



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE**

Ciclo XXIX

Coordinatore: Prof. Andrea Lenzi

**“ASSE GH/IGF-1 E FIBROSI
CISTICA”**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE SEZIONE DI
FISIOPATOLOGIA MEDICA ED ENDOCRINOLOGIA

Relatore:

Prof.ssa Carla Lubrano

Dottoranda:

Dott.ssa Chiara Pascucci

Anno Accademico 2017-2018

INDICE

Capitolo 1 - Introduzione	p.2
1.1 Asse GH IGF1	p.2
1.2 Deficit di GH	p.6
1.3 La Fibrosi Cistica	p.13
1.4 Manifestazioni cliniche	p.14
1.5 Il trattamento sintomatico	p.16
1.6 Difeti di base in FC e approccio di correzione	p.16
1.7 La modulazione della proteina	p.22
1.8 Ulteriori miglioramenti nella correzione del CFTR	p.25
1.9 Agenti che aumentano la quantità di CFTR	p.27
1.10 Overreading dei codoni di stop prematuri	p.28
1.11 Bypassare il canale CFTR	p.29
1.12 Utilizzo degli oligonucleotidi per il trattamento del CFTR	p.31
1.13 Terapia Genica	p.31
1.14 Correzione del gene	p.32
1.15 Riparazione dell' mRNA	p.32
Capitolo 2 - Scopo dello studio	p.33
Capitolo 3 - Materiali e metodi	p.34
Capitolo 4 – Analisi statistica	p.37
Capitolo 5 – Risultati	p.38
Capitolo 6 - Discussione	p.43
Bibliografia	p.45

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 ASSE GH-IGF-1

La Somatotropina o GH è l'ormone presente in maggiore quantità nell'ipofisi anteriore. Le cellule deputate alla sua secrezione sono per lo più localizzate nelle porzioni anterolaterali della ghiandola e rappresentano circa il 50% delle cellule dell'adenipofisi. Il GH è un polipeptide costituito da 191 aminoacidi codificato da cinque geni distinti, localizzati sul cromosoma 17q22. Vengono prodotti grazie a splicing alternativo due molecole di GH, la prima di 22-kDa e la seconda di 20-kDa, con simile attività biologica. La secrezione del GH è regolata da un complesso network di fattori ipotalamici e periferici; tra questi ricordiamo il GHRH, peptide ipotalamico di 44 aminoacidi che stimola la sintesi e il rilascio di GH; la Ghrelina, peptide acilato di derivazione gastrica che stimola la secrezione di GH sia direttamente sia stimolando la secrezione di GHRH; la Somatostatina che viene sintetizzata nell'area preottica dell'ipotalamo e in misura minore in altri tessuti extra ipotalamici quali il tratto gastroenterico, il SNC ed il pancreas e che svolge un'azione inibitoria sulla secrezione di GH. Altra importante azione inibitoria sulla secrezione del GH è svolta dal suo effettore principale l'IGF-I che ne inibisce la sintesi legandosi a specifici recettori di superficie. Il GH ha nel torrente circolatorio un'emivita di circa 20-50 minuti. La sua secrezione avviene in modo pulsatile, con massimi livelli durante la notte, in particolare all'inizio del sonno. Il tasso di secrezione diminuisce con l'età, raggiungendo verso i 50

anni valori che corrispondono al 15% dei valori riscontrabili in età puberale. Nell'adulto la concentrazione plasmatica nelle 24 ore è mediamente inferiore a 2,5 mg/l. Livelli elevati di GH si riscontrano entro un'ora dall'inizio di un sonno profondo, dopo esercizio fisico, stress, traumi o durante episodi settici. La secrezione nell'arco delle 24 ore è maggiore nella femmina rispetto al maschio ed è aumentata dal trattamento con Estrogeni. Inoltre la secrezione di GH è influenzata da fattori nutrizionali; vi è infatti un marcato aumento della frequenza di immissione in circolo nel digiuno prolungato e dopo pasti altamente proteici. Il recettore del GH fa parte della superfamiglia dei recettori per le citochine, è una proteina di circa 70 kDa, che attraversa la membrana mediante un singolo dominio di 238 residui. Il GH provoca la dimerizzazione di due molecole di recettore con la conseguente attivazione di una tirosin-chinasi, JAK2, associata al recettore e la successiva fosforilazione del recettore stesso e di JAK2; questo determina l'attivazione di diverse vie di segnalazione, tra cui:

- Fosforilazione delle proteine STAT e conseguente
- trascrizione genica;
- Attivazione della via di segnalazione delle MAP chinasi associate al complesso SHC/Grb2;
- Fosforilazione di IRS e conseguente attivazione della IP3 chinasi;
- Attivazione della PLC con produzione di diacilglicerolo e attivazione della protein-chinasi C.

La via di segnalazione delle JAK2 chinasi è caratteristica di questa classe di recettori dal momento che le altre vie di segnalazione possono essere attivate anche da recettori per ormoni diversi. Risulta evidente quindi la possibilità di una sovrapposizione degli effetti ormonali nelle risposte biologiche. La

funzione principale del GH è di promuovere la crescita lineare ed è principalmente assolta, stimolando la produzione da parte del fegato di un fattore di crescita insulino-simile detto IGF-I o Somatomedina C. L'IGF-I è capace di indurre la sintesi proteica stimolando le cellule ad incorporare aminoacidi e migliorando la trascrizione e la traduzione dell'mRNA. Questo si traduce, specie a livello delle cartilagini di coniugazione, in un potente e prolungato stimolo dell'accrescimento. L'IGF-I viene codificato da un membro della famiglia dei geni insulino-simili che da un punto di vista strutturale è simile alla pro-insulina. Un altro peptide strettamente correlato a questo è l'IGF-II, il quale possiede attività simile; entrambi si legano a recettori di membrana. L'IGF-I è costituito da 70 aminoacidi e l'IGF-II da 67 aminoacidi. I livelli plasmatici di IGF-II sono circa il doppio di quelli dell'IGF-I, ma è quest'ultimo che possiede maggiore analogia d'azione con il GH. Il GH aumenta la sintesi proteica mediante il trasporto degli aminoacidi nelle cellule muscolari e stimola la biosintesi proteica con un meccanismo indipendente dagli effetti del trasporto. Gli animali trattati con GH mostrano un bilancio azotato positivo che si riflette in un incremento generalizzato della sintesi proteica ed in una diminuzione dei livelli di aminoacidi e di urea nel plasma e nelle urine. Questo quadro si accompagna ad un aumento della sintesi di RNA e di DNA in alcuni tessuti e ad un aumento della trascrizione e della traduzione dell'acido ribonucleico messaggero (mRNA). Il processo è attivo specie a livello delle cartilagini di crescita e delle masse muscolari. Gli effetti del GH ricordano molto le azioni svolte dall'insulina. Il GH migliora il metabolismo dei lipidi mediante la liberazione di acidi grassi e glicerolo dal tessuto adiposo, aumentando i livelli circolanti di acidi grassi non esterificati (NEFA) e facilitandone l'ossidazione a livello epatico e la conversione in acetilcoenzima A.

La disponibilità di questa fonte energetica consente un risparmio di proteine, che sono così utilizzabili per il processo accrescitivo. In condizioni di deficit d'insulina, si può avere anche un aumento della chetogenesi. Tutti questi effetti del GH non necessitano della mediazione dell'IGF-I. L'iperglicemia prodotta dopo somministrazione di GH, è la conseguenza della combinazione sia degli effetti di diminuzione dell'utilizzazione periferica del glucosio sia dell'aumento stesso della produzione epatica di glucosio mediante gluconeogenesi. Nel fegato, il GH incrementa il glicogeno epatico attivando la via glucogenetica a partire dagli aminoacidi. La glicolisi può essere rallentata a vari livelli e la mobilizzazione degli acidi grassi dalle riserve di trigliceridi può contribuire all'inibizione della glicolisi muscolare. Anche questi effetti del GH non sono IGF-I mediati. Rapidi aumenti del GH migliorano l'utilizzazione del glucosio mentre un eccesso cronico di GH ha effetto diabetogeno, poiché riduce l'ingresso di glucosio nelle cellule e la sua utilizzazione. Ciò contrasta con l'azione dell'insulina, inducendo insulinoresistenza e conseguente ipersecrezione insulinica compensatoria. Il GH mediante l'IGF-I promuove un bilancio positivo del calcio, del magnesio e del fosfato e causa ritenzione di sodio, potassio e cloro. Il primo effetto è correlato all'azione del GH sulle ossa, che è quello di promuovere la crescita delle ossa lunghe a livello delle giunzioni epifisarie nei bambini oppure, negli adulti, la crescita per apposizione. Nei bambini inoltre il GH stimola la formazione della cartilagine.

1.2 DEFICIT DI GH

Il deficit di GH negli adulti è il risultato di una diminuita secrezione della tropina da parte delle cellule ipofisarie deputate alla sua produzione. Fino a circa venti anni fa non si riteneva che il deficit di GH nell'adulto avesse particolari conseguenze fisiopatologiche, sebbene vi erano le prime segnalazioni che evidenziavano il miglioramento dell'astenia e del senso generale di benessere in soggetti adulti sottoposti a terapia sostitutiva. Queste prime osservazioni, pur se in numero limitato, avevano già focalizzato alcuni degli aspetti peculiari della sintomatologia legata al deficit di GH. La mancanza però di adeguate disponibilità di GH per la terapia, era ancora in uso l'estrattivo da cadavere, e la focalizzazione sull'uso pediatrico, hanno fatto sì che i primi trials riguardanti l'uso della terapia sostitutiva nell'adulto non iniziassero prima del 1989. Numerosi studi successivi hanno provato come il deficit di GH nell'adulto, sia un'entità clinica ben standardizzata (1,2,3). La clinica del deficit di GH è caratterizzata dalla presenza di ridotta tolleranza all'esercizio fisico, tono dell'umore depresso e diminuita sensazione generale di benessere. A questi sintomi generali, si associano una ridotta attività di rimodellamento osseo, alterazioni nella composizione corporea con aumento della massa grassa e caratteristica distribuzione centrale del grasso ed un alterato profilo lipidico che può predisporre allo sviluppo precoce di complicanze cardiovascolari su base aterogena. La difficoltà negli anni passati a caratterizzare la sintomatologia tipica della carenza di ormone somatotropo, è anche da attribuire al fatto che questa spesso si estrinseca nell'ambito di patologie cistiche o associate a più complessi e generalizzati sintomi di un ipopituitarismo.

Tab 1: Caratteristiche cliniche dell'ipopituitarismo.

Tropina Deficitaria	Esordio	Segni e sintomi
ACTH	Acuto	Astenia, nausea, vomito, scompenso cardiocircolatorio
	Cronico	Stanchezza, pallore, anoressia, nausea, dimagrimento, mialgie, ipoglicemia
FSH / LH	Bambini	Pubertà ritardata
	Uomo	Alterazione della fertilità, disfunzione erettile, riduzione della libido, diminuita massa muscolare, diminuita forza muscolare, diminuzione della massa ossea, diminuita eritropoiesi.
	Donna	Amenorrea, oligomen, infertilità, diminuzione della libido, atrofia mammaria, osteoporosi, aterosclerosi precoce.
TSH	Bambini	Ritardo di crescita

	Adulti	Fatica, intolleranza al freddo, stipsi, aumento ponderale, cute secca, diminuzione dei riflessi
GH	Bambini	Ritardo di crescita, bassa statura, aumento massa grassa
	Adulti	Ridotta performance fisica, alterata sensazione di benessere, aumentato rischio cardiovascolare, aumento obesità viscerale, riduzione massa magra
PRL		Mancata montata latte
ADH		Poliuria, polidipsia.

