

NUOVI ORIENTAMENTI DI TERAPIA IN FIBROSI CISTICA

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia genetica multiorgano che colpisce gli epitelii secernenti e/o assorbenti. Viene considerata la più diffusa malattia genetica a prognosi severa trasmessa per via autosomica recessiva.

L'incidenza della FC è di 1:2500 nella etnia bianca. In Italia, l'incidenza di tale patologia è 1:4.238 con notevoli differenze regionali; elevata è la frequenza di portatori sani che è di 1:25- 1:30.

Il miglioramento del trattamento e la diagnosi precoce, insieme con il riconoscimento di forme lievi e asintomatiche e di forme atipiche, hanno portato ad un aumento della vita media. In Italia, dai dati più recenti del Registro Italiano, il 43% del paziente ha più di 18 anni.

La FC, essendo una malattia multisistemica, richiede un approccio terapeutico complesso e polivalente.

Negli ultimi decenni, i capisaldi della terapia, che hanno mostrato sostanziali modifiche nella qualità e nella quantità della vita dei pazienti è stata la possibilità di controllare la flogosi iniziale e l'infezione respiratoria, il trattamento costante e aggressivo delle complicanze respiratorie, la fisioterapia e la riabilitazione respiratoria, l'uso di enzimi pancreatici ad alte dosi, gli estratti vitaminici insieme ad un sostegno nutrizionale importante.

Dalla scoperta del gene, situato sul braccio lungo del cromosoma 7 che codifica per una proteina denominata CFTR che funziona da canale del cloro a livello delle cellule epiteliali si è cercato di individuare nuove terapie.

Inoltre, la conoscenza della cascata di eventi che portano dal difetto della proteina alle alterazioni dei diversi organi ed infine la conoscenza di "geni modificatori" che contribuiscono all'evidenziarsi delle diverse manifestazioni cliniche rappresentano le più grosse novità in tema di fisiopatologia.

In definitiva a partire dal difetto di base si ha una disfunzione della proteina CFTR, cui seguono un difetto nella secrezione del cloro ed un eccessivo riassorbimento di sodio da parte degli epitelii, l'accumulo di secrezioni spesse nelle vie aeree che predispongono ad infezioni ed infiammazione polmonare.

Sono in continua evoluzione anche gli approcci terapeutici che si basano sulla correzione del difetto di base o ai meccanismi direttamente collegati ad esso come l'infiammazione.

TERAPIA GENICA

Essa consiste nel trasferimento di copie di gene CFTR normale nelle cellule bersaglio malate attraverso vettori. Il trasferimento genico potrebbe avvenire attraverso vettori virali e non. I primi studiati furono i **vettori virali** nel cui genoma viene inserita la sequenza codificante per la proteina CFTR umana. I primi considerati furono gli Adenovirus che però hanno dato problemi per la loro immunogenicità infatti essi stimolavano la produzione anticorpale e una risposta citotossica da linfociti T da parte delle cellule ospitanti. Negli ultimi tempi ha riscontrato più successo l'utilizzazione di un virus, **ADENOVIRUS ASSOCIATO (AAV)**, un parvovirus a DNA a singola elica, naturalmente incapace di replicarsi e non responsabile di alcuna malattia nell'uomo ma che si integra con il DNA cromosomico. Alcuni recenti studi hanno dimostrato una buona efficienza ed anche una certa sicurezza nell'utilizzo di AAV, in quanto dosi ripetute venivano ben tollerate dai pazienti.

I **vettori non virali** sono rappresentati dai liposomi che non elicitano una risposta immunitaria ma hanno una scarsa efficacia a causa della difficoltà di penetrazione nel nucleo.

Va detto che parecchi **ostacoli** sono ancora da superare per ottenere una migliore efficienza di trasferimento genico: tra questi, la risposta immunitaria dell'ospite, la barriera del muco, il punto di attacco alla superficie apicale delle cellule respiratorie e il trasporto del vettore e/o del DNA esogeno entro la cellula per raggiungere il nucleo, sede di trascrizione dei geni.

