La storia di 40 anni di ricerca scientifica sul gene CFTR

Riccardo Valerio De Biase
U.O.C. Fibrosi Cistica

150
1869
2019
Bambino Gesù
OSPEDALE PEDIATRICO

ANNI TRENTA
FIBROSI CISTICA: PRIMA DESCRIZIONE

Durante gli anni Trenta alcuni bambini con la cosiddetta "sindrome celiaca" presentavano all'autopsia anomalie pancreatiche. Dorothy Andersen, patologa di New York, ha esaminato questi casi e li ha descritti come "Malattia fibrocistica del pancreas".

Dorothy Andersen

Andersen, D. H. (1938) Cystic Fibrosis of the Pancreas and its relation to Celiac Disease:
a Clinical and Pathological Study.
American J Diseases of Children 56: 344.

STORIA DELLA FIBROSI CISTICA

Dal 1938 ad oggi, la FC è passata da una condizione senza speranza, fatale nella prima infanzia e nell'infanzia, a una condizione cronica che colpisce più adulti che bambini.

In Italia >6200 pazienti censiti al RIFC di cui >60% adulti*

*dati 2018 in pubblicazione

ANNI QUARANTA

- La FC venne descritta come una malattia generalizzata e viene coniato il termine di Mucoviscidosi (Sydney Farber).

- Sin da allora fu riconosciuta la modalità di ereditarietà autosomica recessiva.

ANNI QUARANTA

- **Paul di Sant'Agnese** in seguito alla perdita di sali subita da alcuni neonati FC durante l'ondata di caldo di New York del 1948, identificò in essi il maggiore contenuto di sale del sudore gettando le basi per quello che divenne il principale test diagnostico.

ANNI CINQUANTA

- **Leroy Matthews**, a Cleveland finanziato dai genitori di pazienti, introdusse un **"programma di trattamento completo e preventivo"** che prevedeva una diagnosi precoce, un programma per trattare tutti gli aspetti della malattia e la raccolta di dati per validare il trattamento
- La fisioterapia, sotto forma di **drenaggio posturale e percussioni**, è stata introdotta da **Harry Shwachman** , uno dei massimi esperti di FC e praticata nei Centri per molti anni.

Matthews LW, Doershuk CF, Wise M, Eddy G, Nudelman H, Spector S. A therapeutic regimen for patients with cystic fibrosis. J Pediatr 1964; 65:558-575

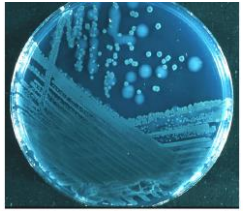
Doyle B. Physical therapy in treatment of cystic fibrosis. Phys Therapy Rev 1959; 39:24 – 27. (Prepared under the direction of Harry Shwachman)

ANNI SESSANTA
Associazioni e Società scientifiche

- Sono nate varie associazioni laiche e professionali. La prima, la US National CF Research Foundation (in seguito CF Foundation).
- Di Sant'Agnese nel 1965 fondò a Parigi l'Associazione scientifica Internazionale per la Fibrosi Cistica (Mucoviscidosi), ora "CF Worldwide" con gli obiettivi di **migliorare l'assistenza alle persone con CF, promuovere la ricerca e migliorare la conoscenza della malattia.**
- Nel 1969 venne formalizzato il gruppo scientifico di lavoro europeo per la fibrosi cistica "EWGCF"(in seguito rinominato : Società europea per la fibrosi cistica "ECFS").

ANNI SETTANTA

- A Toronto **Douglas Crozier**, abbandonò la tradizionale dieta a basso contenuto di grassi in favore di una **dieta ipercalorica** che però richiedeva di assumere 60-100 capsule di enzimi pancreatici al giorno per migliorare lo stato nutrizionale, la crescita e infine la sopravvivenza a lungo termine.
- A Copenaghen, **Niels Hoiby** ha dimostrato che l'infezione cronica da Pseudomonas comportava una prognosi peggiore e quindi ha introdotto la prassi di regolari cicli trimestrali di antibiotici per via endovenosa consentendo un miglioramento della sopravvivenza.



Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H. A comparison of survival growth and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. J Clin Epidemiol 1988; 41:588-591.

Hoiby N. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of Pseudomonas aeruginosa precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 1977; Suppl (262): 1-96.

ANNI OTTANTA

- **Paul Quinton**, dimostrò che l'anomalia della ghiandola sudoripara era causata dall'impermeabilità al cloruro.
- **Michael Knowles** dimostrando una differenza di potenziale anormalmente elevata nella mucosa nasale, fornì prove dirette della presenza di una disfunzione delle cellule epiteliali.
- **Lap Chi Tsui** ed altri nel 1989, identificarono sul cromosoma 7 il gene (CFTR) chiamato ” regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica”.

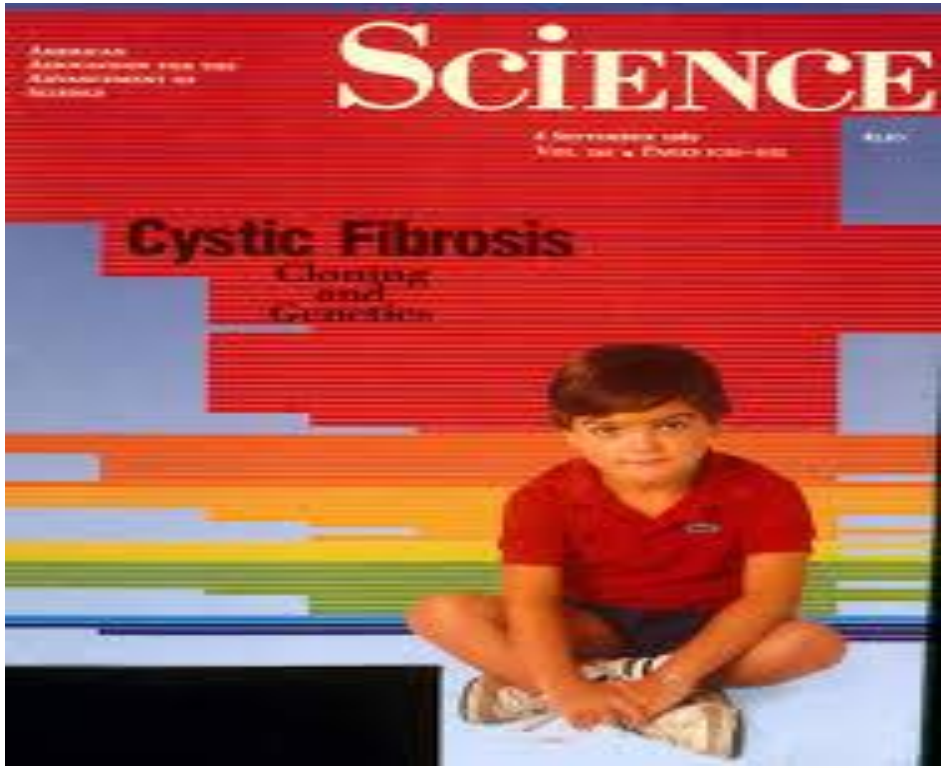
Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 1983; 301:421-422.

Knowles MR, Gatzy JT, Boucher RC. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. N Eng J Med 1981; 305:1489-1495.

Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK. Chakravarti A et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245:1073-1080.

