, in presenza di un opportuno DNA stampo, in cui la mutazione è assente, può essere utilizzato un tipo di riparazione diverso (*Homology directed repair*, HDR) in cui parte del tratto di DNA a monte e a valle del taglio viene sostituito con la sequenza corretta (immagine fornita per cortesia del dott. Galiotta).

Un aspetto problematico di questi studi è rappresentato dal vettore con cui sia possibile introdurre nella cellula in modo efficace e sicuro le componenti della forbice molecolare (proteine e acidi nucleici) oppure frammenti di DNA e RNA.

Spesso vengono usati come vettori, proprio per la loro grande capacità di invadere le cellule, speciali virus, privati della componente patogena, o particelle virali più leggere ed efficienti. Sulla ricerca del vettore ideale sono in corso studi preclinici (Tabella 2).

TABELLA 2 - TERAPIE MUTAZIONE - INDIPENDENTI

Molecola/intervento	Effetto	Fase dello studio
Amplificatore PTI-428	Aumento della quantità di proteina CFTR anche se mutata	Trial Clinico di fase 1/2
Attivatore della proteina TMEM16A (composto ETX001)	Trasporto di cloro e acqua fuori dalla cellula	Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> su modelli animali
Inibitore del canale ENaC	Blocco riassorbimento sodio e trasporto di cloro e acqua fuori dalla cellula	Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> su modelli animali
Ionofori	Trasporto di cloro e bicarbonato fuori dalla cellula	Studi su cellule bronchiali primarie F508del/F508del
DNA Editing RNAm Editing	Correzione della mutazione a livello del gene o del messaggero	sStudi su modelli cellulari e organoidi intestinali FC
RNA messaggero normale per via aerosolica (composto MRT5005)	Sintesi di proteina CFTR normale	Trial Clinico di fase 1/2

Riferimenti bibliografici

- Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* 2020 Feb 21;10:1662
- De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020 May;109(5):893-899. doi: 10.1111/apa.15155. Epub 2020 Jan 22.
- Amato F, Scudieri P, Musante I, et al. Two CFTR mutations within codon 970 differently impact on the chloride channel functionality. *Human Mutation.* 2019;40(6):742-748
- De Poel E, Lefferts JW, Beekman JM. Intestinal organoids for Cystic Fibrosis research. *J Cyst Fibros.* 2020 Mar;19(Suppl 1):S60-S64. doi: 10.1016/j.jcf.2019.11.002. Epub 2019 Nov 28
- Arjmand B, Larijani B, Sheikh Hosseini M, Payab M, Gilany K, Godarzi P, Parhizkar Roudsari P, Amanollahi Baharvand M, Hoseini Mohammadi NS. The Horizon of Gene Therapy in Modern Medicine: Advances and Challenges. *Adv Exp Med Biol.* 2019 Dec 17



MOLTI ANCORA SONO IN ATTESA

2. Il contributo della ricerca FFC per terapie mirate a mutazioni "orfane"

Dr Graziella Borgo
Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona

Abbiamo visto che la ricerca internazionale percorre sostanzialmente due strade per trovare una cura per tutte le mutazioni: quella farmacologica diretta ad uno specifico difetto mutazionale e quella "mutazione indipendente" che ha molte vie aperte. Di seguito accenneremo ad alcuni progetti FFC per entrambi gli approcci.

Mutazioni stop

Nell'ambito dell'approccio farmacologico per le mutazioni stop, abbiamo visto che il composto ELX02 è il più avanzato perché in fase clinica (Trial fase 1-2). Ora il gruppo attivo presso l'università di Palermo (coordinato da Laura Lentini e Ivana Pibiri), ha identificato, su progetti FFC, attraverso speciale screening di grandi archivi di molecole **composti analoghi di PTC124** (il farmaco che era stato sperimentato con il nome di Ataluren, ma che non è stato approvato per FC). Li hanno migliorati e testati su modelli animali e cellule epiteliali primarie FC (con mutazione G542X).

Sono arrivati a selezionarne tre (il capostipite è contraddistinto dalla sigla NXV) con bassa tossicità ed elevata attività di superamento dello stop prematuro. Sono stati brevettati in condivisione fra Università di Palermo e FFC e all'orizzonte possono esserci prospettive di avanzamento di interesse (1, 2).

Ionofori

Per quanto riguarda gli **ionofori**, sono stati appena pubblicati i risultati di un progetto, sostenuto anche da FFC, che mostra due anionofori artificiali, denominati MM3 e MM34, brevettati dagli autori dello studio, efficaci nel ripristinare le caratteristiche del liquido superficiale delle vie aeree in fibrosi cistica. Le cellule utilizzate sono da pazienti omozigoti F508del perché, essendo questa la mutazione più frequente, è più

facile ottenere campioni per la ricerca, specialmente di cellule bronchiali da organo espantato. Lo studio è in attesa di conferme da parte di altri gruppi di ricerca ed è interessante perché potrebbe essere valido per qualsiasi mutazione (FFC#CP/2012).

Tecniche di manipolazione genetica

Queste tecniche innovative si stanno sempre più perfezionando, sono una prospettiva per il futuro che merita molta attenzione. Per il momento è meno battuta la strada di introdurre un'intera copia del gene CFTR normale da affiancare a quello mutato all'interno del nucleo della cellula (*Gene Therapy*). Si mira piuttosto ad intervenire sul frammento mutato del DNA genico originale del soggetto, oppure sul RNA-messaggero di questo gene. Queste tecniche prendono il nome di **DNA e RNA editing** (Figura 1).

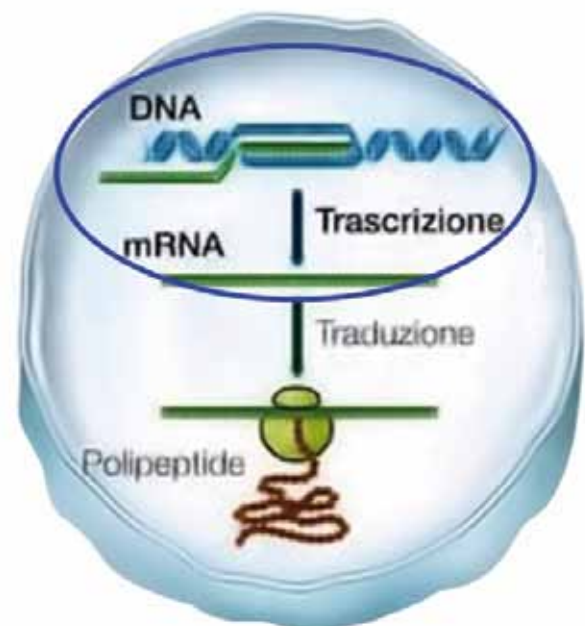


Figura 1. Editing di DNA o RNAm.

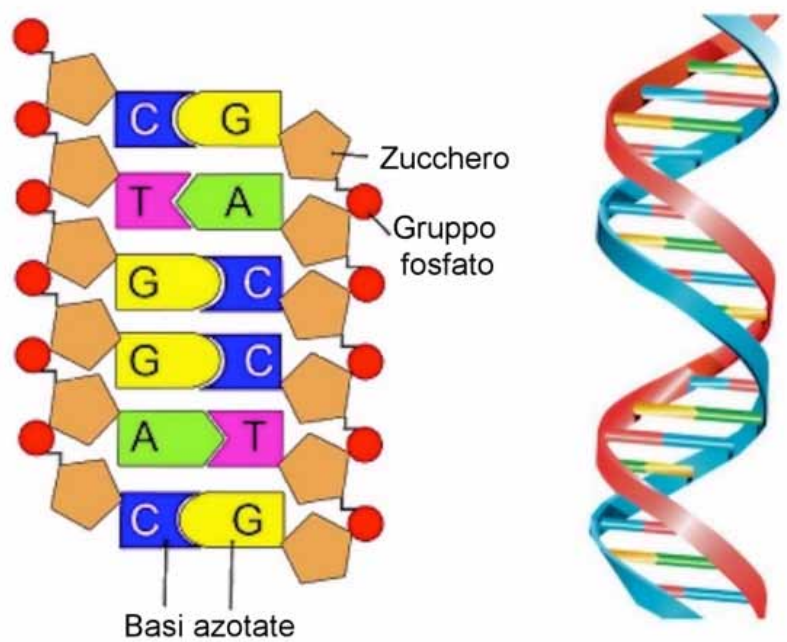
Nel nucleo della cellula il DNA fa una copia di sé stesso che è l'RNA messaggero (RNAm). RNAm porta il messaggio per la sintesi della proteina (Polipeptide). L'*editing* (=correzione) può essere fatta sul DNA o sul RNAm.

Intervenire sul RNA espone a minor rischio di effetti "fuori bersaglio", perché si agisce al di fuori del nucleo, più lontano dal DNA dell'intero genoma che il nucleo contiene. La mutazione scelta per stabilire l'applicabilità del metodo è una mutazione stop: W1282X (Progetto FFC#5/2018). Viene cambiata all'interno del RNAm una singola base (o lettera) della tripletta di basi che induce lo stop. Il messaggio quindi cambia e la sintesi proteica riprende. I ricercatori del progetto dicono che è necessario migliorare il vettore per somministrare l'RNAm corretto.

Sempre per intervenire sull'RNA messaggero corretto, è allo studio anche un composto di origine vegetale, la kinetina, che agirebbe su alcune varianti del gene, responsabili di forme atipiche di malattia FC, che sono di complicata diagnosi e prognosi (FFC#5/2019).

Il progetto FFC#1/2017 adotta invece la tecnica del **DNA editing**: in questo progetto è stato sperimentato un avanzamento del sistema originale CRISPR/Cas9 (3) per la correzione delle mutazioni di splicing 3272-26A>G e 3849+10kbC>T (mutazioni splicing di classe V) su organoidi intestinali FC. I risultati ottenuti forniscono la premessa per l'applicazione a mutazioni splicing più severe come quelle di classe I. Interessante è il fatto che come vettore sono state usate particelle virali modificate (VLPs, *Viral Like Particles*), adatte ad ottenere massima sicurezza e diffusione.

Sempre lo stesso gruppo di ricerca ha pensato di rivolgere l'esperienza ottenuta nell'uso del DNA editing al trattamento della mutazione più frequente F508del, che in teoria non è priva di trattamento farmacologico. Ma l'interesse per le tecniche di *gene editing* è lo stesso fortissimo, perché l'ipotesi è che, se si interviene direttamente sul DNA, la proteina prodotta sia simile a quella normale più di quella "corretta" con il farmaco, in altre parole la strategia terapeutica colpisca più radicalmente il difetto genetico e sia così più efficace nel ridurre i sintomi della malattia; non solo, ma l'effetto terapeutico potrebbe essere duraturo. Tutte queste ipotesi propongono di correggere il difetto di F508del introducendo nel gene CFTR



Scuola Secondaria Bolgare.Prof.Locatelli

Figura 2. Struttura del DNA e alfabeto genetico.