Comunque come mostrano numerosi studi, il trattamento con GH può migliorare tutte le problematiche citate dimostrando il reale contributo del GH (4,5,6,7,8). La prevalenza del deficit di GH nell'adulto è sicuramente difficile da stimare con esattezza. Una stima comunque attendibile può essere quella stimata sulla base della frequenza delle problematiche adenomatose a carico dell'ipofisi, circa 2 casi ogni 10000. Le principali cause del deficit di GH sono elencate nella Tabella 2.

Tab 2. Cause di Deficit di Gh in pazienti adulti (Database KIMS)		
Diagnosi	n	%
Adenomi non secernenti	844	30.7
Adenomi ACTH sec	200	7.3
Adenomi GH sec	55	2.0
Adenomi PRL sec	305	11.1
Adenomi Gonadotropine sec	11	0.4
Adenomi TSH sec	6	0.2
Craniofaringiomi	357	13.0
Chirurgia	25	0.9
Terapia radiante	54	2.0
Idiopatico	353	12.8
Post traumatico	55	2.0
Altri	448	16.3
Totale	2753	

Il GH è una tropina secreta dall'ipofisi in maniera pulsatile, con fisiologici picchi e cadute, che non rendono possibile ai fini della diagnosi, l'uso dei valori ematici basali. Il dosaggio della secrezione spontanea, con prelievi

ripetuti fino ad un massimo di 12 ore, specie se eseguiti nel periodo notturno, fornirebbero la migliore risposta allo studio della funzionalità di quest'asse, ma sono, per evidenti motivi soprattutto economici, impraticabili. Sono stati quindi negli anni studiati e validati test dinamici di stimolo per lo studio dell'asse GH/IGF-I e tra questi ricordiamo:

- Il test all'ipoglicemia insulinica (ITT)
- il test al GHRH + Arginina
- il test al GHRH + GHRH-RP
- il test al Glucagone

Il test all'ipoglicemia insulinica (ITT) è sicuramente il più affidabile ed è stato considerato per anni il gold standard. L'ITT induce un forte stimolo della secrezione di GH, avendo l'ulteriore vantaggio di valutare anche la riserva ipofisaria di ACTH. L'ITT ha infatti dimostrato la migliore capacità discriminatoria tra soggetti con problematiche ipofisarie e controlli sani nelle varie fasi dell'età adulta. Una Consensus internazionale della Growth Hormone Research Society ha stabilito che il cut off per poter definire la presenza di un deficit grave di GH, utilizzando il test all'ITT, è quello di una risposta inferiore a 3 ng/ml. Sfortunatamente a fronte della grande affidabilità il test all'ipoglicemia insulinica è controindicato in pazienti anziani, cardiopatici o a rischio di accidenti cerebrovascolari ed è per questo motivo attualmente poco utilizzato. Studi in letteratura, specie del gruppo di Ghigo (9), hanno mostrato come il test combinato con GHRH ed Arginina possa essere una valida alternativa all'uso dell'ITT. Il test al GHRH ed Arginina è sicuramente oggi il più utilizzato e presenta un'ottima riproducibilità sia nei bambini che negli adulti. Tecnicamente consiste nel dosaggio del GH sierico al tempo basale (0') e ogni 30 minuti fino ad un massimo di 90 minuti dalla somministrazione in bolo di 1 mg/Kg di GHRH e di un'infusione di Arginina (0,5 g/Kg), fino ad una dose massima di 30 g, durante i primi 30 minuti del

test. Il dosaggio dell'IGF-I viene effettuato unicamente sul prelievo basale. Il valore di normalità, in risposta allo stimolo combinato con GHRH ed Arginina è di 16 ng/ml (che equivale al cut off di 3 ng/ml del test all'ipoglicemia insulinica). Per valori di picco al test combinato inferiore ai 9 ng/ml si configura il deficit grave di GH e questa condizione prevede attualmente la prescrivibilità della terapia sostitutiva con rhGH. Valori tra 9 e 16 ng/ml sono considerati indicativi di un deficit parziale. Il deficit parziale di GH è un'entità nosologica ancora non ben definita e per la quale non esistono chiari dati in letteratura, né riguardo il significato long term, né riguardo l'utilità di una terapia sostitutiva. Nei lavori del gruppo di Murray segnalano però che soggetti affetti da deficit parziale, mostrerebbero un alterato rapporto massa grassa/massa magra ed alterati quadri densitometrici, con valori che si andrebbero a situare in una condizione intermedia tra la normalità ed il deficit grave di GH (10,11). Recentemente i cut off per la diagnosi di GH deficit, in risposta al test combinato con GHRH ed Arginina, sono stati rivisti con individuazione di valori BMI-correlati, in considerazione dell'importanza che assume l'indice di massa corporea (BMI) sulla sensibilità della risposta delle cellule somatotrope. Questi valori sono stati validati e vengono consigliati per la valutazione della risposta ottenuta. I cut off consigliati dalla recente consensus sono (12):

- GH < 11.5 ng/ml per un BMI < 25 kg/m²;
- GH < 8 ng/ml per un BMI tra 25 e 30 kg/m²;
- GH < 4.2 ng/ml per un BMI >30 kg/m².

Per quanto riguarda il test al GHRH e GHRH-RP ed il test al Glucagone, va ricordato che il primo sembrerebbe avere un'ottima riproducibilità ma presenta un costo elevato, mentre l'uso del test al Glucagone è sicuramente una valida alternativa vista l'economicità (pur se a prezzo di un discomfort per il paziente non trascurabile soprattutto di tipo gastrointestinale). Nello studio della riserva ipofisaria di GH hanno sicuramente un ruolo importante anche l'IGF-I, la sua proteina di trasporto IGFBP-3 e la subunità acido labile (ALS) con cui l'IGF-I forma un complesso ternario nel torrente circolatorio. Di questi sicuramente il più affidabile nel fornire indicazioni circa lo stato secretorio del GH è sicuramente l'IGF-1. Quanto detto vale però, purtroppo, soprattutto nel deficit del bambino mentre nell'adulto la funzione, a scopo diagnostico, dell'IGF-I è molto minore. Infatti circa il 40% di soggetti adulti con deficit severo di GH mostrano valori di IGF-I ai limiti inferiori del range di normalità. L'importanza dei livelli ematici di IGF-I, da un punto di vista diagnostico, può essere considerata solo in un contesto clinico appropriato (già stabilita diagnosi d'Ipofuitarismo) e in assenza di problematiche epatiche e di malnutrizione. Comunque molti studi che hanno valutato pazienti panipofuitarici hanno evidenziato che, in casistiche selezionate il test di stimolazione per la valutazione del deficit di GH può essere non necessario (13,14,15,16). La presenza, infatti, di tre o più deficit di altre tropine ipofisarie, in associazione a bassi livelli di IGF-I (al di sotto di 84 ng/ml) può essere un valido dato predittivo di mancata risposta ai tests provocativi.

1.3 LA FIBROSI CISTICA

La fibrosi cistica (FC) è la più comune malattia genetica a prognosi infausta della popolazione caucasica e colpisce circa 75.000 individui in tutto il mondo (Farrell, 2008). È una malattia autosomica recessiva causata da mutazioni del gene regolatore nella conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) (Riordan et al., 1989). Il gene CFTR codifica per la proteina CFTR che è un canale del cloro espresso in molte cellule degli epitelii secretori. La FC è una malattia multisistemica che colpisce gli organi e tessuti in cui è espresso il CFTR. Le caratteristiche cliniche più comuni sono l' insufficienza pancreatica esocrina e le bronchiectasie croniche con infezione delle vie aeree che porta a insufficienza respiratoria e morte prematura.

I trattamenti attuali sono principalmente sintomatici e si basano sulla correzione dell' insufficienza pancreatica esocrina con enzimi pancreatici e rallentamento della progressione della malattia polmonare con tecniche di clearance delle vie aeree e terapia antibiotica (17). Nuove terapie volte a trattare le complicanze della disfunzione del CFTR sono in via di sviluppo, tra queste: nuovi antibiotici per via inalatoria, farmaci anti-infiammatori, agenti per migliorare la clearance mucociliare, integratori alimentari, e nuove formulazioni gastroprotette di preparati enzimatici pancreatici.

Ma dal 2012, sono disponibili due nuovi farmaci chiamati modulatori della CFTR formulati con l'obiettivo di ripristinare la funzione della proteina CFTR e molti altri modulatori CFTR sono in via di sviluppo. Questi modulatori della CFTR probabilmente cambieranno drasticamente la cura e la prognosi della FC nei prossimi decenni. Tuttavia, devono essere ancora identificati farmaci che consentano un recupero ottimale della funzione CFTR ed è anche necessario lo sviluppo di farmaci che possano modificare il decorso della malattia per tutti i pazienti con FC, specialmente quelli con mutazioni rare.

1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

I sintomi correlati alla FC compaiono nell'arco della vita, con grande variabilità sia dei sintomi stessi sia dei tempi di comparsa, da paziente a paziente.

Le caratteristiche cliniche della CF sono principalmente legate ai sintomi gastrointestinali e respiratori. I sintomi gastrointestinali sono principalmente dovuti all'insufficienza pancreatica: feci grasse e scarso incremento ponderale.

L'insufficienza pancreatica porta a steatorrea, carenza di vitamine liposolubili e malnutrizione. Settant'anni fa, i bambini morivano per la malnutrizione. Quando la terapia enzimatica sostitutiva divenne disponibile negli anni '50, la prognosi della FC cominciò a cambiare. Attualmente infatti, la principale causa di morbilità e mortalità è la malattia polmonare. Essa è caratterizzata da infezione cronica delle vie aeree e infiammazione con evoluzione verso le bronchiectasie. I sintomi quotidiani della progressione della malattia sono la tosse e la produzione di espettorato. I pazienti con FC sviluppano infezioni batteriche che possono essere eliminate inizialmente con la terapia antibiotica. Successivamente l'infezione batterica delle vie aeree diviene persistente. Uno dei più frequenti patogeni isolati nelle vie aeree FC è lo *Pseudomonas aeruginosa* e l'infezione da *P. aeruginosa* è associata ad una prognosi peggiore. Episodi intermittenti di peggioramento acuto dei sintomi respiratori definiti esacerbazioni polmonari sono trattati con intensificazione delle terapie quotidiane e degli antibiotici per ripristinare la funzione polmonare generalmente diminuita durante una riacutizzazione. Possono anche essere isolati dalle vie aeree altri agenti patogeni come lo *Staphylococcus aureus* incluso lo *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA), batteri gram-negativi, micobatteri non tubercolari o specie di *Aspergillus*. Inoltre possono verificarsi emergenze respiratorie acute come il

pneumotorace o l'emottisi. L'infezione polmonare cronica e l'ostruzione delle vie aeree portano ad un progressivo declino nella funzione polmonare e all'insufficienza respiratoria che è la causa principale di morte. La FC è una malattia multiorgano e possono verificarsi molte comorbidità come la sindrome da perdita di sale, l'ostruzione intestinale, il diabete FC correlato, la calcolosi biliare, la cirrosi biliare, l'ipertensione portale, la sinusite cronica, la poliposi nasale, l'artropatia e l'infertilità.