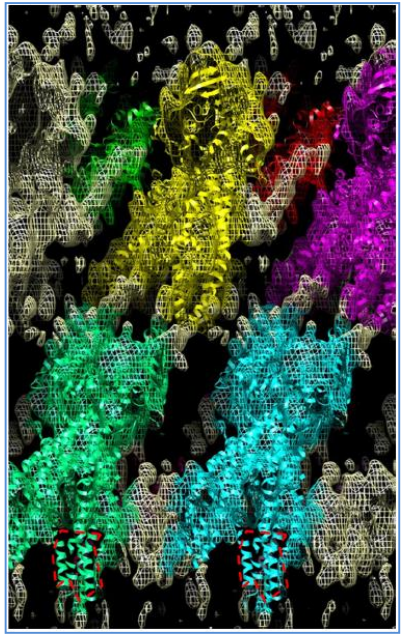
La Fibrosi Cistica: ieri

Nel 1989 scoperta del gene CFTR e del difetto di base della FC



La Fibrosi Cistica: ieri

Nel 1989 scoperta del gene CFTR e del difetto di base della FC



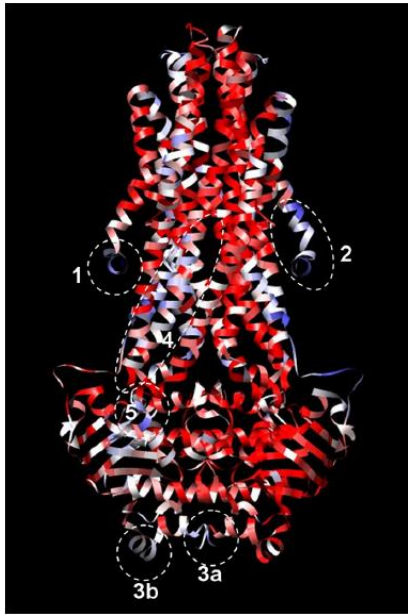
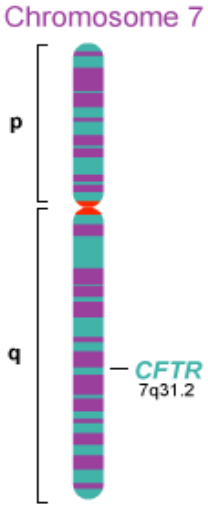


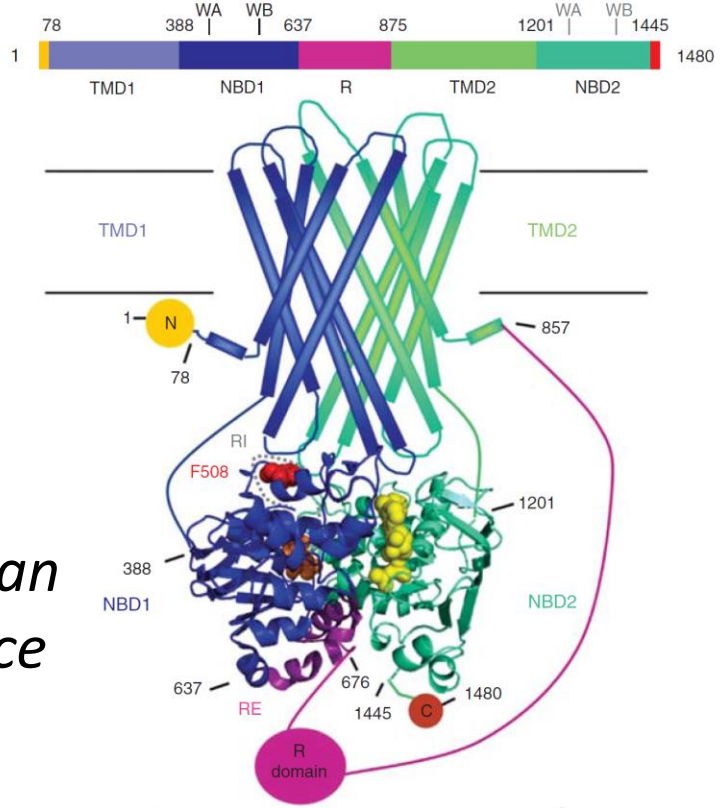
FIGURE 3. **CFTR three-dimensional map**