Le lettere che identificano le 4 basi Adenina, Timina, Citosina e Guanina (A, T, C, G) sono l'alfabeto usato dalle cellule per scrivere le istruzioni genetiche. Il DNA del genoma umano è formato dalla sequenza di 3,3 miliardi di paia di basi. Il gene CFTR si trova sul cromosoma 7 ed è composto da 230.000 paia di basi. La mutazione più frequente del gene CFTR, F508del, è dovuta alla perdita (delezione) di 3 paia di basi (tripletta che codifica per l'amminoacido fenilalanina nella posizione 508 della proteina).

nuove mutazioni, che dovrebbero neutralizzare l'effetto patogeno di F508del. La nuova tecnica viene chiamata "*CRISPR-base editor*" e punta a "editare" (in questo caso cambiare) una singola lettera (base) del DNA, cambiamento comunque sufficiente per creare una nuova mutazione sperabilmente con effetto benigno (4) (Figura 2, 3).

Studi ex vivo per interventi su mutazioni "orfane"

Infine anche FFC partecipa al grande interesse della ricerca per il saggio dei nuovi farmaci su cellule o tessuti prelevati direttamente dal paziente (**test ex vivo**). FFC sostiene dal 2012 un servizio che mette a disposizione dei ricercatori cellule epiteliali da bronchi FC, prelevate da polmoni espantati: è il servizio Colture Primarie (Genova), che in questi anni è stato di notevole supporto ai ricercatori FFC. Ha finanziato progetti di ricerca sugli organoidi intestinali (FFC 4/2013, 3/2014, 7/2016, Verona), che si sono già conclusi con interessanti avanzamenti, mentre altri due sono in corso: FFC6/2018 e

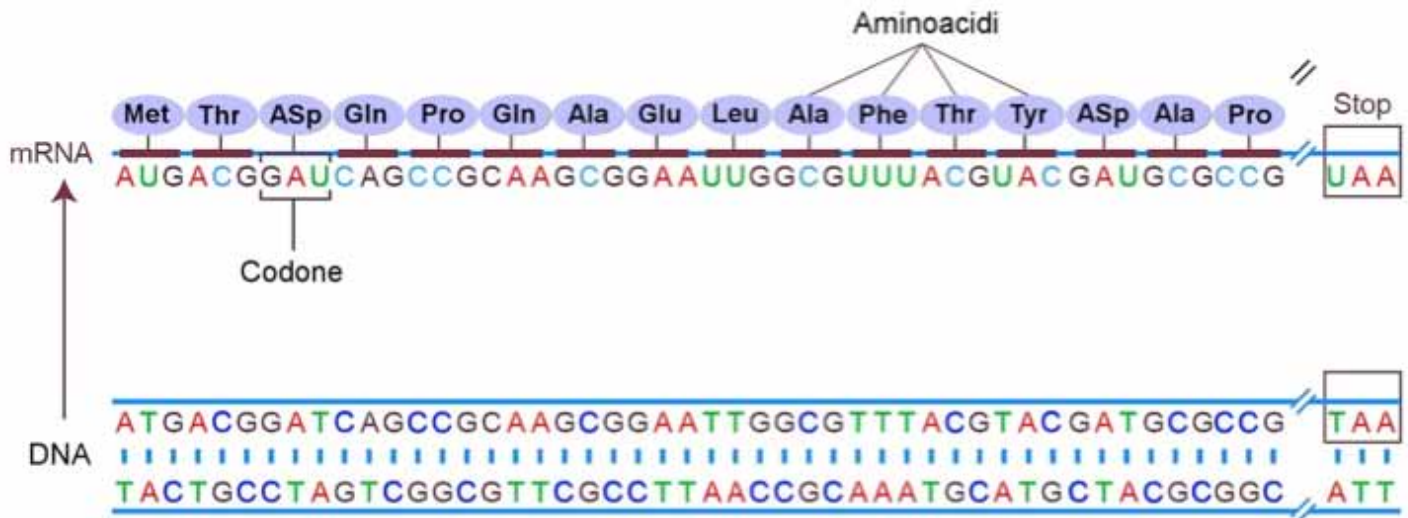


Fig. 3 Dal DNA all'RNA messaggero e agli aminoacidi che compongono la proteina.

In basso: la sequenza di un tratto di DNA. In alto: il corrispondente RNA messaggero (RNAm) codifica la sintesi della proteina in questo modo: ad ogni tripletta di lettere di RNAm (chiamata anche codone perché codifica il messaggio) corrisponde il legame con uno ed uno solo dei 20 aminoacidi che compongono, in sequenze di varia lunghezza e forma, tutte le proteine del nostro organismo. Solo a tre triplette (UAA [come nel caso della figura], UAG, e UGA) non corrisponde alcun aminoacido, perciò la sintesi della proteina si arresta (messaggio STOP).

13/2018 (Verona).

Rispetto agli organoidi intestinali, le cellule dell'epitelio nasale rappresentano meglio le caratteristiche dell'epitelio bronchiale, e possono generare anch'esse organoidi. Ed è su questo modello che FFC sta puntando in particolare la sua attenzione (FFC#12/2018, Roma e FFC#9/2019, Genova).

Conclusioni

Le prospettive della ricerca per mutazioni orfane

Trovare una cura per tutti non sarà un'impresa facile. Le mutazioni attualmente orfane di trattamento lo sono per varie ragioni, tra cui il fatto che spesso la proteina che producono è più difettosa che in altri casi; altrettanto spesso il loro specifico meccanismo d'azione non è conosciuto e implica studi complessi dedicati ad uno solo o pochi individui.

Chi oggi non ha una terapia può essere indotto a pensare che la rarità della sua mutazione condizioni la mancanza di cure: si può dire che questo non corrisponde al vero, anche perché il ricercatore è fortemente attratto anche dalle mutazioni molto rare che lo portano ad esplorare ipotesi nuove; e non è condizionato nel suo procedere dalle istanze del profitto industriale. Certo, le mutazioni orfane sono una sorta di galassia e raggiungere ogni singolo pianeta avrà tempi variabili. Tempi più brevi potrebbero esserci per i farmaci "rettificatori di segnale di stop" (*read-through*), più lunghi in altri casi.

Ma il panorama delle prospettive è ricco, lo dimostrano le molte proposte con obiettivo di trattamento indipendente dalla mutazione CFTR: sono studi iniziali, ma portano un patrimonio importante di nuove conoscenze con sviluppi assolu-

tamente promettenti. Sullo sfondo c'è la grande speranza delle tecniche di editing genetico, che richiedono più tempo ma che passo dopo passo stanno procedendo. In questo panorama va sottolineato che sicuramente i modelli *ex-vivo* oggi rappresentano una forte realtà, utile per far camminare la ricerca nel senso di trovare la migliore soluzione anche per il singolo individuo.

Altre ricadute della ricerca per mutazioni orfane

La ricerca in atto, volta a scoprire nuovi composti attraverso trial tradizionali o con nuove modalità *ex-vivo*, promette di accorciare i tempi della ricerca e portare importanti ricadute, oltre che nei confronti dei pazienti portatori di "mutazioni orfane", anche per quanto riguarda la gestione sociosanitaria dei nuovi farmaci.

Oltre al bene dei pazienti, quindi, altri motivi potrebbero mantenerla viva nell'ambito delle varie realtà scientifiche internazionali: si allarga il "mercato" facendo entrare gli attuali "esclusi"; si aprono strade alternative di ricerca perché potrebbe essere fatta chiarezza, con gli studi *ex-vivo*, sulla variabilità di risposta individuale alla terapia; vengono studiati nuovi composti, che potrebbero essere utili anche per mutazioni già "coperte" da altri farmaci, ampliando il pannello dei modulatori della CFTR disponibili sul "mercato".

La competizione fra diverse compagnie farmaceutiche potrebbe, quindi, portare ad una riduzione dell'attuale elevatissimo costo della terapia con i modulatori di CFTR, rendendola abbordabile, anche dal punto di vista finanziario, da parte di tutti i pazienti affetti e in tutti i Paesi del mondo.

Riferimenti bibliografici

- 1) Tutone M, Pibiri I, Lentini L, Pace A, Almerico AM. Deciphering the Nonsense Readthrough Mechanism of Action of Ataluren: An in Silico Compared Study. *ACS Med Chem Lett.* 2019 Feb 7;10(4):522-527
- 2) Campofelice A, Lentini L, Di Leonardo A, Melfi R, Tutone M, Pace A, Pibiri I. Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs). *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 6;20(13)
- 3) Maule G, Casini A, Montagna C, et al. Allele specific repair of splicing mutations in cystic fibrosis through AsCas12a genome editing. *Nat Commun.* 2019; 10: 3556
- 4) Geurts MH, de Poel E, Amatngalim GD, Beekman JM, Clevers H. "CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank" *Cell Stem Cell.* 2020 Apr 2;26(4):503-510. e7. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.019. Epub 2020 Feb 20
- 5) Gianotti A, Capurro V, Delpiano L, Mielczarek M, Garcia-Valverde M, Carreira-Barral I, Ludovico A, Fiore M, Baroni D, Moran O, Quesada R, Caci E. Small Molecule Anion Carriers Correct Abnormal Airway Surface Liquid Properties in Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 21;21(4)



LE STRATEGIE DI CURA PRIMA E DOPO I NUOVI FARMACI MODULATORI DELLA PROTEINA CFTR

1. Le strategie di cura che hanno cambiato la storia della fibrosi cistica

Prof. Giuseppe Magazzù

Università degli Studi, Policlinico Universitario. Messina

Profilo storico delle strategie di cura

Negli anni '60 e '70 in Italia esistevano solo pochi Centri FC, nei quali venivano curati quasi tutti i malati, provenienti il più spesso da altre Regioni, nel caso del Sud, molto lontane. Quanto mancava nelle sedi di provenienza di queste persone non erano tanto le risorse strutturali e di personale ma, a parte la competenza specifica per la FC degli operatori sanitari, non esisteva la cultura della presa in carico complessiva dei malati, cioè la capacità di preoccuparsi della loro assistenza/esistenza quotidiana, che richiedeva un piano di trattamento molto complesso e gravoso, cui conseguiva una scarsa qualità di vita. Quando il Centro FC di Verona aveva intrapreso una politica di formazione di personale dedicato alla cura delle persone con FC provenienti da varie Regioni, per promuovere gradualmente l'assistenza ai malati vicino casa, quello che incideva con successo in questo processo era proprio la trasmissione della cultura della presa in carico agli operatori sanitari, mentre si formavano le loro competenze. In precedenza, la formazione era stata rivolta prevalentemente agli stessi familiari dei malati, che svolgevano un ruolo essenziale nella loro assistenza quotidiana, ruolo che è continuato fino ad oggi.