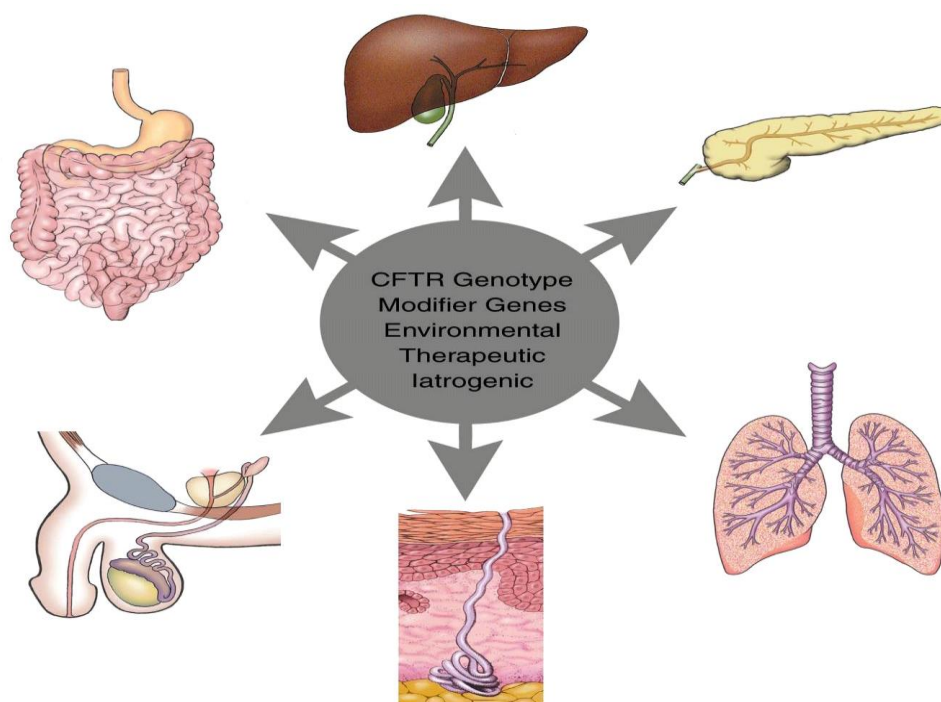


Figura 1.

Fattori patogenetici e degli organi coinvolti nella Fibrosi cistica

La terapia della FC è basata su un approccio olistico alla cura e su un trattamento sintomatico intensivo. L'assistenza ai pazienti FC è erogata da team multidisciplinari in Centri specializzati per la FC.

1.5 IL TRATTAMENTO SINTOMATICO

il trattamento sintomatico consiste nel mantenimento di un buono stato di nutrizione, miglioramento della clearance mucociliare, prevenzione e trattamento aggressivo dell'infezione polmonare, trattamento dell'infiammazione delle vie aeree e identificazione precoce e trattamento delle complicanze. La FC ha beneficiato dello sviluppo di terapie nuove ed efficaci come antibiotici contro *P. aeruginosa*, inclusi gli antibiotici per via inalatoria e terapie fluidificanti come la Rh-Dnasi e il mannitolo. Come conseguenza di un follow-up strutturato in centri di cura dedicati e di una implementazione di trattamenti complessi e aggressivi, l'aspettativa di vita per i pazienti con FC è attualmente di quasi 50 anni. Allo stesso modo, in diversi paesi il numero di adulti con FC è attualmente più grande del numero di bambini con FC. Tuttavia, la sopravvivenza attesa di un bambino nato oggi con FC è ancora solo di 50 anni e l'attuale età mediana di morte è circa 30 anni essendo l'insufficienza respiratoria la più comune causa di morte.

1.6 DIFETTI DI BASE IN FC E APPROCCIO CORREZIONE

La fibrosi cistica è causata da mutazioni nel gene CFTR identificato nel 1989. Comprende 27 esoni codificanti, che coprono oltre 250 kb sul cromosoma 7. Codifica per la proteina CFTR che è un canale anionico di primaria importanza per il trasporto del cloruro e del bicarbonato. La proteina CFTR è espressa nella membrana apicale di molte cellule epiteliali. Quando il canale è aperto o attivato, consente la diffusione passiva degli ioni cloruro secondo il loro gradiente elettrochimico. Esso ha anche molti altri ruoli come l'inibizione del trasporto di sodio attraverso il canale epiteliale del sodio e la regolazione di altri canali del cloro. Si pensa anche che interagisca con i

meccanismi cellulari correlati con l'infiammazione. La proteina CFTR è un membro della superfamiglia delle proteine della cassetta di legame ATP (ABC). È caratterizzato da 2 domini con spanning a membrana (MSD1 e MSD2) che ancorano la proteina sulla membrana plasmatica. Ciascuno dei 2 domini è unito a un dominio di legame nucleotidico (NBD1 e NBD2) che lega e idrolizza l'ATP. Per la CFTR vi è un unico dominio regolatore che deve essere fosforilato dalla protein chinasi cAMP-dipendente per il canale gating di ATP.

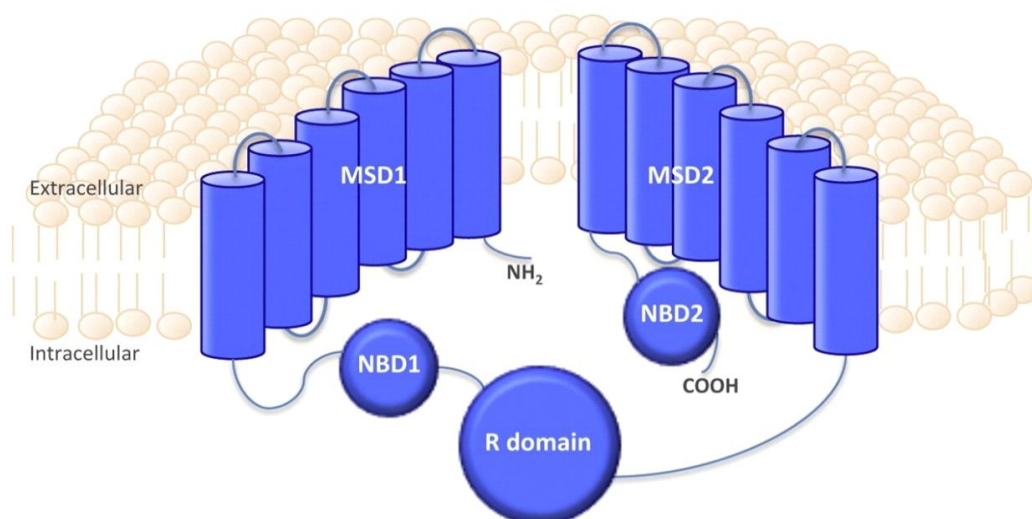


Figura 2.

Domini (MSD1 e MSD2) che ancorano la proteina sulla membrana legando i domini di legame nucleotidico (NBD1 e NBD2) che legano e idrolizzano l'ATP.

Ad oggi sono state descritte circa 2000 mutazioni CFTR. Però, un'alterazione molecolare nella sequenza del DNA non equivale a un potenziale difetto nell'espressione o nella funzione del prodotto proteico. Sono circa 250 le varianti che hanno prove a supporto di un effetto patogeno. Le mutazioni nel gene CFTR sono stati raggruppate in sei classi in base ai loro effetti sulla maturazione e funzione della proteina CFTR (18).

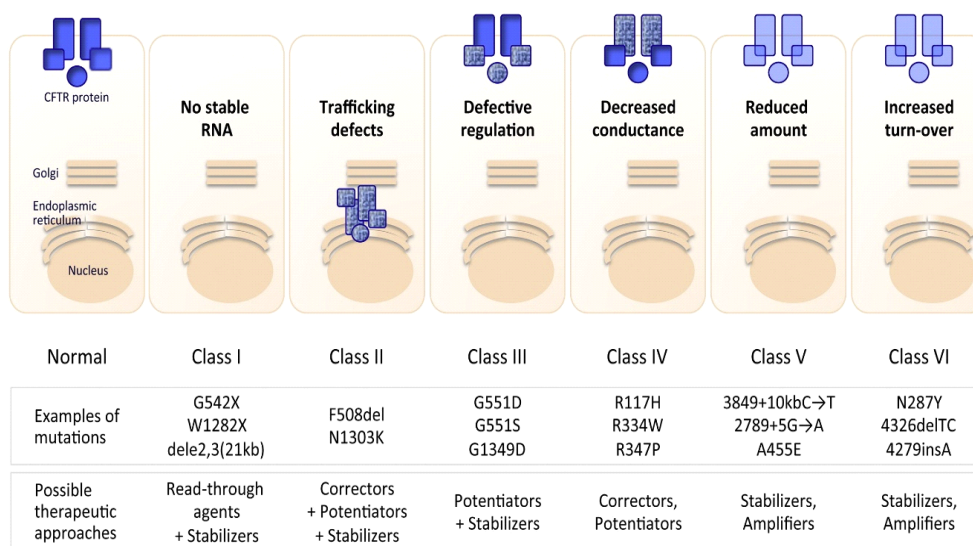


Figura 3. Classi di mutazioni del gene CFTR e loro effetto funzionale.

1.6.1. Mutazioni di classe I: determinano assenza di produzione della proteina. Comprendono le mutazioni con codone prematuro di arresto (ad es. G542X), mutazioni frameshift o grandi delezioni. Queste mutazioni sono presenti in circa il 10% dei pazienti in tutto il mondo.

1.6.2. Mutazioni di classe II: causano difetti nel traffico della proteina e possono causare degradazione prematura della CFTR. La mutazione più comune, F508del, appartiene a questa classe. È presente nel mondo su almeno un allele nel 70% dei pazienti con fibrosi cistica.

1.6.3. Mutazioni di classe III: sono chiamate di gating e consentono il traffico della CFTR sulla membrana apicale ma causano una regolazione difettosa del canale del cloruro. Producono quindi una proteina CFTR poco funzionante. Queste mutazioni sono presenti nel 4-5% dei pazienti in tutto il mondo. La mutazione più comune della classe III è G551D ed è stata trovata in circa il 3% dei pazienti (circa 2000 pazienti).

1.6.4. Mutazioni di classe IV: consentono l'arrivo della proteina CFTR sulla membrana apicale ma con ridotta conduttanza (Es. R117H).

1.6.5. Mutazioni di classe V: portano alla produzione di una proteina CFTR normale ma in una quantità ridotta a causa di splicing aberranti (ad es. 3849 + 10kbC → T) o di un traffico moderatamente diminuito (Mutazioni A455E).

1.6.6. Mutazioni di classe VI: portano ad un elevato turnover di CFTR sulla superficie apicale (es. 120del23) .

Recentemente è stata proposta una classe VII, che comprenderebbe mutazioni come le grandi delezioni che non sono trattabili con la terapia con piccole molecole (18).

Le mutazioni di classe I, II e III sono comunemente associate alla pancreas insufficienza e malattia grave, mentre le mutazioni di classe IV, V e VI sono frequentemente associate alla sufficienza pancreatica e ad un fenotipo più lieve (19). Solo 20 mutazioni sono presenti in tutto il mondo con una frequenza sopra lo 0,1% nei pazienti con FC ed è spesso difficile determinare la responsabilità di malattia per mutazioni molto rare (20). E' stata valutata la frequenza relativa delle classi di mutazione nei pazienti europei con FC (21). Alcune mutazioni possono raggiungere un'alta prevalenza in popolazioni selezionate, per motivi religiosi, etnici o geografici. La classificazione in classi, è utile ma piuttosto teorica: alcune mutazioni si verificano raramente e il loro effetto sulla funzione CFTR è sconosciuto. Allo stesso modo, la maggior parte delle mutazioni inducono difetti della proteina CFTR appartenenti a classi diverse (22). Ad esempio, la mutazione più frequente, F508del, appartiene alla classe II perché produce una proteina CFTR con difetti di traffico; ma appartiene anche alla classe III e alla classe VI perché presenta difetto di gating e un alto turnover quando espressa nella membrana cellulare apicale.