La risposta immunitaria dell'ospite è direttamente proporzionale alla dose dei vettori virali e limita anche la possibilità di successive somministrazioni. Inoltre la risposta anticorpale verso le proteine virali può neutralizzare il vettore prima che esso infetti le cellule, mentre la risposta dei T linfociti tende a rimuovere le cellule infettate. Sono stati comunque tentati esperimenti per superare questi ostacoli come il rivestimento del vettore con glicole polietilenico o con altri mezzi.

Poi vi è la **difficoltà nel raggiungere la cellula bersaglio**. Prima di tutto bisogna superare il muco spesso che può bloccare ed imbrigliare il vettore prima che raggiunga la superficie cellulare; per far fronte a ciò si può utilizzare la alfa-dornasi. I vettori di trasferimento genico si legano a recettori di superficie e il legame può essere impedito dai glico-coniugati della membrana apicale. Per gli adenovirus i recettori di membrana sono scarsamente presenti a livello apicale ma molto a livello basocellulare; questo sito è difficile da raggiungere per la presenza delle giunzioni strette ("tight junction") tra le cellule che però non possono essere aperte perché l'utilizzo di mezzi chimici a tale scopo potrebbe essere tossico.

Ancora **l'efficacia del trasferimento genico** appare legata al numero di cellule respiratorie che si riescono ad infettare; la correzione dal 10 al 20% delle cellule epiteliali sembra sufficiente a riportare verso valori normali il trasporto del cloro (traguardo ancora lontano con i correnti vettori). Infine vi è il problema **di mantenere l'espressione del gene nel tempo** per ottenere il massimo del beneficio terapeutico. Il gene trasferito dai vettori nel nucleo delle cellule epiteliali respiratorie funziona come DNA extracromosomico (chiamato anche "episomico") e quindi non incorporato nel genoma replicante; per cui l'espressione dura quanto il turnover delle cellule epiteliali (circa 2 mesi); è necessario quindi ripetere la somministrazione.

Contro tutti questi ostacoli sono comunque in via di studio alcuni **interventi** come:

l'impoverimento del genoma virale delle sequenze codificanti per alcune proteine capsidiche;

interventi sul sistema immunitario dell'ospite con il fine di impedire l'attivazione dei linfociti CD4+;

l'ingegneria genetica sta disegnando **adenovirus capaci di presentare diverse molecole d'attacco** ai recettori cellulari, al fine di essere riconosciuti da recettori alternativi;

sono in corso di studio nuovi vettori virali, denominati **lentivirus**, che dovrebbero permettere il mantenimento dell'espressione genica perché integranti nel genoma dell'ospite;

infine, i vettori non virali potrebbero veicolare **minicromosomi** che presentano quelle caratteristiche che permettono loro, quando trasferiti nel nucleo, di replicarsi autonomamente e quindi di essere passati alle cellule figlie.

Ovviamente sia i vettori lentivirali integranti che i minicromosomi potrebbero essere sfruttati al meglio se accoppiati ad una **terapia cellulare**. Recentemente, sono stati pubblicati alcuni studi che hanno dimostrato la possibilità di cellule staminali ematopoietiche o stromali di migrare in polmoni di animali riceventi e di diventare epitelio respiratorio. Poiché l'efficienza di tale processo è molto bassa, gli studi stanno proseguendo nel cercare di comprendere quali sono gli stimoli alla migrazione e come queste cellule possano "trasformarsi" in altre non appartenenti alla loro normale linea differenziativa. Comunque, già alcuni risultati promettenti sono stati ottenuti in vitro con cellule provenienti da midollo osseo di pazienti FC.