Quello che ha permesso, tuttavia, di cambiare la qualità delle cure della FC in Italia è stata la legge 548/93, per la cui approvazione è stato giocato un ruolo determinante dal Prof. Mastella e dall'Associazione dei malati. Tale legge, con l'istituzione di Centri Regionali FC e il loro finanziamento per l'attività assistenziale e di ricerca, consentiva di formalizzare e potenziare anche altre iniziative, già avviate nei Centri fino allora esistenti: una procreazione responsabile, tramite lo screening del portatore sano, la consulenza genetica, la diagnosi prenatale; una diagnosi precoce della malattia, tramite lo screening ne-

onatale o tramite il coinvolgimento degli stessi Medici di famiglia, con corsi di formazione per il riconoscimento dei sintomi e la diagnosi e la cura dei malati. A prescindere dalle sempre nuove terapie delle quali le persone con FC si erano avvalse nel tempo, quello che ha cambiato in generale la storia della malattia è stata la cura in Centri FC specializzati, modalità regolata in Italia dalla già citata legge, che ha consentito di uniformare progressivamente le cure dei malati nei Centri di ogni Regione.

Nella Tabella 1 sono indicate le tappe fondamentali delle strategie di cura della FC in Italia, incluse quelle che sono trattate nei successivi paragrafi.

TABELLA 1. PROFILO STORICO DELLE STRATEGIE DI CURA FC IN ITALIA

Periodo	Eventi
Anni '60/'70	Primi Centri di cura FC in Italia - Formazione dei familiari per la cura dei malati
Anni '80	Diffusione della cultura della presa in carico e formazione di competenze negli operatori sanitari delle varie Regioni
Anni '90	Legge 548/93 - Istituzione dei Centri Regionali per la cura della FC in ogni Regione d'Italia, con standardizzazione delle cure
Anni '2000	Ulteriore standardizzazione dell'uso di terapie fondamentali
Anni '2010	Realizzazione e commercializzazione dei modulatori del CFTR

Le terapie fondamentali

• Fisioterapia respiratoria

La ben nota importanza dell'alterazione del muco presente sulla superficie delle cellule di rivestimento dell'albero bronchiale nel determinare le manifestazioni della malattia, spiega perché la sua rimozione dalle vie respiratorie sia stato il primo intervento terapeutico

prescritto nelle "terapie di ogni giorno". A parte la raccomandazione dell'adozione di uno stile di vita basato sull'attività fisica all'aria aperta - sfatando il luogo comune di sconsigliare attività fisica e meno ancora sportiva a chi presenta sintomi respiratori - la fisioterapia respiratoria è stato da sempre il cardine delle cure nella FC. Le tecniche per effettuarla sono state individualizzate, tenuto conto che non ci sono prove di maggiore efficacia di una nei confronti di un'altra.

• Fluidificazione del muco bronchiale

D'altra parte, il fatto che le caratteristiche di viscosità del muco siano dovute per la gran parte alla presenza delle fibre di DNA derivante dai leucociti neutrofili (de)generati nella loro contrapposizione all'infezione nelle vie respiratorie, giustifica l'adozione, con indicazione a utilizzare sempre più precocemente un farmaco prodotto con tecniche di ricombinazione genetica (*rhDNAse*, *pulmozyme*), che degrada e promuove l'eliminazione delle fibre di DNA ispessenti il muco.

Sempre con l'intento di fluidificare il muco denso e viscoso, dopo la dimostrata efficacia della **soluzione salina ipertonica**, questa terapia è stata inserita tra i cardini del trattamento previsti (1) prima ancora della scoperta dei modulatori CFTR (2) e poi confermata negli standard di cure (3), anche perché il meccanismo di azione è diverso da quello del *rhDNAse*: i due trattamenti sono da considerare complementari.

• Controllo dell'infezione broncopolmonare

La stessa alterazione del muco è la causa del sovrapporsi di infezioni polmonari e la presenza dello *Pseudomonas aeruginosa*, dapprima saltuaria e poi cronica nelle vie respiratorie, viene messa in relazione al declino della funzione polmonare delle persone con FC, soprattutto dopo la comparsa dei ceppi mucoidi, cioè con un rivestimento che li rende resistenti ad antibiotici. Per tale motivo la **prevenzione dell'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*, il contenimento dell'infezione polmonare cronica e il precoce e intensivo trattamento delle riaccensioni infettive polmonari**, sono stati indicati come punti fondamentali sui quali intervenire per migliorare la prognosi della FC. A questi interventi successivamente si è aggiunto il trattamento con **antibiotici per via inalatoria** (3).

A parte i trattamenti prevalentemente rivolti a *Pseudomonas aeruginosa* e Stafilococ-

co aureo, nonché ai loro ceppi resistenti ad antibiotico, l'insorgenza di altri batteri, quali ad esempio *Burkholderia cepacia*, complex, *Achromobacter xylosoxidans* e Micobatteri non tubercolari multi resistenti ad antibiotico, richiede sempre più attenzioni e trattamento intensivo.

• Mitigazione dell'infiammazione broncopolmonare

L'infiammazione delle vie aeree, evento determinante nell'evoluzione della malattia, inizia precocemente già nei primi mesi di vita e per tale motivo è stata oggetto di possibili **trattamenti antinfiammatori** a lungo termine. Esclusi il cortisone (salvo che per la complicanza Aspergilloso Broncopolmonare Allergica) per via generale e l'ibuprofene per gli effetti collaterali, l'**azitromicina**, utilizzata con successo, sia per la sua azione antinfiammatoria che per quella antibiotica, è stata inclusa negli standard di cure con la riserva di valutare la durata di questo trattamento e la possibile induzione di resistenze batteriche.

• Trattare l'insufficienza digestiva e ottimizzare stato nutrizionale e crescita

Il decorso della malattia polmonare, oltre che dalle terapie suddette, dipende dal mantenimento di un **adeguato stato nutrizionale**. Questo deve essere monitorato ad ogni controllo ambulatoriale, insieme alla **terapia sostitutiva pancreatic**a (ad eccezione dei soggetti con sufficienza pancreatic) per correggere la mal-digestione, e si avvale di accorgimenti per rendere le assunzioni di **nutrienti ricchi in calorie**, integrate da una regolare **supplementazione vitaminica**. L'obiettivo è di far raggiungere ai soggetti di età pediatrica una crescita proporzionata al potenziale genetico e in tutti un normale valore di indice di massa corporea, basato sui valori di peso e altezza. Rientra in questo ambito anche la **supplementazione di sale**, per prevenirne le eccessive e talora fatali perdite.

Trattamento complicanze

Il carico indotto dalle terapie fondamentali è aumentato in caso di insorgenza di **complicanze** che possono essere persistenti, come il diabete correlato alla FC o la malattia epatica e colecistica, oppure occasionali ma spesso ricorrenti, come l'occlusione intestinale, l'emottisi e lo pneumotorace.

Il declino della funzione polmonare potrà comportare nel tempo insufficienza respiratoria cronica con necessità di ossigenoterapia, di

TABELLA 2. OBIETTIVI E INTERVENTI DELLE TERAPIE SINTOMATICHE

Obiettivi della terapia	Interventi terapeutici
Rimozione del muco dalle vie respiratorie e incremento dell'attività muco-ciliare	Fisioterapia respiratoria, attività fisica, sport
Degradazione del DNA prodotto dai leucociti	rhDNAse
Idratazione del muco delle vie respiratorie	Soluzione salina ipertonica
Prevenzione dell'infezione cronica e trattamento precoce per l'eradicazione di <i>P. aeruginosa</i>	Norme per la prevenzione dell'infezione e antibiotici orali o inalati
Soppressione/contenimento dell'infezione polmonare cronica da <i>P. aeruginosa</i> e prevenzione delle riaccensioni infettive polmonari	Inalazione cronica o a cicli intermittenti di antibiotici
Precoce e intenso trattamento delle riaccensioni infettive polmonari	Antibiotici endovena
Controllo infiammazione polmonare	Azitromicina orale
Mantenimnto adeguato stato nutrizionale e crescita	Correzione della mal-digestione con terapia sostitutiva pancreatica - Dieta libera e ipercalorica - Supplementazione vitaminica e salina
Cura delle complicanze (diabete, epatopatia, emottisi, pneumotorace, occlusioni intestinali, etc)	Specifici trattamenti
Trattamento dell'Insufficienza respiratoria	Ossigenoterapia, Ventilazione non invasiva
Insufficienza respiratoria grave irreversibile	Trapianto bipolmonare

tecniche di ventilazione non invasiva e, laddove vengano soddisfatti i criteri, di **trapianto polmonare**. Come si può leggere nel numero di maggio 2020 del Notiziario FFC, anche se le speranze di tutti convergono sul fatto che in futuro nessuno dei pazienti FC dovrebbe ricorrere al trapianto polmonare, questa procedura, comunque, è oggi in grado, e in modo efficace, di incidere significativamente sulla durata e qualità di vita nei pazienti attualmente più compromessi.

In Tabella 2 sono sintetizzate le "terapie di ogni giorno" su menzionate, che le persone con FC affrontano a seconda della prescrizione dei Centri FC e che sono state indicate come terapie fondamentali (2) prima della pubblicazione dello studio su Ivacaftor e confermate negli standard di cure del 2018 (3).

Che cosa cambierà in futuro?

A questo quesito si può tentare di rispondere nel contesto attuale della pandemia che stiamo vivendo e in relazione all'avvio dei modulatori.

I Centri, il medico di famiglia, la telemedicina

Il punto che è stato ritenuto da sempre il più importante per modificare la storia della malattia è la centralizzazione delle cure con frequen-

ti valutazioni di routine presso i Centri FC. La pandemia di Covid-19 obbligherà a ripensare a modalità di cura che comprendano anche delle valutazioni a distanza, con il monitoraggio di parametri clinici, non solo dei sintomi, che potranno essere trasmessi ai Centri. Queste modifiche che non intendono sostituire i contatti di persona, possono rappresentare una grande opportunità per il miglioramento delle cure, con un maggiore coinvolgimento del Medico di famiglia, a condizione che l'efficienza di una nuova organizzazione venga confermata da adeguate verifiche. È altresì importante che la cosiddetta telemedicina non si traduca solo in una mera trasmissione elettronica di dati ma che si dedichi ad essa, e venga riconosciuto, il tempo adeguato di un contatto a distanza da parte delle figure professionali coinvolte nella cura multidisciplinare della FC.

Avvento delle nuove terapie: limitabili o eliminabili le terapie tradizionali?