Rosenberg, Journal of Biological Chemistry 2011

CFTR



Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

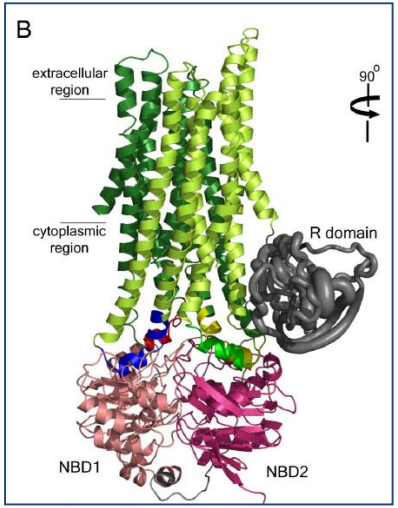


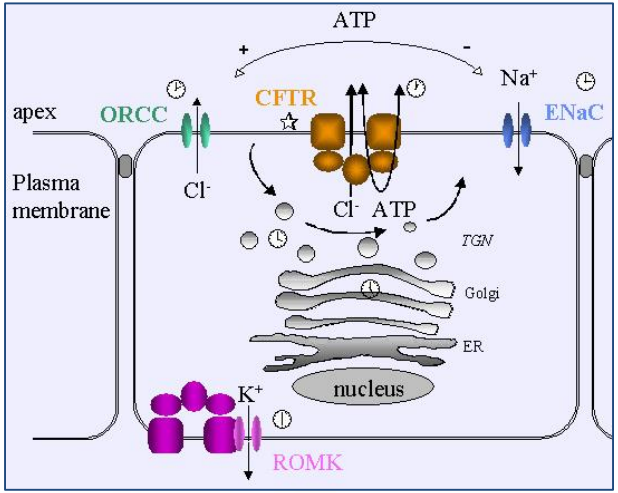
Hunt JF et al. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012

LA FIBROSI CISTICA

Cromosoma 7

Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)





ANNI OTTANTA

- Adozione del test della tripsina immunoreattiva nel sangue per lo screening neonatale della FC.
- L’uso di antibiotici antipseudomonas aeruginosa per aerosol per stabilizzare i pazienti cronicamente infetti , per eradicare l'infezione nei pazienti con prima infezione al fine di ritardare così o prevenenire l'infezione cronica.
- L’utilizzo di dispositivi di accesso venoso totalmente impiantabili che ha consentito l’avvio della terapia endovenosa a domicilio nella maggior parte dei centri FC.

Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. Lancet 1979; i: 472-474.

Hodson ME, Penketh ARL, Batten JC. Aerosol carbenicillin and gentamicin treatment of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. Lancet 1981; i: 1137-1139

Lee TW, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic Pseudomonas aeruginosa infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. Pediatr Pulmonol 2004; 37:104-110.

Gilbert J, Robinson T, Littlewood JM. Home intravenous antibiotic treatment in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1988; 63:512-517.

ANNI OTTANTA

- Primi trapianti di cuore polmone e successivamente i trapianti di doppio polmone
- Primi trapianti di fegato in pazienti con malattia epatica correlata alla FC
- Nuove tecniche di fisioterapia: espirazione forzata, pressione espiratoria positiva e compressione toracica ad alta frequenza.
- Nella malnutrizione grave: nutrizione enterale con SNG o PEG o nutrizione parenterale.
- Disponibilità di enzimi formulati in microsfere acidoresistenti (Pancrease e in seguito Creon) che hanno rivoluzionato il controllo del malassorbimento intestinale
- Apertura di più centri per adulti

Pasque MK, Cooper JD, Kaiser LR, Haydock DA, Triantafillou A, Trulock EP. Improved technique for bilateral lung transplantation: rationale and initial clinical experience. Ann Thorac Surg 1990; 49:785-791.