TERAPIE FARMACOLOGICHE DEL DIFETTO CFTR

Insieme alla terapia genica contemporaneamente si sta lavorando sulle terapie farmacologiche del difetto CFTR. Sono due i filoni da seguire: il primo consiste **nell'attivazione della proteina CFTR**, il secondo nell'**attivare canali del cloro alternativi**.

Attivazione della proteina CFTR mutata

E' ormai noto che le mutazioni della FC sono circa 2000 e che esse vengono divise in 6 classi. Le prime tre (I,II,III) sono dette severe perché determinano una lieve o mancata regolazione del trasporto ionico mentre le altre tre (IV,V,VI) sono lievi perché sono associate a residua funzione della proteina e quindi ad una forma più lieve di malattia.

Da studi recenti si è visto che solo il 10% di proteina CFTR funzionante fa sì che i sintomi in vivo migliorino; quindi è sufficiente anche recuperare la proteina almeno in parte.

Si utilizzano farmaci a seconda del tipo di difetto di base. Queste terapie possono essere diverse in base alla classe di mutazione

Nel caso di **mutazioni di I classe** si utilizza la *correzione della terminazione prematura di sintesi CFTR*. Tali mutazioni portano ad interruzione prematura della sintesi di proteina CFTR (presenti nel 10% della popolazione); si utilizzano gli aminoglicosidi ed in particolare la gentamicina per azione topica sulla mucosa nasale o intramuscolare. Un trial clinico ha mostrato un certo effetto nell'aumentare la proteina CFTR funzionante mediante la differenza di potenziale nasale.

Sicuramente in futuro questa potrebbe essere comunque una strada da seguire per quanto riguarda queste mutazioni.

Altri studi invece si riferiscono alla **ΔF508** che è la mutazione più frequente (70% della popolazione) ed appartiene alla **II classe**. Questa mutazione consiste in una delezione di fenilalanina in posizione 508 e ciò comporta un difettoso ripiegamento della proteina CFTR, che non riesce a raggiungere la membrana apicale e viene degradata dal complesso proteolitico citoplasmatico.

Attraverso test di screening ad elevata capacità si cerca di identificare qualsiasi sostanza in grado di aumentare la funzione della CFTR. Sono stati identificati diversi composti e classificati in potenziatori, correttori, o molecole con entrambi gli effetti. Per "correttore" dobbiamo intendere una sostanza che permette un'adeguata interazione della CFTR nascente con le proteine chaperons del reticolo endoplasmico. Questo permetterebbe di essere indirizzata in maniera corretta alla superficie cellulare. Un "potenziatore" è invece una sostanza che aumenta la funzionalità della CFTR una volta che questa è esposta sulla membrana, ma che non funziona correttamente. Nel caso della ΔF508 sono probabilmente necessarie molecole con entrambe le attività, visto che questa forma mutata presenta entrambi i difetti.

Infine un ulteriore approccio relativo alle mutazioni di classe III (difettoso trasporto di Cloro) consiste nella *stimolazione delle funzioni del canale del Cloro*. La genisteina ha mostrato la capacità di allungare i tempi di apertura dei canali del cloro. L'amiloride che inibisce il riassorbimento del sodio si è dimostrato correttivo della composizione del liquido superficiale epiteliale, grazie al suo effetto di segregazione del sodio a livello luminale. E' stato dimostrato che l'amiloride, come anche l'UTP, migliora la clearance muco-ciliare.

Attivazione di canali del cloro alternativi

Un'altra strategia per tentare di correggere il difetto di base consiste nell'utilizzare farmaci che stimolando altri canali del cloro compensino la CFTR anomala. Sono state utilizzate le sostanze note con i nomi MOLI 1901 e INS 37217 per via aerosolica; esse stimolano la secrezione di cloro a livello di membrana apicale delle cellule respiratorie.

TERAPIA ANTIINFETTIVA

Il perno centrale della terapia antimicrobica rimane il trattamento dello *Pseudomonas* sia in corso di prima colonizzazione che poi durante l'infezione cronica .