Con l'avvio delle nuove terapie con i modulatori del CFTR, alcune delle quali sembrano "aver cambiato la vita" delle persone con FC, e fermo restando l'obbligo di verificarne i benefici ed effetti collaterali a distanza con gli studi di fase IV, c'è da chiedersi: è possibile pensare di poter li-

mitare o sospendere le "terapie di ogni giorno"? come viene avvertito il **carico delle cure** dalle persone con FC e verso quali terapie vengono rivolti gli auspici di poterle limitare o sospendere?

È stato recentemente pubblicato uno studio (5) negli Stati Uniti con il più alto numero di persone con FC mai coinvolto in una inchiesta, che riguardava il parere della comunità FC su quali fossero considerate le terapie più gravose e se l'effetto della sospensione delle "terapie di ogni giorno" dovesse essere studiato laddove fosse stato disponibile un farmaco modulatore del CFTR. Le cure ritenute più gravose, la fisioterapia respiratoria e la terapia antibiotica per inalazione, rappresentavano le priorità indicate per gli studi da effettuare, nel tentativo di ridurre il carico delle cure quotidiane.

Studi per valutare effetti della limitazione di terapie sintomatiche

Ma quali sono i presupposti per verificare se la fisioterapia e gli antibiotici inalatori, indicati come le terapie più gravose per la vita delle persone con FC, possano essere ridotte?

Entrambe queste possibilità si basano sulle nuove conoscenze (4) della composizione del muco e sul ruolo che esso svolge anche in riferimento alla difesa dell'albero respiratorio nei confronti dei batteri che sopravvivono quando il muco è alterato e si forma "il tappo". La già dimostrata possibile reversibilità dell'alterazione mucosa con nuovi farmaci, inclusi i modulatori del canale del cloro, possono far prospettare una riduzione del carico indotto dalle tecniche di fisioterapia respiratoria. D'altra parte, osservazioni che mostrano come la carica batterica diminuisca dopo l'avvio del trattamento con modulatori del CFTR anche nei soggetti con infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* sono possibilmente indotte dalle stesse modifiche del muco (6) che tali farmaci comportano. Ne consegue una migliorata capacità delle micro-ciglia, che rivestono le cellule respiratorie, di spazzare via i microbi presenti, per cui tale effetto potrebbe

avvenire a prescindere dal tipo di batterio che colonizza l'albero respiratorio. Inoltre, bisogna anche considerare l'attività antibatterica che gli stessi modulatori possono esercitare direttamente.

Ovviamente non si può escludere che quanto osservato dipenda dal concomitante effetto dei vari farmaci finora utilizzati, per cui si deduce che solo dopo studi che verifichino gli effetti della sospensione di ciascuna delle "terapie di ogni giorno" si potrà semplificare il trattamento.

Conclusioni

Anche se non presi in considerazione nell'inchiesta citata prima (5), ci sono altri 2 auspici che concernono gli effetti dei modulatori. Uno è che tali farmaci possano migliorare lo stato nutrizionale rendendo meno o non necessaria una dieta ipercalorica. I dati preliminari sul miglioramento dello stato nutrizionale con l'uso dell'ultima generazione di modulatori confortano tale ipotesi. Il secondo è che anche la funzione pancreatica, sia esocrina che endocrina (causa di diabete quest'ultima) possano trarre beneficio dal trattamento con i modulatori avviato molto precocemente.

Infine, il fatto che, nell'inchiesta citata in precedenza (5), solo una percentuale non superiore al 20% delle persone con FC avesse tentato spontaneamente di ridurre o sospendere una delle "terapie di ogni giorno", testimonia come ci sia, almeno nella comunità FC nordamericana, la consapevolezza dell'importanza di prestarsi a studi che verifichino gli effetti della sospensione delle terapie finora fondamentali, al fine di non vanificare i benefici che le persone con FC potranno avere con l'uso di sempre nuovi ed efficaci farmaci. L'auspicio è che lo stesso avvenga nella comunità FC italiana.

Riferimenti bibliografici

1. Cohen-Cymbarknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing Cystic Fibrosis. Strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1463-1471
2. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011;365:1663-72
3. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros* 2018;17:153-178
4. Boucher RC. Mucobronchial diseases. *N Engl J Med* 2019;380:1941-53
5. Gifford AH, Mayer-Hamblett N, Pearson K, et al. Answering the call to address cystic fibrosis treatment burden in the era of highly effective CFTR modulator therapy. *J Cyst Fibros*; <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.11.007>
6. Rogers GB, Taylor SL, Hoffman LD. The impact of CFTR modulator therapies on CF airway microbiology. *J Cyst Fibros*; <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.07.008>

LE STRATEGIE DI CURA PRIMA E DOPO I NUOVI FARMACI MODULATORI DELLA PROTEINA CFTR

2. Contributi recenti della ricerca FFC alle strategie di cura tradizionali

Dr Graziella Borgo

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona

Strategie antibatteriche

La ricerca di nuovi antibatterici: il filone dei peptidi antimicrobici (AMPs)

Ci sono stati in anni recenti importanti progressi soprattutto per quanto riguarda la formulazione per via aerosolica di antibiotici già in uso per altre vie, "confezionati" con nuove modalità adatte a far risparmiare tempo nella terapia quotidiana. Ma la domanda pressante è quella di antibiotici nuovi e magari più "potenti". In realtà l'industria farmaceutica sembra attualmente non investire molto nella ricerca di molecole nuove, perché è un processo che richiede costi elevatissimi, un tempo molto lungo e deve confrontarsi con un mercato troppo concorrenziale.

La ricerca FFC esplora il campo dei peptidi antimicrobici (*Antimicrobial Peptides, AMPs*), piccole molecole proteiche costituite da 12-50 aminoacidi, largamente diffuse in natura. Peptidi con attività biologica sono stati isolati da un elevato numero di organismi, quali batteri, piante, insetti, anfibi e mammiferi. Gli AMPs svolgono un ruolo molto importante nella cosiddetta immunità innata, costituita da una serie di meccanismi di difesa non specifici, diretti verso un largo spettro di microrganismi e presenti in un individuo fin dalla nascita. Quindi, rappresentano la prima vera barriera di difesa dell'organismo agli agenti patogeni.

Di qui l'idea di produrli sinteticamente. Un polipeptide conosciuto nella pratica clinica FC è la Colimicina e il suo derivato "colistimetato di sodio" (Colistina®) usato prevalentemente per

aerosol, data la sua elevata nefrotossicità per via generale.

La ricerca FFC studia i peptidi per trovare il modo di usarli in sinergia con gli antibiotici convenzionali o da soli nei confronti di batteri che hanno sviluppato antibiotico resistenza. Numerosi progetti FFC (FFC#14/2009, FFC#24/2011, FFC#12/2013, FFC#14/2011, FFC 11/2014, FFC 15/2017) hanno portato all'identificazione del peptide SET-M33DIM, brevettato dalla compagnia biotecnologica SetLance, fondata nel 2009 dai ricercatori stessi, sperimentato su modelli animali attraverso somministrazione per via aerosolica. In una recente pubblicazione (1) viene riportata efficacia e minore tossicità rispetto a composti analoghi precedenti in cellule, tessuti e modelli animali di infezione da vari batteri (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Altro peptide in fasi di studio avanzato è ESC (1-21) (Progetti FFC#14/2011, 11/2014, 15/2017, Univ.Roma), anch'esso oggetto di brevetto. Derivato dalla pelle di Rana esculenta, è stato sintetizzato e dimostrato somministrabile sempre per inalazione attraverso nanoformulazioni in polvere secca.

Un nuovo antibatterico per via aerosolica

Una molecola antibatterica di natura del tutto diversa è rappresentata dal Gallio, un metallo raro presente in natura, di cui si utilizza lo ione Ga³⁺. Ga³⁺ inganna *Pseudomonas* e lo avvelena sostituendosi allo ione ferrico, di cui il batterio ha vitale necessità ma non lo distingue dallo ione gallico. Sono stati completati contemporaneamente studi clinici di fase 1 (NCT 01093521) e di fase 2 (NCT 02354859), in cui il gallio è stato somministrato per via endovenosa in pazienti FC con infezione cronica da *Pseudomonas*, riportando dati positivi quanto a sicurezza e tollerabilità. La ricerca FFC ha

cominciato ad interessarsi al Gallio ancora parecchi anni fa (FFC#14/2010, FFC#21/2015, FFC#18/2017, FFC#19/2019) per approdare ora all'ultimo progetto in cui i ricercatori (Univ.Tor Vergata, Roma) intendono dimostrare l'efficacia del gallio somministrato per via aerosolica, allo scopo di aumentare la concentrazione del composto nel polmone e minimizzarne gli effetti generali.

Strategie innovative: la terapia con fagi

I fagi (o batteriofagi) sono virus ubiquitari che si trovano ovunque esistano batteri. Sono la più abbondante entità biologica sulla terra e sono riscoperti oggi come potenziale soluzione per un ampio spettro di problemi. La loro efficacia contro i batteri era nota dagli inizi del '900 ed è stata poi oscurata dalla scoperta degli antibiotici. Ma oggi si fa pressante il problema della resistenza di molti batteri agli antibiotici stessi e di qui la riscoperta dei fagi, virus "buoni" che non infettano le cellule umane, ma attaccano e distruggono i batteri. Nei paesi occidentali la terapia con batteriofagi non è nel pannello delle terapie convenzionali, ma ora numerose istituzioni internazionali hanno dichiarato il loro interesse e proprio la FDA ha permesso il loro uso negli USA attraverso l'*Emergency Investigational New Drug scheme*, una procedura simile al nostro "uso compassionevole"; inoltre, sono permessi trial clinici per lo studio dell'efficacia e della sicurezza.

Un gruppo di ricerca dell'Università di Milano si è dedicato allo studio dei batteriofagi (FFC#16/2016, FFC#22/2017) (1, 2) e ha individuato un cocktail di fagi molto attivi su vari modelli animali contro *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente, con risultati che potrebbero costituire la premessa per avviare un trial clinico italiano.

Alla ricerca di nuove tecniche diagnostiche

Pseudomonas aeruginosa (Pa) è il principale responsabile dell'infezione polmonare cronica FC. La completa eradicazione dell'infezione da Pa è un obiettivo difficilmente raggiungibile e la ricerca è puntata a stabilire quali possano esserne le cause. Una di queste può essere lo sviluppo di forme batteriche vitali ma temporaneamente inattive, che l'antibiotico non ha eliminato, e che possono non essere evidenziate attraverso il comune metodo della coltura batterica. Questi batteri che persistono e non sono diagnosticabili sono detti VBNC (Batteri Viventi Non Coltivabili).