Mieles LA, Orenstein D, Teperman L, Podesta L, Koneru B, Starzl TE. Liver transplant in cystic fibrosis. Lancet 1989; i: 1073

Tyrrell JC, Hiller EJ, Martin J. Face mask physiotherapy in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1986; 61:598-611

Bradley JA, Axon AT, Hill GL. Nocturnal elemental diet for retarded growth in a patient with cystic fibrosis. Brit Med J 1979; Jan 20th: 167.

Khaw KT, Adeniyi-Jones S, Gordon D, Polombo J, Suskind R. Efficacy of pancreatin preparations on fat and nitrogen absorptions in cystic fibrosis. Pediatr Res 1978; 12:437

ANNI NOVANTA

- Primi studi sulla correzione del canale del cloro nelle cellule epiteliali eseguiti da Welsh e i suoi colleghi.
- Evidenze del difetto di F508del.
- Sviluppo di modelli animali per la FC per far progredire la ricerca,
- Successo del primo trasferimento genico nelle vie aeree di un topo CF.
- Primo tentativo di terapia di trasferimento genico mediante adenovirus su mucosa nasale di paziente FC.

Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. Nature 1990; 347:358-363

Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Tresize AEO, MacVinish LJ, Cuthbert AW et al. Correction of ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. Nature 1993; 362:250-255.

Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. Cell 1993; 75:207-216.

ANNI NOVANTA

- Diagnosi genetica preimpianto
- Introduzione del test del DNA nella maggior parte dei programmi di screening neonatale.
- Primi tentativi di correlazione fenotipo - genotipo (mutazioni "lievi" associate a pancreas sufficienza) .
- Infertilità maschile e pancreatiti ricorrenti correlate a mutazioni del CFTR.
- DNasi umana ricombinante (Pulmozyme), il primo mucolitico veramente efficace
- Prima preparazione di tobramicina specifica per inalazione (TOBI)
- Uso di Azitromicina a lungo termine come antinfiammatorio

Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med. 1995; 332:1475-1480

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. N Engl J Med 1998; 339: 653-8.

Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med 1999; 340:23-30

Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA et al. Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial. JAMA 2003; 290:1749-56.

Storia delle Mutazioni

COMPARSA DELLA F508del

COMPARSA DELLA F508del

- Le ricerche eseguite hanno permesso di stabilire che la mutazione F508del, del gene CFTR è comparsa per la prima volta in una popolazione ancestrale presente circa 50.000 anni fa nell’area compresa tra la Mesopotamia e il Caucaso. Questa popolazione primitiva si spostò poi in direzione Sud - Nord ed Est - Ovest, insediandosi stabilmente nei nuovi territori.

COMPARSA DI ALTRE MUTAZIONI

- Oltre alla F508del, altre mutazioni del gene CFTR si sono verificate come eventi del tutto spontanei e casuali nel DNA dei nostri “ antenati “. Altre hanno seguito in epoche più recenti la colonizzazione del Mediterraneo da parte dei Fenici (ad esempio: G542X, 3000 anni fa) e altre (es. 3120 +1G-A) ancora hanno seguito in tempi più vicini, il trasferimento degli schiavi dall’Africa all’America tra il 16° e il 19° secolo.

COMPARSA DI ALTRE MUTAZIONI

- Per cui la possibilità della malattia deve essere considerata in qualsiasi soggetto con problemi clinici rilevanti, indipendentemente dalle origini razziali. Questo è in contrasto con quanto si pensava solo fino a qualche decennio fa e cioè che la fibrosi cistica fosse diffusa solo nelle popolazioni di pelle chiara “ caucasiche “ dalle regione d’origine