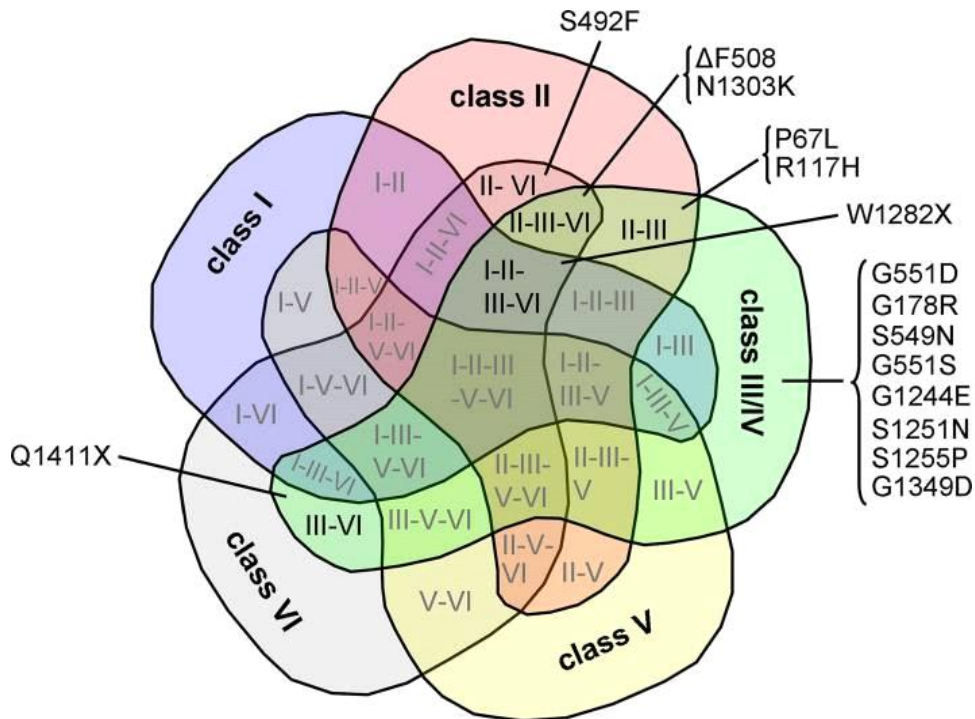


Figura 4. Classificazione rivisitata delle mutazioni CF che rappresentano fenotipi complessi dei principali difetti cellulari del gene CFTR. Il diagramma di Venn indica tutte le combinazioni di classi di mutazione con esempi selezionati. Le combinazioni possibili senza mutazione identificata sono indicate in grigio.

Nelle vie aeree, la proteina CFTR svolge un ruolo importante nel determinare il volume del liquido di superficie (23) e la idratazione ed espansione del muco (24). In tal modo gioca un ruolo principale nella clearance mucociliare delle vie aeree che è il primo meccanismo di difesa innato: quando il volume del liquido di superficie delle vie aeree è normale, promuove il normale battito ciliare e l'efficiente eliminazione dello strato di gel di muco sovrastante in cui i batteri sono intrappolati. Quando la proteina CFTR è difettosa, si crea uno squilibrio tra secrezione di cloro CFTR-dipendente e assorbimento del sodio mediato da ENaC. Ciò porta ad una scarsa quantità e disidratazione del liquido superficiale delle vie aeree, con conseguente compromissione della clearance mucociliare delle vie respiratorie (25). La disfunzione della CFTR inoltre causa una ridotta secrezione di bicarbonato

con conseguente ritenzione di muco e pH ridotto del liquido superficiale delle vie aeree, interferendo così con la capacità del sistema immunitario innato di uccidere i batteri (26). Questi difetti nella difesa innata delle vie aeree innescano una catena di eventi dal ristagno di secrezioni, ostruzione delle vie aeree causata da ntappi di muco, infezione e infiammazione (27,28).

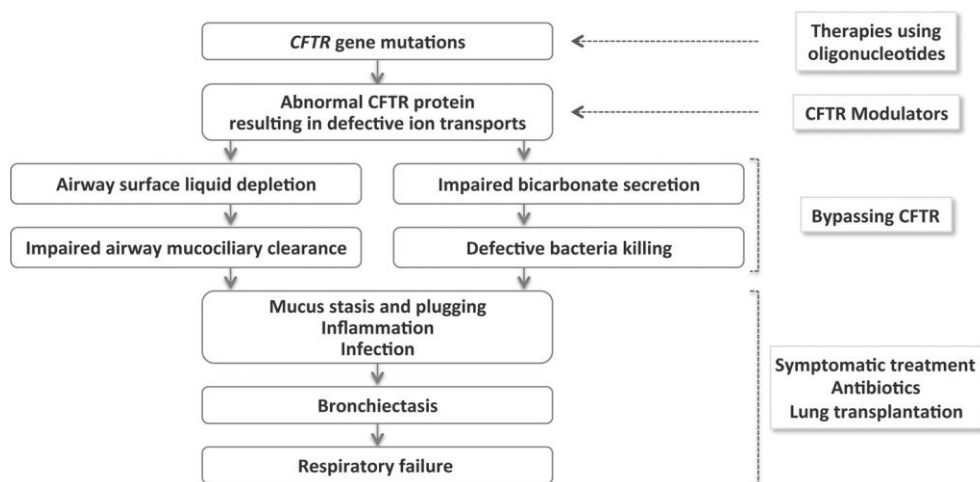


Figura 5. Fisiopatologia della malattia polmonare da FC e obiettivi principali delle terapie attuali ed emergenti.

Dalla clonazione del gene CFTR nel 1989 e dal miglioramento delle conoscenze sulla maturazione, sulla struttura e sulla funzione della proteina CFTR, l'obiettivo principale della ricerca è stato lo sviluppo di farmaci in grado di correggere il difetto di base nella FC. Tali terapie potrebbero rallentare o arrestare lo sviluppo della malattia respiratoria o, se somministrati molto precocemente nei primi mesi di vita, potrebbero persino prevenire la malattia polmonare. Ci sono principalmente 2 approcci per correggere il difetto di base nella FC: il primo approccio che è quello della di terapia genica, consiste nell'utilizzare oligonucleotidi per intervenire a livello del gene o dell'mRNA consentendo la produzione di cDNA CFTR , o di riparare il gene CFTR anormale o l'mRNA. Questo consentirebbe di produrre

una normale proteina CFTR. Nonostante la vasta ricerca in questo settore e alcuni risultati promettenti, questo approccio non ha ancora avuto successo. Il secondo approccio è la farmacoterapia CFTR che mira a identificare piccole molecole in grado di correggere la proteina CFTR anormale. Nel 2012 sono stati commercializzati due modulatori CFTR che dimostrano che la modulazione farmacologica di CFTR è fattibile. Anche con questi due modulatori CFTR, la funzione CFTR è ancora subottimale, ma l'obiettivo di sviluppare farmaci in grado di modificare la malattia FC appare raggiungibile in tempi brevi

1.7. LA MODULAZIONE DELLA PROTEINA CFTR È POSSIBILE: IL POTENZIATORE IVACAFTOR

Ivacaftor (VX-770; Kalydeco® di Vertex Pharmaceuticals) è il primo farmaco studiato per correggere il difetto di base nella FC già approvato per il marketing. È stato identificato usando la tecnica high-throughput screening e ha mostrato in vitro un miglioramento del trasporto del cloro, un aumento dello spessore del liquido di superficie delle vie aeree e un aumento della frequenza del battito ciliare nelle cellule epiteliali delle vie aeree che esprimono la mutazione G551D appartenente alla classe III del CFTR (29). Si pensa che l'Ivacaftor si leghi direttamente alla proteina CFTR, probabilmente ai domini transmembrana (30), aumentando così la probabilità di apertura della proteina canale CFTR. Questo è il principale difetto delle mutazioni di classe III.

Ma l'ivacaftor ha mostrato anche di aumentare la probabilità di apertura del canale CFTR normale, in diverse mutazioni di classe IV e V. Queste sono associate ad una proteina CFTR presente nella membrana apicale che però è o disfunzionale o in quantità ridotta (31,32).

Gli studi clinici di fase II e III controllati verso placebo hanno dimostrato che Ivacaftor è stato ben tollerato ed efficace sia in bambini (≥ 6 anni) che in pazienti adulti con FC che presentavano almeno una mutazione G551D (classe III) nel gene CFTR (33, 34, 35, 36). La principale evidenza del beneficio clinico, con la somministrazione orale di Ivacaftor per 144 settimane, è stata il miglioramento significativo della funzione respiratoria con l'aumento medio del 10% del teorico del FEV₁, incremento del peso e riduzione del numero delle esacerbazioni polmonari.

I pazienti con FC che hanno assunto Ivacaftor hanno mostrato anche una riduzione delle concentrazioni del cloro nel sudore evidenziando un miglioramento della funzione CFTR nelle ghiandole sudoripare. Questi risultati hanno portato all'approvazione nel 2012 negli Stati Uniti e nella UE di Ivacaftor per i pazienti con FC di età pari o superiore a 6 anni con almeno una copia della mutazione G551D. Il miglioramento clinico è stato osservato anche nei pazienti trattati dopo la commercializzazione del farmaco e l'effetto a lungo termine più evidente è rappresentato dal rallentamento del declino della funzionalità polmonare (37).

Ulteriori studi hanno mostrato l'efficacia di Ivacaftor nei pazienti con almeno una copia delle altre mutazioni di gating CFTR (38) o con una mutazione di ridotta conduttanza del canale (classe IV) come la R117H (39). In uno studio in aperto, è stato mostrato che Ivacaftor è stato ben tollerato anche nei bambini con FC di età compresa tra 2 e 5 anni con una mutazione di classe III (Davies, et al., 2016). Quindi, Ivacaftor è attualmente approvato negli Stati Uniti, UE, Canada e Australia per i pazienti con FC età ≥ 2 anni (o ≥ 6 o ≥ 18 anni, a seconda del Paese) recanti almeno una copia di mutazioni specifiche di classe III o la mutazione di classe IV R117H.

Ivacaftor è la prima terapia personalizzata, genomica della FC. Circa 3400 pazienti con FC sono eleggibili per il trattamento con Ivacaftor in tutto il mondo ma questo rappresenta solo il 5% circa della popolazione FC totale.

Tuttavia, lo sviluppo e l'approvazione di Ivacaftor sono stati un importante passo avanti per il trattamento della fibrosi cistica perché hanno costituito la prova che una terapia con una piccola molecola può migliorare la funzione CFTR. È stato dimostrato che Ivacaftor consente di ottenere un'attività di CFTR equivalente a circa il 35% -40% della normale attività (Accurso et al., 2014). Test clinici e studi successivi hanno dimostrato che anche negli adulti con una lunga storia di malattia respiratoria e ridotta funzione polmonare, il ripristino della funzione CFTR può migliorare significativamente la funzione polmonare e rallentare il decorso della malattia. Nei pazienti molto giovani con normale funzione polmonare, l'inizio del trattamento con Ivacaftor nella prima fase della vita, se ben tollerato e a lungo termine, potrebbe davvero modificare il decorso della malattia infatti potrebbe aiutare a preservare la funzione polmonare e migliorare la sopravvivenza attesa. Tuttavia bisogna notare che Ivacaftor è attualmente un trattamento molto costoso (circa 294.000 \$ all'anno), e ciò costituisce un problema significativo per una terapia cronica. Inoltre il costo limita l'accesso al trattamento in diversi paesi a basso reddito. Nella valutazione del costo del farmaco, occorre comunque tener conto della possibilità di una vita attiva del paziente, della diminuzione dei costi relativi al trattamento sintomatico e alla riduzione del numero delle ospedalizzazioni (40).