I progetti FFC#13/2017 e FFC#16/2019 studiano un nuovo metodo di diagnosi per identificare tutte le forme vitali di Pa presenti nel muco di pazienti FC e quindi anche le forme VBNC, in modo da aggredirli con strategie antibiotiche più efficaci.

Trattamento di patogeni emergenti

Micobatteri Non Tubercolari

Un altro campo di ricerca FFC si rivolge a quei batteri che sono tipici della popolazione adulta con fibrosi cistica. Fra questi un rilievo particolare assumono i Micobatteri Non Tubercolari (NTM). Sono patogeni multiresistenti che infettano il polmone FC, soprattutto con danno avanzato, e provocano un importante declino della funzionalità polmonare, ponendo seri problemi diagnostici e terapeutici. I progetti dedicati sono vari (FFC#17/2017, Univ. Perugia; FFC#20/2017, Univ. Milano, FFC#19/2018, Univ. Pavia-Ist.Spallanzani, FFC#17/2019, Univ. Milano).

Segnaliamo che è stato ottenuto un nuovo modello animale di infezione da NTM; messo a punto un nuovo metodo per somministrare per via aerosolica un immunostimolante (un liposoma bioattivo) anti-*Mycobacterium abscessus* (il più frequentemente isolato in FC) da associare all'antibiotico; con un importante progetto svolto in collaborazione con l'Accademia Russa delle Scienze-Mosca, si stanno cercando e sintetizzando un elevato numero (oltre 500) di composti attivi contro NTM, fra cui selezionare e ottimizzare i più efficaci.

Funghi

Fra i patogeni della popolazione adulta FC occupa un posto particolare un fungo, l'*Aspergillus* (la specie di questo genere più implicata in FC è *Aspergillus fumigatus*). È un fungo ubiquitario che solo in situazioni particolari risulta patogeno ed è questo il problema in FC. Può essere isolato nell'escreato dei pazienti FC in assenza di sintomi associati, oppure accompagnato da manifestazioni respiratorie non distinguibili da quelle provocate da altri più comuni agenti patogeni, determinando così incertezza e complessità nelle decisioni terapeutiche. Inoltre, va ricordato che l'8-10% dei malati FC va incontro ad una complicanza di tipo immuno-allergico complesso, chiamata Aspergilloso Broncopolmonare Allergica, che si giova di cortisonici e antibiotici antifungini specifici.

Un progetto che si conclude quest'anno è mirato conoscere la prevalenza di *Aspergillus* nei bronchi FC e valutare la sensibilità diagnostica di una batteria di test volti a individuare i pazienti in cui il fungo assume ruolo patogeno. Il progetto è multicentrico (vi collaborano 4 fra i maggiori centri italiani FC: Firenze, Genova, Milano, Roma) e si propone di raccogliere prospetticamente una vasta casistica di pazienti adulti FC interessati dal problema (FFC#26/2018).

I mucolitici

Tra i farmaci con azione mucolitica abbiamo visto l'importanza del DNase, proteina in grado di degradare le fibre di DNA nel secreto bronchiale (DNasi), fluidificandolo e migliorando così la funzionalità polmonare in FC. L'efficacia di questa terapia è tuttavia limitata dalla bassa durata dell'enzima attivo nella sede bronchiale. Oltre alla DNasi utilizzata per aerosol in FC (DNasi I: prodotto commerciale Pulmozyme®), il genoma umano codifica per altre DNasi, il cui potenziale terapeutico nel trattamento della FC è finora inesplorato.

L'aggiunta di catene di polietilenglicole (PEG, una macromolecola artificiale solubile e non tossica) alle DNasi migliora efficacia e durata del trattamento. Il progetto si propone di esplorare il potenziale terapeutico delle DNasi umane e in particolare di una forma espressa in modo specifico nel polmone. Il progetto si conclude quest'anno e la prospettiva è lo sviluppo di un farmaco basato su una nuova DNasi (DNasi2b), modificata in modo da garantire una azione più efficace e duratura (FFC#9/2018, Università di Padova).

Molto interessante, in quanto si rivolge ad un composto dal costo estremamente basso e facilmente accessibile, è il progetto che ha studiato le proprietà mucolitiche del bicarbonato (FFC#12/2016, Olga Zegarra e Loretta Ferrera, Istituto Gaslini, Genova). La perdita di funzione della proteina CFTR comporta la riduzione della secrezione extracellulare non solo del cloro ma anche del bicarbonato (ione HCO_3^-). La mancanza di bicarbonato induce aumento dell'acidità e maggior viscosità del liquido che riveste le vie aeree. In questo studio sono state trattate con lo ione bicarbonato cellule bronchiali primarie derivate da soggetti normali e da pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del-CFTR o eterozigoti per la stessa mutazione insieme ad altra mutazione. I risultati

hanno indicato che l'applicazione di bicarbonato determina l'aumento del pH e della fluidità del liquido periciliare.

I dati ottenuti da questo lavoro saranno utili per progettare eventuali strategie per il trattamento di pazienti FC usando bicarbonato inalato.

Fatto importante, il bicarbonato può rappresentare una terapia mutazione-indipendente e a basso costo per fluidificare ed eliminare il muco bronchiale.

Una recentissima pubblicazione (5) conferma queste aspettative: uno studio controllato in piccolissimo numero di malati FC (università di San Paolo, Brasile) ha dimostrato che l'inalazione di bicarbonato (sotto forma di bicarbonato di sodio NaHCO_3 al 4% e all'8%) è stata ben tollerata e ha cambiato significativamente le caratteristiche del muco bronchiale. Si tratta della prima segnalazione ed attendiamo conferme.

Il trapianto polmonare

La speranza di tutti è che in futuro il trapianto polmonare diventi sempre meno necessario. Però intanto è indispensabile affrontare i problemi che ancora presenta. La ricerca FFC si propone di migliorare le tecniche diagnostiche applicate per lo studio del cuore e del polmone del trapiantato.

È in corso un progetto per migliorare la diagnosi delle alterazioni del ventricolo cardiaco destro nel pretrapianto attraverso ecocardiografia mirata, inoltre sperimentare un farmaco (già in uso per altre patologie cardiache) per prevenirne le conseguenze (Progetto FFC#27/2019, Centro Trapianti Milano). Viene anche indagata una nuova modalità di Risonanza Magnetica (1HRM) in confronto con la TAC, per conoscere la distribuzione della ventilazione polmonare e in particolare i fenomeni di intrappolamento d'aria che si verificano in caso di rigetto polmonare o esacerbazione infettiva (FFC#27/2018, Centro Trapianti Milano).

Sempre a Milano, attraverso sperimentazione clinica randomizzata controllata, viene sperimentata una terapia innovativa in FC, la **fotofresi extracorporea** (ECP), come terapia d'induzione per prevenire il rigetto acuto in trapiantati di polmone FC. L'ECP consiste nel trattamento del sangue del paziente che passa attraverso speciale macchina e poi viene reinfuso. Nella macchina il sangue è esposto a speciale luce ultravioletta e riceve un farmaco fotosensibilizzante capace di rendere le cellule

ematiche più sensibili all'azione dei raggi UV. L'ipotesi è che in questo modo le cellule responsabili della risposta immunitaria subiscano modifiche tali da renderle tolleranti nei confronti dell'organo trapiantato.

Presso il centro trapianti di Padova (FFC#28/2018) si è svolta una ricerca che aveva lo scopo di conoscere le cause del diverso andamento clinico post-trapianto. Non sono abbastanza note a tutt'oggi le ragioni per cui un polmone trapiantato va incontro a rigetto acuto o cronico. L'ipotesi dei ricercatori è che un particolare profilo genetico dell'organo trapiantato condizioni l'andamento clinico. Lo studio, di tipo retrospettivo, ha indagato prelievi di sangue, BAL (liquido broncolaveolare) e biopsie transbronchiali di soggetti con decorso clinico diverso (con rigetto acuto, cronico e senza rigetto). Lo studio ha fatto emergere un gruppo di geni disregolati (iperattivi) presenti nella malattia da rigetto cronico. In particolare 2 geni, LCN2 e CCL11, coinvolti nella risposta immunitaria e nell'infiammazione, sono apparsi importanti. La definizione di un profilo genetico correlato al rigetto cronico potrebbe rappresentare un marcatore importante utile alla modulazione degli interventi terapeutici e quindi al miglioramento dell'esito del trapianto stesso.

Riferimenti bibliografici

- 1) Quercini L, Brunetti J, Riolo G, et al. An antimicrobial molecule mitigates signs of sepsis in vivo and eradicates infections from lung tissue. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):192-207
- 2) Forti F, Roach DR, Cafora M, et al., Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 May 25;62(6)
- 3) Cafora M, Deflorian G, Forti F, et al., Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. *Sci Rep.* 2019 Feb 6;9(1):1527
- 4) Casciaro B, D'Angelo I, Zhang X, et al. Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: in Vitro and in Vivo Studies. *Biomacromolecules* 2019, 20, 5, 1876-1888
- 5) Gomez CCS, Parazzi PLF, Clinckspoor KJ et al. Safety, Tolerability, and Effects of Sodium Bicarbonate Inhalation in Cystic Fibrosis. *Clin Drug Investig* 2020 Feb;40(2):105-117



IL FUTURO: LA FIBROSI CISTICA CHE MALATTIA SARÀ?

Prof. Carlo Castellani
Istituto "G. Gaslini", Genova

So what is our mission? The answer to this is, I think, simple. It is to empower children and adults with cystic fibrosis to be the people they want to be.

[Dal discorso del professor Stuart Elborn in occasione della consegna del premio della Società Europea Fibrosi Cistica 2019].

"Qual è allora la nostra missione? Credo che la risposta sia semplice. È mettere in grado bambini ed adulti con fibrosi cistica di essere le persone che desiderano essere". Questa frase esprime in modo chiaro e diretto l'obiettivo ultimo per chi lavora nel campo della fibrosi cistica, sia nella clinica che nella ricerca. È un obiettivo ambizioso, che si può perseguire con modalità e strategie diverse, ma che non può prescindere da una visione del futuro sulla quale impostare le proprie azioni nel presente. Pensare il futuro è un'attività con ampi margini di errore, ma anche un esercizio irrinunciabile, oggi forse ancora più che in passato. Quello che segue esprime ipotesi, speranze e alcuni timori sul futuro della fibrosi cistica.

1. Dall'adulto all'anziano?

La sempre migliore comprensione della fibrosi cistica, terapie personalizzate e un sistema di diagnosi e cura dedicato hanno fatto sì che oggi chi da questa malattia è affetto possa aspirare ad attese di vita come mai in passato, con prospettive di ulteriori significativi miglioramenti. Nei prossimi anni servirà ancora più investire in programmi di transizione dalla presa in carico pediatrica a quella dell'adulto, nello sviluppo di centri e nella formazione di personale qualificato ad affrontare problematiche dell'adulto, come le

scelte riproduttive, l'accesso al lavoro più adatto alle singole condizioni di salute, la gestione di fasi avanzate della malattia.