IL NUOVO MILLENNIO

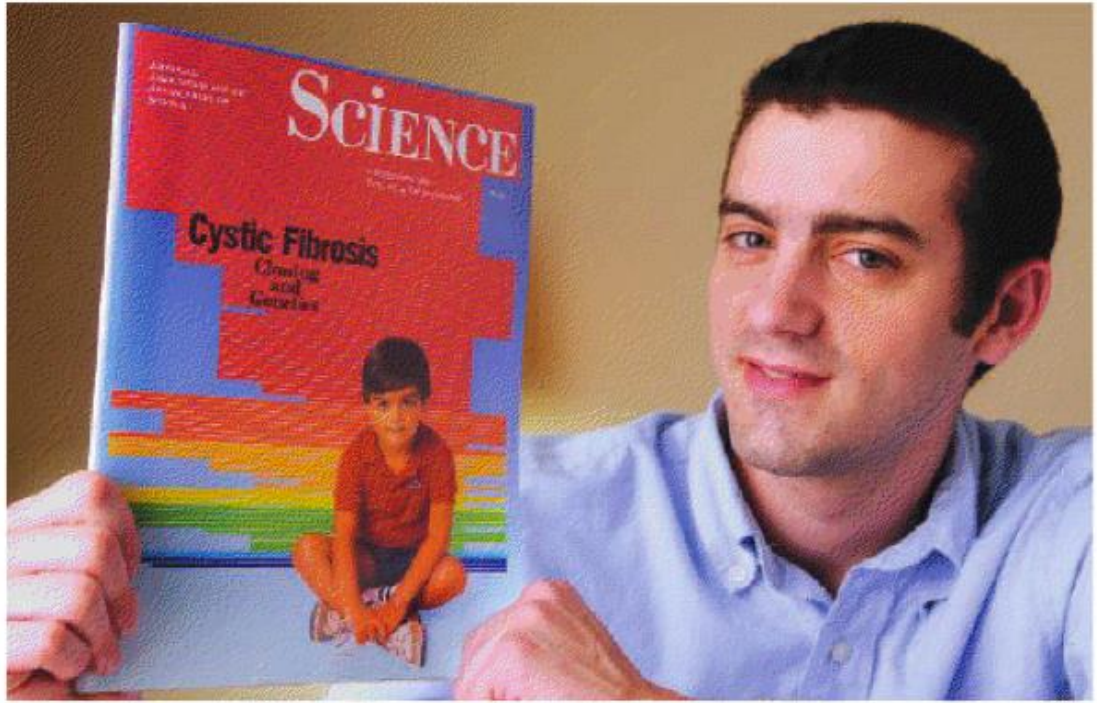
- Nel 1999 tre gruppi di ricerca si unirono per formare il “Gene Therapy Consortium (GTC) del Regno Unito” e svilupparono una ricerca di terapia genica multidose iniziata nel 2013 e conclusa con discreti risultati ma non sufficienti per essere proseguita, nel 2015.
- L'uso dei modelli animali FC ha costituito base essenziale della ricerca, con particolare riguardo ai topi transgenici FC, già disponibili sin dai primi anni Novanta.
- Verso la fine del decennio fu prodotto un maiale FC e anche un furetto FC avente caratteristiche molto più simili ai pazienti, rispetto al maiale o al topo.

Snouweart JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, et al. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. Science 1992; 257:1083-1088

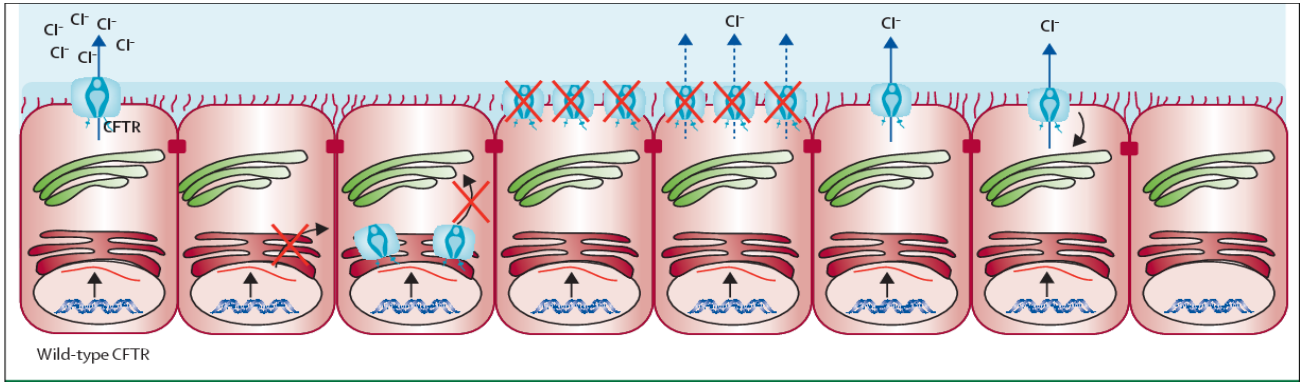
Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ et al Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. Science 2008; 26; 321(5897):1837-1841