Diversi nuovi potenziatori sono attualmente in fase di studio, come QBW251 di Novartis (NCT02190604), GLPG1837 di Galapagos (NCT02707562 e NCT02690519) o CTP-656 da Concert Pharmaceuticals (NCT02599792)

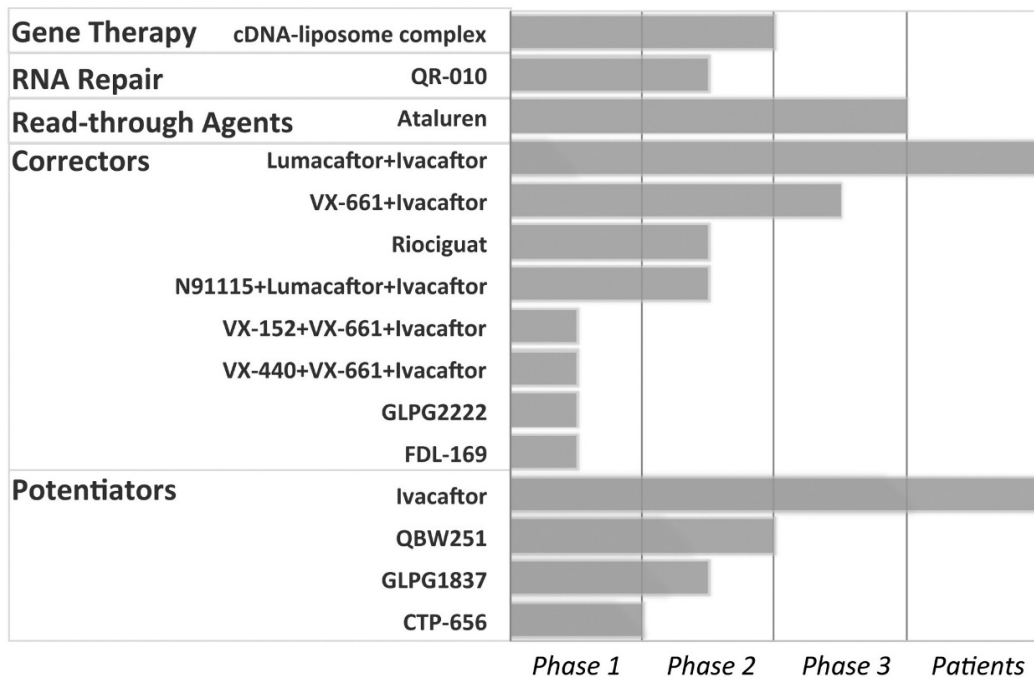


Figura 6. Pipeline di sviluppo clinico dei modulatori CFTR

1.8 ULTERIORI MIGLIORAMENTI NELLA CORREZIONE CFTR

La mutazione più comune è la F508del di classe II, presente in omozigosi in circa il 40-45% dei pazienti. La mutazione F508del è determinata dalla delezione della fenilalanina in posizione 508 della proteina. Ciò si traduce in un dominio NBD1 anomalo che (41) produce un misfolding della proteina alterando il traffico di questa dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi. La maggior parte della proteina CFR F508del è quindi degradata dai meccanismi di controllo della cellula. La piccola quantità che raggiunge la superficie della cellula ha un difetto di gating e una vita breve. Parecchi composti chiamati correttori sono stati saggiati vitro poter portare una maggiore quantità di proteina sulla membrana plasmatica. L'aggiunta di potenziatori era determinata dalla necessità di correggere i difetti di gating. Lumacaftor (VX-809 di Vertex Pharmaceuticals) è un correttore pensato per agire sulla biogenesi della CFTR, interagendo direttamente con MSD1, andando ad eliminare i difetti di piegamento della proteina e migliorando le

interazioni tra i domini NBD1, MSD1 e MSD2 (42). Studi in vitro hanno dimostrato che Lumacaftor migliora l'elaborazione della CFTR e la secrezione di cloruro nelle cellule epiteliali bronchiali omozigoti per la mutazione F508del (43). In studi di fase II e di fase III, controllati con placebo, in pazienti FC omozigoti F508del con Lumacaftor in combinazione con Ivacaftor, si è osservato un miglioramento significativo della funzione respiratoria e un tasso più basso di esacerbazioni polmonari (44, 45). Tuttavia, il miglioramento della funzione respiratoria (aumento medio del 3% FEV1) era inferiore a quello osservato per Ivacaftor in pazienti con una mutazione di classe III (aumento medio del FEV1 del 10%). Il successo di questi studi clinici ha portato all'approvazione del marketing di Lumacaftor (VX-809) combinato con Ivacaftor (Orkambi®) negli Stati Uniti e nell'UE nel 2015 per i pazienti con FC di età \geq a 12 anni e omozigoti per la mutazione F508del. L'uso di Orkambi® ha costituito una nuova pietra miliare nel trattamento della FC.

L'efficacia non ottimale di questa combinazione terapeutica è stata dimostrata da studi recenti (46) che hanno evidenziato come, una volta trasportata in membrana dai correttori, la F508del-CFTR è instabile, in quanto è rapidamente ubiquitinata ed avviata verso la degradazione lisosomiale. Questo secondo meccanismo di controllo di qualità cellulare non consente alla F508del-CFTR di risiedere in membrana tanto a lungo da essere disponibile per l'azione dei potenziatori. Inoltre, due gruppi di ricerca hanno dimostrato che il potenziatore VX-770 compromette la stabilità della F508del-CFTR dopo il suo arrivo in membrana (47,48). Queste evidenze, sperimentali e cliniche, suggeriscono che la principale necessità della "drug discovery" in FC è quella di identificare molecole capaci non solo di favorire il traffico della F508del-CFTR verso la superficie cellulare, ma anche di stabilizzarla in membrana per poter ipotizzare un beneficio clinico nei pazienti.

Correttori con un meccanismo di azione diverso da Lumacaftor potrebbero essere aggiunti a Orkambi® per aumentare la sua efficacia, come mostrato in

vitro (49). Ma la combinazione di farmaci aumenta possibili interazioni farmacologiche e rischi di eventi avversi. Altri correttori sono attualmente in sviluppo clinico, come Tezacaftor (VX-661) di Vertex Pharmaceuticals (NCT02508207), Riociguat di Bayer (NCT02170025), combinazioni di correttori come VX-152 o VX440 combinato con Tezacaftor (VX-661) di Vertex Pharmaceuticals, GLPG2222 di Galapagos (NCT02788721) o FDL-169 di Flatley Discovery Lab (NCT02767297)

1.9 AGENTI CHE AUMENTANO LA QUANTITÀ DI CFTR O STABILIZZANO LA CFTR SULLA MEMBRANA CELLULARE

Sono stati sviluppati nuovi composti che potrebbero essere combinati con correttori e potenziatori. Mirano ad aumentare la quantità di CFTR nella cellula, in modo che una maggior quantità di CFTR sia disponibile per l'interazione con correttori e potenziatori, o a stabilizzare il CFTR modulato a livello della membrana cellulare. L'amplificatore PTI-428 di Proteostasis Therapeutics (NCT02718495) è stato studiato per aumentare la quantità di CFTR nella cellula ma non ha attività di correttore o potenziatore. Lo stabilizzatore Cavosonstat (N91115) di Nivalis mira a stabilizzare la proteina CFTR sulla membrana cellulare. Si pensa di inibire la S-nitrosoglutathione reduttasi che è aumentata nelle cellule epiteliali bronchiali umane di pazienti con FC (50). Il ripristino dello S-nitrosoglutathione intracellulare a livelli normali diminuirebbe la degradazione della CFTR e migliorerebbe la stabilità della CFTR sulla superficie della cellula. Studi di fase 2 di N91115 combinato con Orkambi® e Kalydeco® sono in corso (NCT02589236 e NCT02724527)

1.10 OVERREADING DEI CODONI DI STOP PREMATURI

Gli overreading dei codoni di stop potrebbero portare beneficio ai pazienti FC portatori di mutazioni di classe I, poiché la presenza di un codone di stop prematuro impedisce la sintesi proteica di CFTR di normale lunghezza (51). Le mutazioni di prima classe rappresentano circa il 10% di quelle che causano FC e sono presenti in più del 50% dei pazienti israeliani (52, 53). La lettura corretta a livello ribosomiale di un codone di stop dovrebbe consentire la traduzione portando ad una normale trascrizione. Il "read-through" ribosomico consente la sintesi di CFTR a lunghezza intera che porta a correzione di mutazioni di classe I. A tal scopo è stato sviluppato l'Ataluren (PTC124) che ripristina parzialmente l'espressione di G542X-CFTR (classe I) in un modello murino e corregge parzialmente la funzione CFTR negli epitelii nasali di pazienti con mutazioni di classe I (54, 55, 56). Tuttavia in un recente trial clinico di fase 3, il trattamento con Ataluren non ha prodotto un beneficio clinico significativo, forse a causa di un'interazione avversa tra il farmaco in oggetto e la Tobramicina, un antibiotico comunemente usato per via inalatoria nel trattamento delle infezioni polmonari nei pazienti con FC (57).

1.11 BYPASSARE IL CANALE CFTR

La proteina canale CFTR interagisce con altri canali ionici sulla membrana cellulare. Una funzione importante è l'inibizione del canale epiteliale del sodio (ENaC). In FC, l'iperattività di ENaC contribuisce alla disidratazione del liquido superficiale delle vie aeree (58, 59). Quindi gli agenti bloccanti dell'ENaC potrebbero migliorare l'idratazione delle vie aeree. Sebbene lo sviluppo degli inibitori ENaC per via inalatoria sia stato uno sforzo notevole, la loro applicazione clinica è stata finora ostacolata da un'efficacia troppo bassa o da effetti avversi dovuti all'assorbimento sistemico e all'inibizione di ENaC nel rene (60).

Nuovi composti promettenti, come VX-371 di Vertex Pharmaceuticals e Parion (NCT02709109) sono in corso di valutazione. Una nuova strategia terapeutica consiste nello stimolare i canali del cloro diversi dal CFTR (canali del cloro alternativi come Calcium activated Chloride Channel or TMEM16A or anoctamin-1), per compensare la perdita della funzione di CFTR. Recentemente studi preclinici hanno portato ad identificare canali del cloro alternativi che dovrebbero facilitare lo sviluppo di specifici attivatori (61).