Anche attenzione alle diagnosi in età adulta e capacità nella gestione prima e spesso anche dopo un trapianto andranno sempre più coltivate.

Un problema di strutture e di competenze

È verosimile che nei primi anni di vita la presa in carico si focalizzerà sempre più sul prevenire lo sviluppo delle manifestazioni cliniche della malattia. La maggior quota di assistenza sarà però rivolta agli adulti che già oggi, almeno dove i sistemi di cura sono ben sviluppati, costituiscono la maggioranza delle persone con fibrosi cistica. L'analisi dei dati dei registri europei di patologia prevedevano dal 2010 al 2025 un aumento del 75% dei pazienti adulti, già in larga misura verificatosi (Figura 1), e che potrebbe rivelarsi ancora più significativo per l'utilizzo sempre più diffuso delle terapie con modulatori.

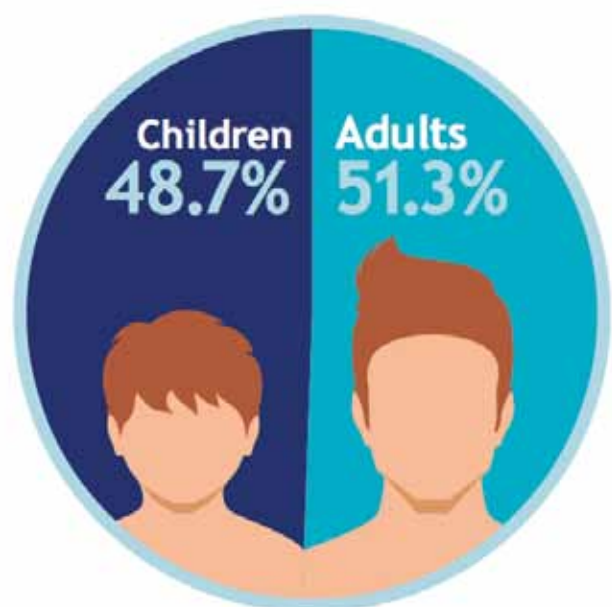


Figura 1. Proporzioni di bambini e adulti su 48.000 pazienti con fibrosi cistica (dati Registro Europeo 2017).

Trovare per queste persone la collocazione più adeguata non è stato e non sarà di facile realizzazione, poiché occorrono sia strutture che uniscano i requisiti logistici indispensabili per una corretta segregazione che la disponibilità ad integrare nella loro abituale pratica di cura il complesso sistema multidisciplinare che costituisce lo standard di cura per la fibrosi cistica.

I pazienti adulti possono essere seguiti con competenza anche nei cosiddetti "centri misti", che si prendono carico di ogni età. È una soluzione che presenta alcuni vantaggi, ma certamente non è semplice per una struttura di media dimensione che segua 200-300 pazienti sviluppare al proprio interno le competenze per seguire tutti gli aspetti della malattia dalla nascita ai 50, 60 o anche 70 anni.

Come si curerà la fibrosi cistica?

L'aumento della sopravvivenza è un obiettivo continuamente perseguito ed un risultato importante, ma implica una maggior complessità della cura, anche per l'emergere di tossicità a lungo termine da farmaci e per la comparsa di microorganismi non abitualmente presenti in fibrosi cistica e di resistenze agli antibiotici usati più comunemente.

Inoltre, il numero sempre maggiore di persone con fibrosi cistica che nei prossimi anni raggiungerà età avanzate e che verosimilmente beneficerà di un recupero perlomeno parziale di funzione della proteina CFTR, grazie alle nuove terapie, potrebbe manifestare complicanze diverse, che già oggi cominciano ad emergere. Tumori gastrointestinali, ma anche obesità, ipercolesterolemia, patologia cardiovascolare, che nella popolazione generale costituiscono una porzione non trascurabile di patologia e di mortalità, potrebbero essere conseguenze non desiderate dell'avvicinamento alla "normalità" della crescente componente adulta della popolazione con fibrosi cistica.

Alcuni suggerimenti nutrizionali che sono stati e tuttora sono parte essenziale del miglior controllo della fibrosi cistica, come la dieta ipercalorica e ad alta componente salina, costituirebbero per chiunque non sia affetto da questa patologia un considerevole fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. Non è ancora il momento di rinunciare ad una strategia nutrizionale che nelle persone con fibrosi cistica contribuisce alla crescita prima e al controllo della salute poi, ma è possibile che in un futuro non lontano si possa e si debba almeno parzialmente modificarla.

Chi curerà la fibrosi cistica?

Questa malattia che cambia non può non sollevare la domanda su quale sarà la figura medica che in futuro meglio potrà coordinare le molte professionalità che sostengono l'attività di un centro fibrosi cistica. Nei modelli di cura del passato più lontano la presa in carico era principalmente a cura di pediatri con prevalente interesse gastroenterologico, perché le primissime manifestazioni di una malattia che consentiva una sopravvivenza molto breve erano nutrizionali. Con il miglior controllo dell'aspetto gastrointestinale, sono sempre più emersi i problemi respiratori, e sono stati i pediatri con competenze pneumologiche ad assumere un ruolo preminente, seguiti poi, con l'avanzare dell'età dei pazienti, da pneumologi dell'adulto.

Non è prevedibile quale potrà essere tra dieci anni il tipo di competenza medica intorno alla quale si possano raccogliere le altre pur sempre indispensabili discipline, ma il ruolo del clinico internista potrebbe diventare sempre più centrale quando, auspicabilmente, il controllo della malattia polmonare diventasse più agevole e viceversa le complicanze metaboliche più frequenti.

2. Nuove strategie di ricerca clinica

Tipologia di mutazioni, limiti di età e non rimborsabilità rendono non usufruibili le terapie con farmaci modulatori per una parte non trascurabile delle persone con fibrosi cistica. Anche se e quando questi ostacoli venissero risolti, i modulatori attualmente disponibili sembrano rallentare ma non bloccare la perdita di funzione polmonare. È quindi verosimile che chi abbia già sviluppato complicanze polmonari avrà ancora bisogno di farmaci che controllino infezione ed infiammazione.

Esiste un "unmet need", vale a dire un bisogno di salute non soddisfatto, che rende sostanziale la necessità di continuare a investire nello sviluppo di nuove terapie e strategie di ricerca. Le modalità di ricerca di base potrebbero nel prossimo futuro seguire percorsi già in parte tracciati, ma per la fase finale dello sviluppo di nuove terapie, e cioè i trial clinici, servirà pensare ad una diversa progettualità (Figura 2).



Figura 2. Processo di sviluppo di un nuovo farmaco

Le fasi 1-4 riguardano i trial clinici.

(da brochure informativa Clinical Trial Network).

Mutazioni rare

Nei geni CFTR delle persone con fibrosi cistica sono state identificate più di mille mutazioni rare, delle quali molto spesso non è noto il meccanismo d'azione. Queste mutazioni o le proteine che esprimono potrebbero forse essere trattate con terapie già disponibili e dimostrate sicure in altri pazienti, ma la loro rarità rende impossibile testarle in trial clinici di fase III, che di solito coinvolgono centinaia di individui. In questi casi un approccio alternativo potrebbe consistere nel consentirne l'uso se in laboratorio le stesse terapie si fossero dimostrate efficaci su cellule che esprimano mutazioni rare, anche originate dai pazienti stessi (vedi pagina 18).

Terapie nei bambini

Le sperimentazioni cliniche di modulatori in età pediatrica sono indispensabili per capire se si possa iniziare a trattare con questi farmaci alla nascita o poco dopo e quindi potenzialmente ottenere le migliori possibilità di controllo della malattia. I trial nei bambini piccoli sono complessi da eseguire, sia per la scarsa collaborazione che per l'impossibilità di valutare i risultati clinici con gli strumenti abitualmente utilizzati, come spirometria e monitoraggio delle infezioni. Anche nei bambini più grandi, che oggi molto spesso godono di grande stabilità clinica, questi strumenti possono essere inadeguati. Nuovi biomarcatori clinici, come il *Lung Clearance Index*, sono stati sviluppati, ma sono ancora poco utilizzati. Servirà diffonderne l'uso, ma anche identificare altre modalità per comprendere se i composti testati siano realmente utili ed efficaci.

Modelli di sperimentazione

Chi già utilizza un modulatore efficace dovrebbe sospenderlo prima dell'inizio della sperimentazione di un nuovo farmaco della stessa categoria (*wash-out*), senza poi neppure il beneficio di assumere il farmaco sotto studio se terminasse nel braccio che assume placebo. Ciò potrebbe comportare per un periodo anche non breve un minor controllo della malattia, e quindi rendere difficile il reclutamento di malati. D'altro canto, nuovi modulatori sarebbero più efficacemente valutati se confrontati non con placebo ma con farmaci analoghi già disponibili. Dati i costi di questi ultimi, ciò implica una spesa considerevole per industrie farmaceutiche di piccole dimensioni, che potrebbe limitare la proposta di nuove sperimentazioni e frenare lo sviluppo di nuove terapie.

Attrattività dei trial clinici

Oggi l'interesse e quindi il reclutamento dei pazienti è fortemente sbilanciato verso linee di ricerca e sperimentazioni cliniche con terapie che recuperano funzione di CFTR. Tuttavia, fino a quando non sarà possibile un completo recupero sin dai primi giorni di vita, e forse anche dopo aver raggiunto questo obiettivo, potranno ancora essere necessarie terapie antibiotiche, antiinfiammatorie e mucolitiche. Le sperimentazioni cliniche che si concentrano su questi aspetti potrebbero essere percepite come meno prioritarie dai pazienti, e quindi incontrare problemi nel loro reclutamento.

Sinergie

L'esperienza della triplice combinazione elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta) ha mostrato che, almeno per i genotipi che includono una copia della mutazione F508del, è necessaria

l'associazione di più composti. Potenzianti, correttori, amplificatori, inibitori dell'ENaC, consentono migliori risultati se somministrati in forma di unica terapia. Poiché questi farmaci saranno prodotti da industrie in competizione, sarà importante che si creino sinergie per identificare e produrre la combinazione ottimale. Lavorare insieme sarà anche sempre più necessario a livello dei centri che fanno ricerca clinica. Esistono già network sia europei (*Clinical Trial Network*) (Figura 3) che nordamericani (*Therapeutics Development Network*) che riuniscono centri di eccellenza e coordinano numerosi aspetti legati alla ricerca clinica, come la valutazione della fattibilità delle singole sperimentazioni, la selezione di quelle più prioritarie, la creazione di protocolli condivisi. Sarà importante allargare questi network ad altri centri e quindi offrire ad un maggior numero di persone la possibilità di partecipare ai trial clinici.