Sun X, Sui H, Fisher JT, Yan Z, Liu X, Cho HJ et al. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. J Clin Invest 2010; 120:3149-60.

20 ANNI DALLA SCOPERTA DEL GENE CFTR



Classi di mutazioni e loro funzioni



	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V	Class VI	Class VII
CFTR defect	No protein	No traffic	Impaired gating	Decreased conductance	Less protein	Less stable	No mRNA
Mutation examples	GLy542X, Trp1282X	Phe508del, Asn1303Lys, Ala561Glu	Gly551Asp, Ser549Arg, Gly1349Asp	Arg117His, Arg334Trp, Ala455Glu	Ala455Glu, 3272-26A→G, 3849+10 kg C→T	c. 120del23, rPhe508del	dele2,3(21 kb), 1717-1G→A
Corrective therapy	Rescue synthesis	Rescue traffic	Restore channel activity	Restore channel activity	Correct splicing	Promote stability	Unrescuable
Drug (approved)	Read-through compounds (no)	Correctors (yes)	Potentiators (yes)	Potentiators (no)	Antisense oligonucleotides, correctors, potentiators? (no)	Stabilisers (no)	Bypass therapies (no)

Figure 2: **Classes of gene mutations and respective therapeutic strategies**

Terapia con moduatori: luci ed ombre…

- Nel Nord America, e in misura minore in Europa, la ricerca è stata rivolta allo sviluppo di correttori e di potenziatori del gene mutato:
- Per le "stop mutations“ sono stati sperimentati gentamicina e successivamente PTC 124 (Ataluren) .
- Per le mutazioni di “Gating” nel 2012 è stato disponibile il primo potenziatore , “Ivacaftor”, con risultati straordinari .

Wilschanski M, Famani C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Vital A et al. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. Am J Resp Crit Care 2000; 161:860-865

Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M et al. Effectiveness of PTC 124 treatment for cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase 11 trial. Lancet 2008; 372:719-727

Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P et al. VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. New Engl J Med 2011; 365:1663-72

Terapia con moduatori:

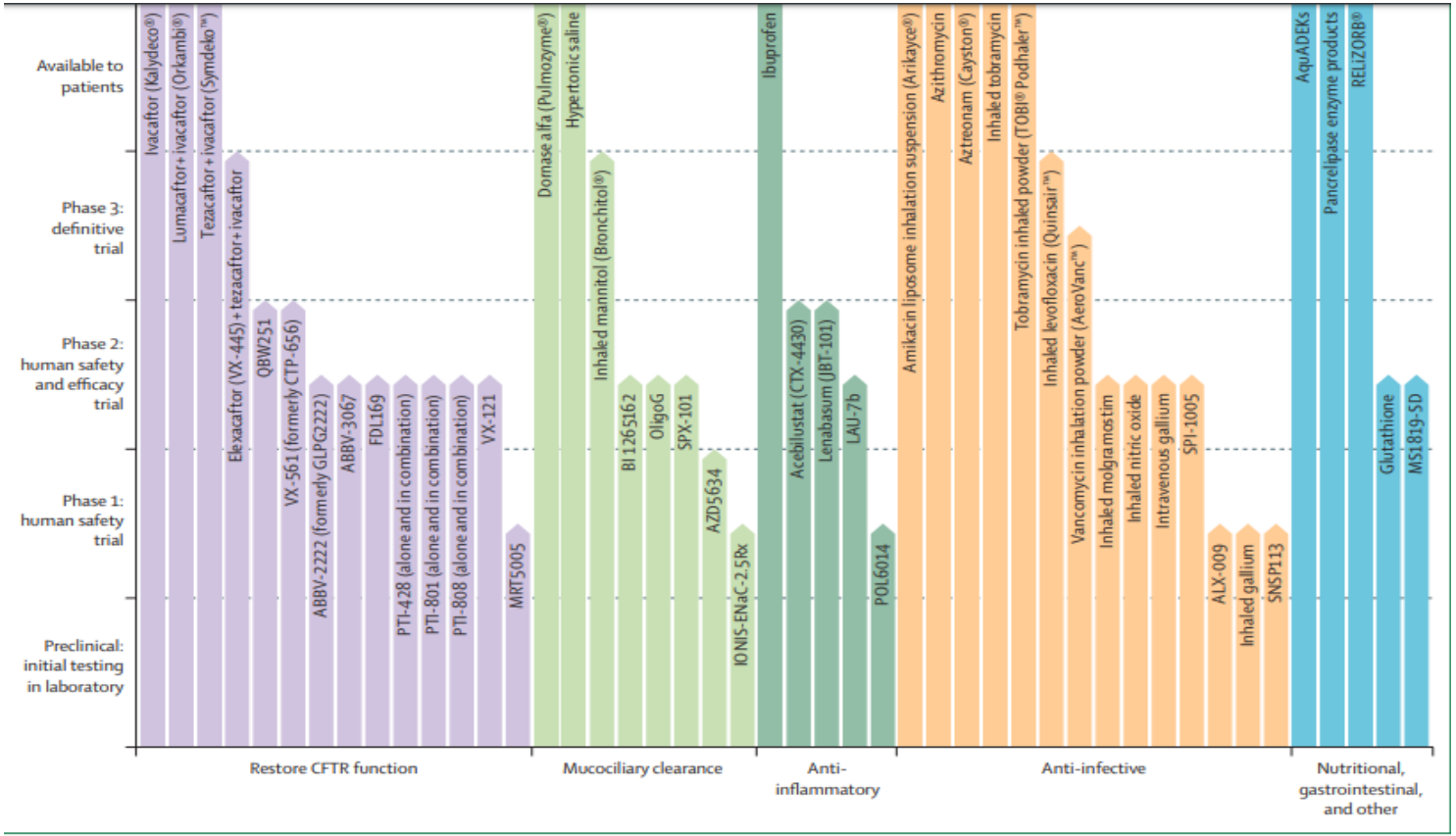
- Per altre mutazioni, compresa quella più frequente la F508del, nel 2013 sono iniziati studi clinici con nuovi farmaci da soli o con Ivacaftor (95):
- Lumacaftor+ Ivacaftor (Orkambi) per pz **F508del / F508del**
- Tezacaftor + Ivacaftor (Symkevi) per pz **F508del / F508del** o eterozigoti **F508del/mutazioni con funzione residua**
- Nel 2018 Tezacaftor + Ivacaftor + Elexacaftor(Trikafta) per pz con **almeno una mutazione F508del**

Clancy JP,Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. Thorax 2012; 67:12-18

Nuove sfide terapeutiche legate all‘ età adulta:

- diabete
- malattie del fegato
- osteoporosi
- gravidanza, infertilità
- problemi renali cronici
- Problemi cardiovascolari
- allergie ai farmaci
- problemi psicosociali complessi
- Nuovi patogeni emergenti
- Necessità di disporre di più organi per trapianti polmonari

PIPELINE SVILUPPO FARMACI



GRAZIE

February
before Kalydeco
may

Before Kalydeco
and after taking
for 2 years.