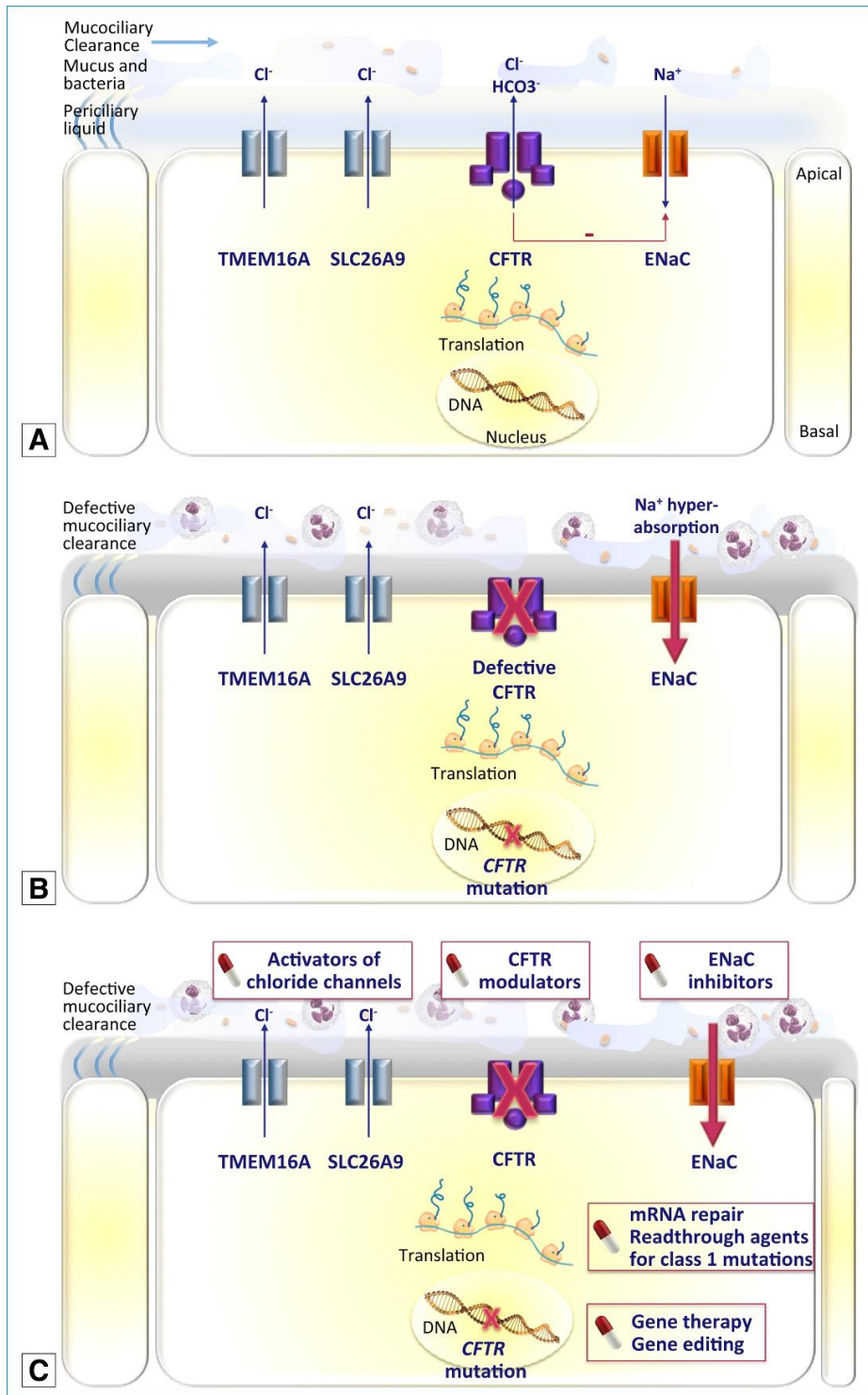


Figura 7. Trasporto di ioni nelle vie aeree sane e in quelle FC e strategie terapeutiche mirate ai difetti di base

1.12 UTILIZZO DEGLI OLIGONUCLEOTIDI PER IL TRATTAMENTO DEL GENE CFTR O DEL mRNA

Un'altra strategia potrebbe consistere nello sviluppare un trattamento che intervenga sul gene o a livello del mRNA erogando un normale cDNA CFTR o modificando nuovamente le anomalie del gene CFTR o correggendo l' mRNA anormale usando oligonucleotidi. Poiché gli oligonucleotidi sono inadeguati per la somministrazione orale o sistemica, è probabile che queste strategie restino limitate al trattamento tramite aerosol.

1.13 TERAPIA GENICA

Il trasferimento di un cDNA CFTR normale è chiamato terapia genica nonostante il suo scopo non sia quello di riparare il DNA del gene CFTR anomalo, ma di fornire cDNA CFTR funzionale che porterebbe alla sintesi proteica CFTR normale. Il cDNA CFTR è una grande molecola che deve essere compattata in molecole chiamate vettori per entrare nelle cellule. Questi agenti di trasferimento genico sono di natura virale o non virale. In FC, la maggior parte dei vettori studiati sono molecole cationiche non virali in grado di formare un complesso con il DNA caricato negativamente. C'è stato un grande entusiasmo per la terapia genica dopo che il gene CFTR è stato identificato. In effetti, un tale approccio potenzialmente è in grado di curare tutti i pazienti con FC, indipendentemente dalle mutazioni presenti. I trattamenti di solito erano ben tollerati, ma sono emersi molti problemi tra cui il basso trasferimento di geni corretti dalla maggior parte dei vettori virali e non virali disponibili, la breve emivita dell'espressione genica terapeutica che porta ad una bassa efficacia e risposte infiammatorie indesiderate (62). Un recente studio di fase IIb , multicentrico, randomizzato, in doppio cieco,

ha arruolato 140 pazienti con FC i quali hanno effettuato un'inalazione mensile di un DNA plasmidico che codifica il cDNA CFTR complessato con un vettore liposomiale, per 1 anno. Il trattamento è stato ben tollerato e vi è stata una stabilizzazione della funzione polmonare rispetto al gruppo placebo (63).

1.14 CORREZIONE DEL GENE

Un vero approccio di terapia genica consiste nella correzione permanente al genoma. L'ingegneria genomica è ancora in fasi iniziali senza dati clinici per la FC, ma rimane un approccio promettente. Si basa su nucleasi programmabili che consentono modifiche definite del genoma, facili, efficienti ed altamente specifiche. Alcuni dati in vitro in organoidi intestinali hanno mostrato la riparazione della mutazione F508del mediante editing genico (64).

1.15 RIPARAZIONE DELL'mRNA

La riparazione dell'mRNA CFTR anomalo è un altro approccio terapeutico e la riparazione trascrizionale parziale dell'mRNA della mutazione F508del-CFTR è stata evidenziata già nel 2004 (65). Il farmaco QR-010 è un RNA antisenso a singolo filamento costituito da una sequenza di oligonucleotidi contenente le basi mancanti che agisce come guida delle sequenze di base per riparare l' mRNA anomalo in pazienti con la mutazione F508del. E' in corso uno studio di fase I in pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del (NCT02532764).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLO STUDIO

Indagare la presenza di eventuali alterazioni a carico dell'asse GH – IGF1 nei pazienti adulti affetti da Fibrosi Cistica.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

Nel 2013 abbiamo arruolato 50 pazienti adulti affetti da Fibrosi Cistica, 20 femmine e 30 maschi, con un'età media di 36 ± 2 anni (il range di età era compreso tra i 18 e i 60 anni). Tutti i pazienti in studio erano regolarmente seguiti fin dalla diagnosi, presso il Centro Regionale di riferimento per la Fibrosi Cistica del Policlinico Umberto I di Roma. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Universitario Umberto I di Roma con il protocollo numero 818/13. Prima dell'inizio dello studio tutti i pazienti hanno ricevuto informazioni sulla nostra ricerca alla quale hanno aderito firmando un consenso informato. I criteri di esclusione dello studio erano: pazienti con età inferiore a 18 anni, pazienti con esacerbazione polmonare nelle 4 settimane precedenti lo studio, pazienti in lista d'attesa per trapianto polmonare e soggetti sottoposti a trapianto di polmone o fegato, pazienti con volume espiratorio forzato al secondo (FEV1) <30% del valore previsto o che erano in terapia con ossigeno. In tutti i pazienti dello studio sono stati valutati i parametri antropometrici e tutti, avevano raggiunto l'altezza target geneticamente determinata. Nessuno dei pazienti era stato valutato per deficit di ormone della crescita durante l'infanzia ne aveva precedentemente ricevuto terapia sostitutiva con ormone della crescita ricombinante.

In tutti i soggetti è stata condotta un'accurata anamnesi e una valutazione clinica completa sia tramite database elettronico sia attraverso referti clinici. Sono stati misurati i livelli ematici dei seguenti ormoni: IGF-1, T3 libero (FT3), T4 libero (FT4), ormone stimolante la tiroide (TSH), ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH), testosterone (estradiolo nelle femmine), prolattina (PRL), ormone adrenocorticotropo (ACTH), cortisolo, globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG) e ormone paratiroideo (PTH). Nelle donne con cicli mestruali regolari, sono stati prelevati campioni per analisi ormonali nella fase follicolare del ciclo mestruale (tra il terzo e l'ottavo giorno). Le determinazioni ormonali di TSH, FT3, FT4, estradiolo o testosterone, FSH, LH, SHBG e PRL sono state eseguite con i sistemi automatizzati d'immunodosaggio a chemiluminescenza disponibili in commercio. Gli intervalli di riferimento per questi ormoni erano i seguenti: TSH (0,35-4,94 mIU / L), FT4 (0,7-1,48 ng / dL), FT3 (1,71-3,71 pg / mL), Testosterone (10,4-38,2 nmol / L), estradiolo (35-169 pg / mL), LH (1,8-8,16 mIU / mL nei maschi e 2,89-21,72 mIU / mL nelle femmine), FSH (1,38-9,58 mIU / mL nei maschi e 3,35-21,63 mIU / mL nelle femmine), PRL (2,64-13,13 ng / mL nei maschi e 3,34-26,72 ng / mL nelle femmine) e SHBG (11,7-137,2 nmol / L nelle femmine e 11,2-78,1 nmol / L nei maschi). Le determinazioni ormonali di ACTH, PTH e GH sono state eseguite con saggio immunoradiometrico (IRMA). Gli intervalli di riferimento per questi altri ormoni erano i seguenti: ACTH (10-90 pg / mL), PTH (11-62 pg / mL) e GH basale (0-10 ng / mL). Le determinazioni ormonali di cortisolo e IGF-1 sono stati eseguiti con radioimmunoassay (RIA). Gli intervalli di riferimento per gli altri test erano i seguenti: cortisolo (266-720 nmol / L) e IGF-1 (70-250 ng / mL nei maschi e 100-415 ng / mL nelle femmine). Allo stesso tempo venivano effettuati il glucosio a digiuno e altri test biochimici ed ematologici. Allo stesso tempo venivano effettuati il glucosio a digiuno e altri test biochimici ed ematologici.

Tutti i soggetti erano stati sottoposti al test con doppio stimolo al GHRH e Arginina, al mattino dopo un digiuno di 12 ore. Una dose di 1 mg / kg di GHRH (Geref Diagnostic®, Serono) è stata somministrata per bolo endovenoso, seguita da arginina cloridrato per infusione endovenosa per 30 minuti (0,5 g / kg, con una dose massima di 30 g). I campioni di sangue per la valutazione del GH sono stati raccolti ai tempi 0, 30, 45 e 60 minuti dopo la stimolazione. I valori del picco GH dopo la stimolazione sono stati confrontati con l'indice di massa corporea (BMI). Il deficit grave di GH è stato definito come un picco GH inferiore a 11,5 ng / mL per i pazienti con un BMI <25 kg / m² e inferiore a 8,0 ng / mL per quelli con un BMI > 25 kg / m². Nessun paziente nel campione aveva un BMI > 30 kg / m². Il deficit parziale di GH è stato definito per valori fino a 16 ng / mL. Nel 2018 abbiamo eseguito nuovamente il test GHRH + Arginina a distanza di 5 anni, nei primi 10 pazienti (7 con diagnosi precedente di deficit parziale e 3 grave di GH). Abbiamo riscontrato che nei 10 pazienti ritestati, 5 di loro erano in terapia con l'associazione Lumacaftor + Ivacaftor, farmaco modulatore della fibrosi cistica (Orkambi). Questi pazienti assumevano Orkambi da circa 2 anni. Di questi 10 pazienti 5 si sono sottoposti a RMN della regione diencefalica ipofisaria con e senza mezzo di contrasto.