La persona malata al centro

Il tema delle sinergie rimanda ad un altro argomento, il coinvolgimento attivo delle persone con fibrosi cistica e delle loro famiglie nell'identificazione di priorità e nella programmazione della ricerca. Non si tratta semplicemente di parteci-

pare a trial clinici o supportare, direttamente o indirettamente, i costi della ricerca.

Queste sono sicuramente azioni indispensabili, ma è importante anche che chi è personalmente coinvolto dalla malattia abbia l'opportunità di esprimere opinioni che possano effettivamente orientare le linee di ricerca. Negli ultimi anni si sono moltiplicate le iniziative per esplorare i cosiddetti "*patient-centered outcomes*", cioè gli obiettivi di assistenza ma anche di ricerca che le persone con fibrosi cistica trovano prioritari. Inoltre, pazienti con competenze particolari vengono oggi consultati quando viene stilato il progetto per una sperimentazione clinica. Il ruolo dei pazienti nella progettualità della ricerca è però ancora limitato prevalentemente alla consultazione, manca un coinvolgimento più profondo, che nei prossimi anni sarà un obiettivo che le persone con fibrosi cistica dovranno perseguire se vogliono rivestire il ruolo centrale che spetta loro.

3. La fibrosi cistica in un mondo che cambia

I contenuti di questo articolo fin qui si basano su dati di fatto ben noti e su una loro interpretazione in chiave futura, che lascia spazio ad un certo grado di valutazione personale, ma che rispecchia comunque in larga parte opinioni diffuse nella comunità scientifica. Ben più difficile è immaginare un futuro nel cui contesto cambi non soltanto la fibrosi cistica, ma anche il mondo che la circonda. Difficile ad esempio prevedere come gli effetti a lungo termine della pandemia in corso influenzeranno le modalità con cui ci si prenderà carico delle persone con fibrosi cistica. È verosimile che COVID-19, in tempi ancora non prevedibili, sia controllata, forse anche eradicata, ma quello che è successo ci ha dimostrato che epidemie di questa portata possono accadere e allo stesso tempo ci ha resi consapevoli che inevitabilmente si ripeteranno. Eventi globali come questo richiedono una reazione anch'essa globale, con una risposta rapida, coordinata e condivisa, ed una circolazione efficace delle informazioni che la ricerca mette a disposizione.



Figura 3. Centri che partecipano al Clinical Trial Network Europeo (CTN).

Sarà anche necessario pianificare gli interventi che potrebbero essere necessari, e ciò potrebbe significare un trasferimento di parte degli investimenti per ricerca ed assistenza dalla patologia cronica a quella acuta e dall'ospedale al territorio. Se questo dovesse avvenire per le persone che convivono con o si prendono cura dei malati di fibrosi cistica, si prospetteranno criticità ma anche opportunità che andranno conosciute, interpretate e se possibile gestite. Quanto segue rappresenta una visione personale che, anche indipendentemente da quanto la pandemia cambierà il nostro futuro, esamina alcuni aspetti che dovremo considerare nei prossimi anni.

Accesso alle cure: universale?

Nei cosiddetti paesi in via di sviluppo l'attesa di vita delle persone con fibrosi cistica è fino a meno della metà rispetto alle nazioni economicamente più agiate (Figura 4).

La discriminazione nell'accesso alle cure è però un problema di dimensioni globali, che non risparmia neppure nazioni ricche ed industrializzate. L'analisi dei registri di patologia di Canada e Stati Uniti ha mostrato che tra il 2009 ed il 2013 l'età mediana di sopravvivenza in Canada era di 10 anni superiore a quella degli Stati Uniti, una differenza in misura non trascurabile, correlata al tipo di copertura assicurativa assai problematica in USA. Nei paesi in buone condizioni economiche e con un sistema sanitario che copre omogeneamente tutti i cittadini il problema è più quello dell'accesso alle terapie che alle cure. Pur con differenze organizzative

da uno stato all'altro, il sistema di cura è logisticamente ben organizzato.

È invece variabile la disponibilità di alcuni dei nuovi farmaci che agiscono sul difetto genetico o sul deficit di funzione della proteina, che sono disponibili solo in alcune nazioni. Questa disomogeneità è legata in larga misura al costo elevato, ed è possibile che nei prossimi anni si accentui ulteriormente. L'incremento della spesa farmaceutica legata a terapie per le malattie rare è continuo e molti si interrogano sulla sostenibilità di un simile trend. Sarà probabilmente difficile continuare a garantire l'accesso a queste terapie senza una rimodulazione di quote e tempistiche dei rimborsi, meglio se a livello globale.

Il "clinical microsystem"

L'esperienza di molti anni ha dimostrato che per fornire uno standard di cura adeguato è essenziale quello che viene definito "clinical microsystem", un sistema complesso fondato sul centro fibrosi cistica multidisciplinare e sulle interazioni con la popolazione di pazienti e famiglie, le strutture di supporto, i fornitori di farmaci e strumenti. Il sistema può ottimizzare le cure, facendo uso della migliore evidenza clinica disponibile, stratificando i pazienti sulla base delle loro necessità ma anche considerandone le caratteristiche individuali. Il fulcro intorno al quale si coordinano tutte le altre componenti del sistema è il centro specialistico con personale esperto nei vari aspetti clinici della malattia e con le competenze professionali necessarie: medici, fisioterapisti, dietologi, psicologi, assistenti sociali. Si tratta senza dubbio di un

Children and adults whit CF in Europe

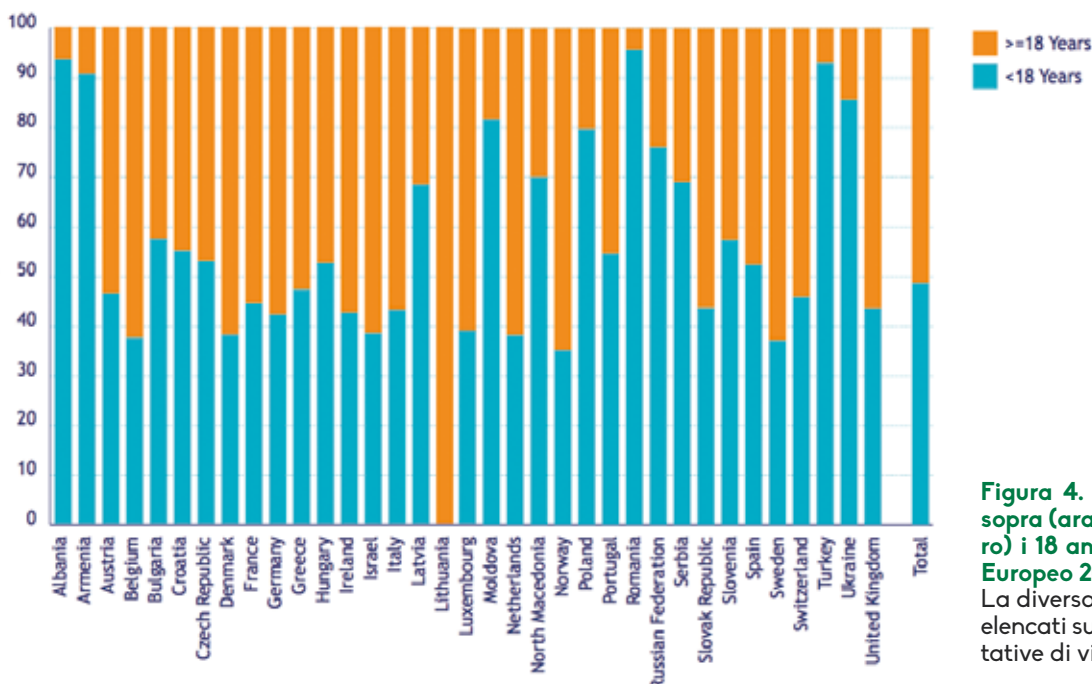


Figura 4. Rapporto tra pazienti sopra (arancione) e sotto (azzurro) i 18 anni (dal report Registro Europeo 2017). La diversa distribuzione nei paesi elencati suggerisce diverse aspettative di vita.

modello di successo, ma come per tutti i modelli è bene che sia periodicamente riconsiderato per valutare se sia ancora attuale e come eventualmente vada migliorato. A prescindere dall'inevitabile contrazione dei centri pediatrici a favore di quelli per adulti, il centro del futuro potrà ampliare la partnership con i pazienti per lo sviluppo di strategie per indirizzare le ricerche e ottimizzare le cure.

Telehealth

I sistemi di monitoraggio a distanza tramite audio e video connessioni utilizzati in telemedicina non sostituiscono le modalità tradizionali di cura, ma le possono integrare. L'evento pandemico in corso ha dato grande impulso a queste modalità, e può costituire l'occasione per renderla una componente permanente dell'offerta di cura.

La telemedicina consente la supervisione della corretta esecuzione di pratiche di cura, come inalazione di farmaci e fisioterapia respiratoria e il monitoraggio a distanza, tramite strumentazione fornita al paziente, dei risultati di spirometrie, saturimetrie, valori glicemici. Anche se la sua efficacia nel migliorare il controllo della malattia non è ancora stata pienamente dimostrata, il suo utilizzo presenta indubbi vantaggi in termini di riduzione del rischio di infezioni crociate e di controllo di malati che vivano lontano dal centro di riferimento.

Big data

Nel campo della ricerca biologica e medica si usa questo termine per definire enormi raccolte di dati generate dallo studio del DNA (genomica), dell'RNA (trascrittomica), delle proteine (proteomica) e di lipidi (lipidomica), peptidi ed aminoacidi (metabolomica). La riduzione dei costi di analisi, il minor tempo necessario ad eseguirle, metodiche di bioinformatica sempre più efficienti nel gestire ed interpretare grandi quantità di dati consentiranno di identificare percorsi fisiologici e patologici dei network biologici. I ri-

sultati potranno essere confrontati con elementi raccolti in registri e banche dati che contengono informazioni cliniche (fenotipo), risultati genetici (genotipo) e campioni biologici di moltissime persone con fibrosi cistica. Questo potrà portare a comprendere meglio la complessa regolazione dei processi biologici e dei fattori predisponenti alla malattia e a personalizzare le terapie con maggiore accuratezza di quanto sia possibile oggi.

Conclusioni

Per concludere, è ancora una volta importante ricordare quanto possa essere complesso e sia inevitabilmente approssimativo interpretare il futuro della fibrosi cistica, pur basandosi più sui dati della realtà odierna che sulle interpretazioni personali e senza confondere il "cosa sarà" con il "cosa dovrebbe essere". Molto ancora non sappiamo, ma l'urgenza di costruire sinergie per la ricerca, di condividere standard di cura ma anche opinioni di professionisti e pazienti, il diffondersi dei controlli di salute a distanza, ci indicano la necessità di un sistema che consenta di mantenere in contatto e far lavorare insieme molti elementi diversi e distanti. La pandemia ci ha portato a rinchiuderci, fisicamente ma non solo, e forse a pensare ad un mondo più chiuso, a realtà più isolate.