Il trattamento della prima colonizzazione di effettua con la tobramicina per via aerosolica in associazione con un fluorochinolonico. Sono in corso numerosi trials sull'utilizzo della tobi in corso di prima colonizzazione da *Pseudomonas*.

Standardizzati sono invece i cicli antibiotici per os o endovena nel corso di infezioni croniche.

Da non dimenticare gli sforzi sempre in aumento riguardanti la prevenzione dell'infezione da *Pseudomonas*. Vi è in corso un studio randomizzato in doppio cieco che coinvolge 46 Centri in Europa e che darà i primi risultati dopo l'estate del 2006.

TERAPIA ANTIINFIAMMATORIA

Ormai da tempo è notorio come l'infiammazione gioca un ruolo rilevante nella patogenesi del danno polmonare in FC per cui il suo trattamento è diventato indispensabile.

Inizialmente si è puntato molto sugli steroidi, il cui uso è comunque sempre limitato per la notevole presenza di effetti collaterali. Si sono utilizzati pure FANS, che in assenza di effetti collaterali, hanno però una minore efficacia degli steroidi. Allora per combattere la disregolazione dell'infiammazione in FC sono state attuate strategie più specifiche

Sono in corso numerosi trias con l'utilizzo di:

- 1) un inibitore di leucoproteasi secretoria ricombinante e di alfa-1 antitripsina che neutralizzano l'effetto dell'elastasi liberata dai neutrofili nei secreti bronchiali;
- 2) interleuchina 10 che riduce la risposta neutrofila;
- 3) il gamma interferone, che ristabilisce la sintesi di ossido nitrico, sostanza con elevato potere antibatterico ed antinfiammatorio, che sembra sia ridotto in FC, e potrebbe indirizzare in maniera ottimale la risposta immunitaria linfocitaria allo *Pseudomonas*, che è disregolata nella FC.

Un'altra recente prospettiva riguarda l'utilizzo degli acidi grassi polinsaturi, in particolare l'**acido docosaesaenoico** (DHA) che sembra sia ridotto in FC a favore di un aumento di acido arachidonico che ha effetto favorente l'infiammazione attraverso aumento dei suoi metaboliti, i leucotrieni. Si sta quindi attivando uno studio con dosi elevate di DHA in pazienti FC.

Per finire ormai ha un ruolo cardine nel trattamento dell'infiammazione l'utilizzo dell'**azitromicina**, macrolide con un'elevata azione antinfiammatoria. Essa riduce la sintesi dei fattori di virulenza di *Pseudomonas* e di alginato, e riduce la produzione di citochine infiammatorie. Sono stati effettuati diversi trias clinici con l'utilizzo di azitromicina che hanno dato buoni risultati.

TRAPIANTO

Un capitolo rilevante, da non sottovalutare, di grosso investimento per il futuro è rappresentato dal trapianto polmonare ed epatico.

CONCLUSIONI

Da quanto detto si vede come sono diversi i campi sui quali la ricerca scientifica in FC è rivolta e deve ancora indirizzarsi. Le terapie finora attuate comunque sono sicuramente state efficaci per aumentare di molto la sopravvivenza. Il mondo scientifico tutto della FC, i laboratori di genetica e di biologia molecolare, i centri dove si effettua ricerca di base sono impegnati, oggi, nella ricerca di nuove strategie che potrebbero correggere e modificare non solo il difetto di base della FC ma soprattutto la storia naturale della malattia; inoltre appare evidente come queste ricerche debbano essere sinergiche e sicuramente indispensabile sarà l'utilizzo di più farmaci che agiscono su bersagli diversi.

Maria Lucia Furnari*, Massimo Conese^o, Francesca Pardo*

*Centro Regionale FC – 2° U.O.Pediatria Ospedale “G. Di Cristina” – ARNAS – Palermo

^o Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis H.S. Raffaele Milano
Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Foggia.

(pubblicato su Orizzonti FC n. 3/2006)