CAPITOLO 4

ANALISI STATISTICA

I dati sono presentati come deviazioni medie e standard. L'associazione tra variabili binarie (come sesso e terapie) e gruppi è stata studiata attraverso il test Chi-quadrato di Pearson. Una regressione logistica binaria è stata eseguita per quantificare l'associazione tra gruppi e variabili indipendenti attraverso odds ratio (OR) con corrispondenti intervalli di confidenza al 95%. L'analisi oneway non parametrica di Kruskal-Wallis misura il significato statistico della differenza tra i gruppi. Per l'analisi statistica, abbiamo utilizzato IBM SPSS Statistics versione 21.0. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

CAPITOLO 5

RISULTATI

La popolazione in studio era composta da 20 femmine e 30 maschi con un'età media di 36 ± 2 anni (range 18-60 anni). Il BMI medio era di 21.39 ± 0.22 Kg/m² con una circonferenza vita media di 92.35 ± 11.5 cm. Solo il 12% dei 50 pazienti aveva una normale funzione pancreatica e non assumeva terapia enzimatica sostitutiva. Di questi, cinque erano eterozigoti per la mutazione F508del e lieve mutazione (IV o V) del gene CFTR e tutti avevano una normale funzione dell'asse GH-IGF-1 tranne un paziente con deficit parziale di GH. Quattordici pazienti (28%) erano affetti da CFRD e erano in terapia insulinica con NovoRapid® (NovoNordisk) e Lantus® (Insulina Aspart).

Il FEV1 medio era del 67% e il FVC medio del 74%. Alla DXA il Tscore medio femorale era di -1.3 ± 0.7 e quello lombare di -1.1 ± 1.3 . La percentuale corporea di massa grassa calcolata con DXA Total body era di $17,3 \pm 0.14\%$ con un Tscore medio di 0.4 ± 1 . Le risposte al questionario specifico per pazienti con GHD adulti mostravano un valore medio di 38.5 ± 9.1 con uno Zscore di 0.7 ± 0.2 . Due pazienti stavano già assumendo levotiroxina Eutirox® (Bracco) per l'ipotiroidismo; lo studio non ha rivelato altre deficienze ormonali nei pazienti arruolati. Periodicamente tutti i pazienti nello studio avevano ricevuto cicli di corticosteroidi per via inalatoria. Tuttavia, tutti i test di stimolo con GHRH più l'arginina erano stati eseguiti almeno 60 giorni dopo l'ultima terapia con corticosteroidi inalatori.

La valutazione dei modelli secretori di GH e IGF- 1 con il test GHRH + Arginina, in accordo con i dati in letteratura per la normalizzazione dei valori di GH aggiustati per l'IMC, ha mostrato la presenza di GHD in 16 dei 50 pazienti nello studio (32%). Di questi il 44% (7/16) dei pazienti presentava una grave carenza e il 56% (9/16) presentava un deficit parziale. Abbiamo diviso i pazienti in due gruppi in base alla presenza (gruppo A) o assenza (gruppo B) di GHD. Il gruppo A comprendeva pazienti con deficit grave e parziale di GH. Il gruppo A era composto da 2 femmine e 14 maschi mentre il gruppo B da 18 femmine e 16 maschi. Nel gruppo con il deficit di GH il BMI medio era di 23.1 ± 2.39 kg/m² contro quello del gruppo senza deficit che era di 20.94 ± 2.06 kg/m². La circonferenza vita media nel gruppo A era di 102.25 ± 5.67 cm mentre nel gruppo B era di 87.69 ± 10.66 cm. Per questi parametri è risultato esserci una differenza statisticamente significativa fra i 2 gruppi (rispettivamente: p value per sesso di 0.006*; per BMI di 0,001* e per circonferenza vita di 0.000*). Altre differenze statisticamente significative tra i 2 gruppi erano: i valori medi di TSH più bassi nel gruppo A rispetto al gruppo B seppur entrambi nel range della norma (2.1 ± 1.06 vs 2.04 ± 0.87 mUI/ml p value 0.02*); la percentuale di diabete fibrosi cistica correlato che colpiva maggiormente i soggetti con deficit di GH del gruppo A (50% 8/16 pz vs 17.6% 6/34 pz p value di 0.02*) ed infine i valori di glicemia a digiuno, infatti il gruppo A presentava un'alterata glicemia a digiuno mentre il gruppo B aveva valori normali (115.9 ± 29.1 vs 87.7 ± 13.6 mg/dl p value di 0.04*). Confrontando poi i gruppi A e B, non sono state rilevate differenze statisticamente significative per i test di funzionalità respiratoria: FEV1: valore p = 0.541, capacità vitale forzata (FVC): valore p = 0,479 e flusso espiratorio forzato (FEF) 25-75%: valore p=0,307.

Il valore p del punteggio medio di DXA lombare in un gruppo rispetto al gruppo B è 0,939. Il valore p del punteggio medio della DXA femorale in un gruppo rispetto al gruppo B era 0,775. Il confronto tra i due gruppi (A vs B) per il DXA totale del corpo non ha rivelato differenze statisticamente significative: % fat p value = 0.76.

Il p value del valore assoluto di HQL-s nel gruppo A rispetto al gruppo B era 0.11. Il valore p di Z SCORE dell'HQL in un gruppo A rispetto al gruppo B era 0,29. Abbiamo notato che tra i pazienti con GHD (sia parziale che grave), il 50% era omozigote per la mutazione F508del, mentre tra quelli senza deficit di GH, il 39% era omozigote per la mutazione F508del del gene CFTR (p = 0.707). Confrontando il gruppo con normale secrezione di GH versus il gruppo con deficit di GH, non abbiamo trovato differenze statistiche nei valori assoluti medi di IGF-1 e nel punteggio medio di deviazione standard IGF-1 (SDS) tra gruppo A (- 0,92 ± 1,06) e Gruppo B (- 1,09 ± 1,72) p value = 0,71. Prendendo atto di questo risultato, in un secondo momento, su campioni di sangue, conservati a - 80 ° C, abbiamo eseguito saggi di IGF-BP3, proteina IGF-2 e delle altre proteine leganti correlate all'asse GH / IGF- 1 asse, utilizzando la tecnologia Bio-Plex Pro RBM-BIORAD. Il test è stato eseguito solo su 41 dei 50 pazienti nello studio, di cui il 34,2% (14/41) presentava deficit di GH, grave nel 12,2% (5/41) e parziale nel 22% (9/41). Ancora una volta, abbiamo confrontato i 41 pazienti dividendoli in due gruppi: quelli con deficit di GH (parziale e grave) e quelli senza deficit. Non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. Nel 2018, a distanza di 5 anni, dopo aver effettuando nuovamente il test di stimolo al GHRH + Arginina su un campione di 10 pazienti dei 50 arruolati in origine, abbiamo suddiviso i pazienti in 2 gruppi: gruppo A quelli in terapia con farmaci modulatori del gene CFTR (Orkambi Vertex Lumacaftor +Ivacaftor) e gruppo B pazienti non in terapia perché affetti da mutazioni non responsive ai farmaci modulatori.

Il BMI dei 10 pazienti non aveva presentato modifiche a distanza di tempo. Lo studio per immagini eseguito con RMN encefalo, tronco encefalico ed ipofisi senza e con contrasto, eseguito su 5 di questi pazienti, non ha evidenziato alcuna alterazione morfologica ne alterazione di segnale della regione diencefalo ipofisaria. (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche generali dei pazienti in studio.

N° PZ	SESSO	ETA'	BMI 2013	BMI 2018	GHD 2013	GHD 2018	TP. con Orkambi
1	M	47	25.6	25	GRAVE	NORMALE	SI
2	M	36	23.1	21	PARZIALE	NORMALE	SI
3	M	30	22	22	PARZIALE	PARZIALE	NO
4	F	29	18.7	20	PARZIALE	NORMALE	SI
5	M	50	27.3	27	PARZIALE	PARZIALE	NO
6	M	41	23.7	24.5	PARZIALE	NORMALE	SI
7	M	43	23	24.5	PARZIALE	PARZIALE	NO
8	M	60	24	24	GRAVE	NORMALE	SI
9	M	40	21	22	PARZIALE	NORMALE	NO
10	M	54	23	23.1	GRAVE	GRAVE	NO

Il gruppo A si componeva di 5 pazienti, 4 maschi e 1 femmina; di questi 2 pazienti maschi risultati precedentemente affetti da deficit grave di GH, hanno avuto una normale risposta dell'asse GH/IGF-1 al test di stimolo (passando rispettivamente da un picco di GH di 11 a 21 ng/ml e di 8 a 22.3 ng/ml). Anche i 3 pazienti che nel 2013 avevano mostrato un deficit parziale di GH, 2 maschi e 1 femmina, hanno presentato una normale risposta al test di stimolo (rispettivamente con picco di GH da 12 a 21 ng/ml, da 12 a 28 ng/ml e da 15 a 27 ng/ml). Nel gruppo B composto da 5 pazienti tutti maschi, 3 pazienti avevano riconfermato un deficit parziale di GH (rispettivamente un picco di GH da 16 a 16 ng/dl, da 12 a 13 ng/ml e da 16 a 16 ng/ml). Solo un paziente era passato da deficit parziale di GH a normale risposta al test (picco GH da 12 a 24.7 ng/ml) ed un paziente aveva riconfermato la presenza di deficit grave di GH (picco da 9 a 6.26 ng/ml) questo paziente aveva assunto terapia con rhGH per circa 2 anni e aveva sospeso la terapia sostitutiva circa 2 mesi prima di ripetere il test al GHRH + Arginina, riprendendo poi ad assumere il GH ricombinante dopo la risposta deficitaria al test di stimolo.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE

Il nostro studio mostra che in una popolazione di 50 pazienti adulti con fibrosi cistica i quali hanno avuto tutti una crescita normale e non presentano nella storia clinica pregressa terapie con ormone della crescita ricombinante, ben il 32% dei (16/50) pazienti, presentava un deficit di GH. Il 37,5% dei pazienti con deficit di GH mostrava un'alterata glicemia a digiuno e una maggiore prevalenza di diabete correlato alla fibrosi cistica (CFRD). Il BMI era normale in tutti i pazienti, ma era significativamente più alto in quelli con il deficit di GH. La circonferenza vita era significativamente più alta nei pazienti con deficit. I dati sulla funzione tiroidea, che al momento attuale per tutti i pazienti risultavano essere nella norma, potranno essere ricontrollati successivamente con un follow up nel tempo. L'auto-percezione della qualità della vita era simile nei due gruppi di pazienti, ma questo risultato è comprensibile considerando il forte impatto che la Fibrosi Cistica ha sulla qualità della vita. Sarebbe interessante valutare se anche nei pazienti con Fibrosi Cistica si verifici un miglioramento della percezione della qualità della vita dopo trattamento con terapia sostitutiva come già riportato in letteratura.

I valori della funzione polmonare non sono significativamente diversi tra pazienti con e senza deficit di GH. A differenza delle popolazioni pediatriche che mostrano deficit di IGF-1 e IGFBP-3, negli adulti studiati, i valori di tutti gli effettori e le proteine di trasporto correlate con l'asse GH / IGF-1 erano normali e non vi era alcuna differenza tra il gruppo con e senza deficit di GH. Nei pazienti pediatrici, l'IGF-1 è il parametro più affidabile per misurare lo stato della secrezione di GH. Sfortunatamente, soprattutto nei pazienti adulti, a fini diagnostici, IGF-1 è molto meno affidabile. Infatti, negli adulti con carenza di GH evidente, i valori di IGF-1 sono spesso normali. L'importanza dei livelli ematici di IGF-1, dal punto di vista diagnostico, può essere considerata solo in un contesto clinico appropriato. Infatti, negli adulti IGF-1 è più spesso utilizzato in pazienti già diagnosticati con deficit di GH per misurare la loro risposta alla terapia sostitutiva con GH ricombinante. Questo studio ha alcune limitazioni, come il numero dei pazienti studiati e la mancanza di misurazione delle citochine proinfiammatorie.