Credo al contrario che il futuro della fibrosi cistica non possa prescindere da una sempre maggior connessione e condivisione, che costituirebbe non solo uno strumento per migliorare il "sistema ricerca e cura", ma anche una opportunità perché la persona con fibrosi cistica possa assumere una posizione ancora più centrale ed attiva.

Riferimenti bibliografici

- Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 2018; 17:153-178
- Stephenson AL, Sykes J, Stanojevic S, Quon BS, Marshall BC, Petren K, Ostrenga et al. Survival Comparison of Patients With Cystic Fibrosis in Canada and the United States: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2017; 166:537-546
- Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020; 8:65-124
- Stern M, Bertrand DP, Bignamini E, Corey M, Dembski B, Goss CH, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Quality Management in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014; 13:S43-59
- Elborn JS, Bell SC, Madge SL, Burgel PR, Castellani C, Conway S, et al. Report of the European Respiratory Society / European Cystic Fibrosis Society task force on the care of adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2016; 47:420-8
- Castellani C. Conclusion and Prospects: Genetics of cystic fibrosis - an agenda for the next ten years. *Arch Pediatr.* 2020; 27:eS45-eS47.
- Burgel PR, Bellis G, Olesen H, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J* 2015; 46: 133-141
- Davies JC, Drevinek P, Elborn JS, Kerem E, Lee T et al. J Cyst Fibros. Speeding up access to new drugs for CF: Considerations for clinical trial design and delivery. *J Cyst Fibros.* 2019; 18:677-684

LA RICERCA FFC OLTRE IL CORONAVIRUS

Linee per un piano strategico triennale (2021-2023)

Prof. Gianni Mastella

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona

La pandemia che sta interessando l'intero pianeta sta dando una scossa senza precedenti all'attività di ricerca in tutto il mondo per trovare soluzioni farmacologiche e immunologiche per contrastare Covid-19. Chi segue e sostiene l'attività di questa Fondazione ci chiede se questo gigantesco investimento per la ricerca Covid-19, che pur alimenta l'interesse e le attese di tutti, non stia offuscando o rallentando la ricerca sulla fibrosi cistica, su cui molte speranze sono cresciute negli ultimi anni. Ci sentiamo di dire che non è venuto assolutamente meno l'impegno di ricerca FC né in Italia né altrove.

La Fondazione sta cercando di tirare le somme della sua attività di ricerca degli ultimi 18 anni per meglio definire il quadro degli sviluppi futuri, identificandone più puntualmente la loro collocazione di riferimento nel lavoro della comunità scientifica internazionale che a questo campo della medicina si dedica, con la consapevolezza che dai molti contributi, come pezzi di un complesso mosaico insieme convergenti, possono derivare le soluzioni attese. La prospettiva di ricerca che caratterizzerà i prossimi tre anni si può schematizzare in alcune linee strategiche, su cui coinvolgere la Rete di Ricerca FFC, compatibilmente con le risorse che la Fondazione riuscirà a mettere a disposizione, nonostante le difficoltà del momento che stiamo attraversando.

Linee strategiche per un piano triennale di ricerca FC condivisa (2021-2023)

1. Nuovi modulatori di CFTR mutata

Sono in causa gli studi che FFC ha portato avanti negli ultimi anni su composti e loro analoghi, mirati a recuperare la funzione di CFTR mutata, candidabili a trial clinici (tra queste il potente correttore derivato dal progetto strategico *Task Force for Cystic fibrosis*). Si tratta ora di orientarne la direzione verso possibili applicazioni, componendo i risultati

della rete FFC, ma anche reclutando eventuali partner, anche a livello industriale, in modo da contribuire a sviluppare un'utile alternativa terapeutica nel campo dei modulatori CFTR, possibilmente migliorativa, ma anche facilitandone economicamente l'accesso a tutti i malati.

2. Terapie per pazienti con mutazioni CFTR non trattabili con gli attuali modulatori

In Italia circa il 30% delle persone con FC non hanno indicazioni al trattamento con gli attuali modulatori, ma sono ancor più se consideriamo quelle che ancora non vi possono accedere per ragioni di bassa età. L'obiettivo è "una terapia per tutti". Si andrà per gradi, perché questo è un campo ancora piuttosto inesplorato. Il primo passo, già in corso, ha l'obiettivo di studiare la possibilità di trattare con gli attuali modulatori malati con mutazioni rare per le quali non si conosce ancora la potenzialità terapeutica di tali farmaci. Sotto lo stesso profilo saranno considerati quelli che potrebbero emergere nei prossimi anni.

Questa linea potrebbe implicare la creazione di servizi centralizzati, cioè di biobanche basate su modelli cellulari *ex vivo* (cellule da epitelio nasale e organoidi da staminali di mucosa nasale e rettale) per valutare *in vitro* la candidabilità di mutazioni CFTR orfane al trattamento con attuali modulatori.

3. Terapie basate su DNA editing o RNA editing

È il nuovo approccio di terapia genica, con tecnica CRISPR/cas9 o tecniche derivate, che tende a modificare il codice genetico (DNA o RNA) nei punti di mutazione CFTR patogena, con implicazioni anche per il trattamento di mutazioni rare e orfane. Questo sarà un percorso piuttosto lungo ma tre anni serviranno a gettare le basi teoriche e sperimentali, già peraltro ben avviate da alcuni progetti FFC, per una correzione genica riproducibile, duratura e sicura. Un aspetto importante sarà quello di individuare i vettori più adeguati per

il trasferimento all'organismo dei costrutti di ingegneria genetica prodotti in laboratorio.

4. Avvio di possibili *task forces* per portare a sperimentazione clinica strategie antibatteriche verso patogeni emergenti o multiresistenti

In ciò si dovrà selezionare il meglio che è emerso sinora dalla produzione scientifica FFC orientandolo verso applicazioni cliniche. Un primo passo sarà una *task force* per il trattamento di micobatteri non tubercolari abitualmente resistenti ai correnti antibiotici.

5. Sviluppo di studi clinici post-marketing (studi di fase IV)

Si tratta di valutare su larghi numeri di malati ciò che avviene nell'applicazione alla vita reale delle terapie basate sui modulatori CFTR disponibili e già in uso. È importante misurare effetti benefici ma anche eventuali effetti collaterali avversi, che i trial clinici formali, di limitata durata, potrebbero non aver evidenziato. Questi studi potrebbero contribuire a validare in modo indipendente l'affidabilità di questi nuovi trattamenti, particolarmente nei soggetti con malattia più severa, non considerati nei trial clinici di fase III, oggi peraltro in trattamento "compassionevole". Questo implicherà uno sforzo organizzativo notevole e il coinvolgimento dei Centri FC nonché di alcune realtà istituzionali, come la Società Italiana FC (SIFC), l'AIFA e il Registro Italiano FC (presso Istituto Superiore Sanità).

6. Implementazione di un piano strategico per lo screening dei portatori sani FC

Si tratta di un progetto che può procedere per moduli e per fasi successive (informazione/educazione, aggregazione di laboratori, qualificazione e condivisione di test, identificazione di risorse per la consulenza genetica), con l'obiettivo di favorire una dimensione più razionale, omogenea e affidabile al processo di screening dei portatori FC in Italia, con l'obiettivo di supporto alla procreazione responsabile.

7. Implementazione di nuovi percorsi di formazione e di divulgazione scientifica

L'ambito formativo terrà in considerazione i bisogni di ricerca clinica, ancora marginale in Italia, in cui potrebbe essere coinvolta la nuova generazione di medici e di altro per-

sonale attivo presso i centri FC. Ma riguarderà anche i ricercatori di laboratorio, per meglio integrarne la cultura di accostamento alle applicazioni cliniche.

La divulgazione scientifica, già molto attiva nell'impegno FFC, cercherà di meglio identificare i target cui rivolgersi ma anche gli strumenti e le modalità con cui renderla più accattivante e produttiva.

8. Verso più stretta collaborazione con altre organizzazioni attive in campo FC

Quella di un'interazione più organica con altre organizzazioni che si occupano di FC in Italia (in particolare, Società Italiana FC - SIFC e Lega Italiana FC - LIFC, ma anche altre associazioni e istituzioni in varia misura implicate) è un'esigenza avvertita da sempre ma che ha trovato sinora più ostacoli che facilitazioni. Questo rimane per ora un bisogno più che un piano, che probabilmente dovrà passare attraverso lo sviluppo di alcune iniziative in comune, tutte da inventare.

Questo è un piano proposto dalla Direzione Scientifica di questa Fondazione, che verrà discusso con il Comitato Scientifico e con la Commissione Medica FFC. La Fondazione dovrà misurare le proprie forze e la possibilità di reperire risorse umane ed economiche adeguate prima di intraprendere nel 2021 un tale percorso, immaginato oggi come impegno strategico post-pandemico.

NOTE



Dr. Michele Gangemi
Associazione Culturale Pediatri
Comitato Etico Az. Ospedaliera Universitaria, Verona

Il Dr. Gangemi, componente della Commissione medica FFC, come tutti i relatori di questo seminario, ha collaborato all'impostazione metodologica e formativa del seminario stesso.



Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
fibrosicisticaricerca.it

**NOI,
SENZA RESPIRO
DA SEMPRE.**

**FA' CHE NON SIA
PER SEMPRE.**

Il tuo 5x1000 a FFC

|9|3|1|0|0|6|0|0|2|3|3|

Emma Cascone, 11 anni, malata di fibrosi cistica. Foto Alberto Giuliani

Per donare

- Online sul sito: fibrosicisticaricerca.it
- Bonifico Unicredit Banca (senza commissione presso questi sportelli):
IT 47 A 02008 11718 000102065518
- SWIFT-BIC code (per pagamenti dall'estero) **UNCRITM1N58**
- Banco BPM
IT 92 H 05034 11708 000000048829
- c/c postale n. **18841379**
- 5x1000 alla FFC n. **93100600233**

Le donazioni effettuate a favore di Onlus comportano il diritto di usufruire di alcune agevolazioni fiscali, così come previsto dal nostro sistema tributario.

Per approfondire: fibrosicisticaricerca.it/sostieni-la-fondazione nella sezione **benefici fiscali**.



DONARE CON FIDUCIA

FFC aderisce all'Istituto Italiano della Donazione che ne attesta l'uso trasparente ed efficace dei fondi raccolti, a tutela dei diritti del donatore.