In conclusione, questo studio pilota, ha mostrato una significativa prevalenza del deficit di GH nei pazienti adulti con Fibrosi Cistica. Infine, abbiamo trovato un'associazione tra le gravi mutazioni genetiche e il deficit di GH. Quindi, in futuro dovremmo valutare come il genotipo del paziente possa influire sull'insorgenza di una carenza di GH piuttosto che considerare l'ipossia l'unica responsabile. Per convalidare questa ipotesi, è necessario ampliare il campione di pazienti soprattutto per l'alta variabilità genetica che presentano i pazienti italiani con Fibrosi Cistica.

Bibliografia.

1. Wilson, Foster, Kronenberg, Larse
Williams Textbook of Endocrinology
WB Saunders Company, 9th edition
2. Faglia G
Malattie del Sistema Endocrino
McGraw Hill, 4^a Edizione, giugno 2006
3. Fabrizio Monaco
Endocrinologia Clinica
Società editrice Universo 4^a Edizione
4. Molitch ME, Clemmons DR et al.
Evaluation and Treatment of adult growth Hormone deficiency: An Endocrine
Society Clinical Practice Guideline
JCEM, June 2011;96(6):1587-1609
5. Thomas JDJ and Monson JP
Adult GH deficiency throughout lifetime
European Journal of Endocrinology 2009;161:97-106
6. Rosilio M, Blum WF, Edwards DJ et al
Long-term improvement of quality of life during growth hormone (GH)
replacement therapy in adults GH deficiency, as measured by questions on life
satisfaction- hypopituitarism (QLS-H)
J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:1684-1693.

7. Davidson P, Milne R, Chase D, Cooper C
Growth hormone replacement in adults and bone mineral density: a systematic review and meta-analysis
Clin Endocrinol (Oxf) 2004;60(1):92-8
8. Roger Abs
Update on the diagnosis of GH deficiency in adults
European journal of Endocrinology 2003;148:3-8
9. Aimaretti G, Corneli G et al.
Comparison between insulin-induced hypoglycemia and growth (GH) releasing hormone + Arginine as provocative tests for the diagnosis of GH deficiency in adults
J Clin Endocrinol Metab 1998, 83: 1615 – 1618
10. Murray R.D
The phenotype of adults with partial Growth Hormone Deficiency
Horm Res.2005;64(2):12-17
11. Murray RD, Shalet SM, Adams JE
A densitometric and morphometric analysis of the skeleton in adults with varying degrees of growth hormone deficiency
J Clin Endocrinol Metab.2010;91(2):432-438
12. GH Deficiency Consensus Workshop Participants
Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of GH Research Society in association with the European Society for Pediatric Endocrinology, Lawson Wilkins Society, European Society of Endocrinology, Japan Endocrine Society and Endocrine Society of Australia
Eur J Endocrinol.2007;157:695-700

13. ML Hartman, Crowe BJ, Biller BM, Ho KK, Clemmons DR, Chipman JJ; HyposCCS Advisory Board; U.S. HypoCCS Study Group 2000
Which patients do not require a GH stimulation test for the diagnosis of adult GH deficiency?
J Clin Endocrinol Metab 87:477– 485
14. Biller BM., Samuels MH., Zagar A., et al.
Sensitivity and specificity of six tests for the diagnosis of adult growth hormone deficiency
J Clin Endocrinol Metab 2002,87:2067-2079
15. Juul A, Kastrup KW, Pedersen SA, Skakkebaek NE
Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3
J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 1195–1201
16. Toogood AA, Beardwell CG, Shalet SM
The severity of growth hormone deficiency in adults with pituitary disease is related to the degree of hypopituitarism
Clin Endocrinol (Oxf) 1994, 41: 511–516
17. P.M. Farrell
The prevalence of cystic fibrosis in the European Union
Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008), pp. 450-453
18. J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielinski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, et al.
Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA

- Science, 245 (1989), pp. 1066-1073
19. M. Cohen-Cymberknoh, D. Shoseyov, E. Kerem
Managing cystic fibrosis: Strategies that increase life expectancy and improve quality of life
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 183 (2011), pp. 1463-1471
 20. D. Gelfond, D. Borowitz
Gastrointestinal complications of cystic fibrosis
Clinical Gastroenterology and Hepatology, 11(2013), pp. 333-342
 21. H. LundPalau, A.R. Turnbull, A. Bush, E. Bardin, L. Cameron, O. Soren, et al.
Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches
Expert Review of Respiratory Medicine, 10(2016), pp. 685-697
 22. S. Conway, I.M. BalfourLynn, K. DeRijcke, P.Drevinek, J. Foweraker, et al.
European cystic fibrosis society standards of care: Framework for the cystic fibrosis Centre
Journal of Cystic Fibrosis, 13 (Suppl. 1) (2014)
 23. T. MacKenzie, A.H. Gifford, K.A. Sabadosa, H.B.Quinton, E.A. Knapp, et. al.
Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: Survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry
Annals of Internal Medicine, 161 (2014), pp. 233-241
 24. P.R. Burgel, G. Bellis, H.V. Olesen, L. Viviani, A.Zolin, F. Blasi, et. al.
Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries
The European Respiratory Journal, 46 (2015), pp. 133-141
 25. T.S. Cohen, A. Prince
Cystic fibrosis: A mucosal immunodeficiency syndrome

- Nature Medicine, 18 (2012), pp. 509-519
26. T.C. Hwang, K.L. Kirk
The CFTR ion channel: Gating, regulation, and anion permeation
Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 3(2013), p. a009498
 27. C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek Jr., J.J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, et.al.
Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice
Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008), pp. 179-196
 28. M.J. Welsh, A.E. Smith
Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis
Cell, 73 (1993), pp. 1251-1254
 29. K. De Boeck, M.D. Amaral
Progress in therapies for cystic fibrosis
Lancet Respiratory Medicine (2016)
 30. C. Ferec, G.R. Cutting
Assessing the disease-liability of mutations in CFTR
Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(2012), p. a009480
 31. K. De Boeck, A. Zolin, H. Cuppens, H.V. Olesen, L. Viviani
The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis
Journal of Cystic Fibrosis, 13 (2014), pp. 403-409
 32. M. Brodlie, I.J. Haq, K. Roberts, J.S. Elborn
Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis
Genome Medicine, 7 (2015), p. 101
 33. P.M. Quinton
Cystic fibrosis: Impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis

- Lancet, 372 (2008), pp. 415-417
34. M.R. Knowles, R.C. Boucher
Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways
The Journal of Clinical Investigation, 109 (2002), pp. 571-577
35. A.A. Pezzulo, X.X. Tang, M.J. Hoegger, M.H. Alaiwa, S. Ramachandran, et. al.
Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung
Nature, 487 (2012), pp. 109-113
36. M.A. Mall, R.C. Boucher
Pathophysiology of cystic fibrosis lung disease
European Respiratory Monograph, 64 (2014), pp. 1-13
37. F. VanGoor, S. Hadida, P.D. Grootenhuys, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, et. al.
Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(2009), pp. 18825-18830
38. P.D. Eckford, C. Li, M. Ramjeesingh, C.E. Bear
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner
The Journal of Biological Chemistry, 287 (2012), pp. 36639-36649
39. F. Van Goor, H. Yu, B. Burton, B.J. Hoffman
Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function
Journal of Cystic Fibrosis, 13 (2014), pp. 29-36
40. F.J. Accurso, S.M. Rowe, J.P. Clancy, M.P. Boyle, J.M. Dunitz, P.R. Durie, et. al.
Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation

The New England Journal of Medicine, 363(2010), pp. 1991-2003

41. G.S. Sawicki, E.F. McKone, D.J. Pasta, S.J. Millar, J.S. Wagener, C.A. Johnson, et. al.
Sustained benefit from ivacaftor demonstrated by combining clinical trial and cystic fibrosis patient registry data
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 192 (2015), pp. 836-842
42. K. DeBoeck, A. Munck, S. Walker, A. Faro, P. Hiatt, G. Gilmartin, M. Higgins
Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation
Journal of Cystic Fibrosis, 13 (2014), pp. 674-680
43. R.B. Moss, P.A. Flume, J.S. Elborn, J. Cooke, S.M. Rowe, S.A. McColley, et. al.
Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: A double-blind, randomised controlled trial
Lancet Respiratory Medicine, 3 (2015), pp. 524-533
44. J.C. Davies, S. Cunningham, W.T. Harris, A. Lapey, W.E. Regelman, et. al.
Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): An open-label, single-arm study
Lancet Respiratory Medicine, 4 (2016), pp. 107-115
45. P.M. Barrett, A. Alagely, E.J. Topol
Cystic fibrosis in an era of genomically guided therapy
Human Molecular Genetics, 21 (2012), pp. R66-R71
46. S. Molinski, P.D. Eckford, S. Pasyk, S. Ahmadi, S. Chin, C.E. Bear
Functional rescue of F508del-CFTR using small molecule correctors
Frontiers in Pharmacology, 3 (2012), p. 160
47. H.Y. Ren, D.E. Grove, O. De La Rosa, S.A. Houck, P. Sopha, F. Van Goor, et. al.

- CyrVX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1
Molecular Biology of the Cell, 24 (2013), pp. 3016-3024
48. F. VanGoor, S. Hadida, P.D. Grootenhuis, B.Burton, J.H. Stack, K.S. Straley, et. al.
Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(2011), pp. 18843-18848
49. M.P. Boyle, S.C. Bell, M.W. Konstan, S.A.McColley, S.M. Rowe, E. Rietschel, et. al.
V. X. sA CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: A phase 2 randomised controlled trial
Lancet Respiratory Medicine, 2 (2014), pp. 527-538
50. Tsukasa Okiyoneda, Hervé Barrière, Miklós Bagdány, Wael M. Rabeh, Kai Du, Jörg Höhfeld, Jason C. Young, Gergely L. Lukacs
Peripheral Protein Quality Control Removes Unfolded CFTR from the Plasma Membrane
Science 13 Aug 2010: Vol. 329, Issue 5993, pp. 805-810
51. Guido Veit, Radu G. Avramescu, Doranda Perdomo, Puay-Wah Phuan, Miklos Bagdany, Pirjo M. Apaja, Florence Borot, Daniel Szollosi, Yu-Sheng Wu, Walter E. Finkbeiner, Tamas Hegedus, Alan S. Verkman and Gergely L. Lukacs
Some gating potentiators, including VX-770, diminish $\Delta F508$ -CFTR functional expression
Science Translational Medicine 23 Jul 2014:Vol. 6, Issue 246, pp. 246ra97
52. Deborah M. Cholon, Nancy L. Quinney, M. Leslie Fulcher, Charles R. Esther Jr., Jhuma Das, Nikolay V. Dokholyan, Scott H. Randell, Richard C. Boucher et. al.

- Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis
Science Translational Medicine 23 Jul 2014: Vol. 6, Issue 246, pp. 246ra96
53. T. Okiyoneda, G. Veit, J.F. Dekkers, M. Bagdany, N. Soya, H. Xu, G.L. Lukacs
Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function
Nature Chemical Biology, 9 (2013), pp. 444-454
54. K. Zaman, V. Sawczak, A. Zaidi, M. Butler, D. Bennett, P. Getsy, B. Gaston
Augmentation of CFTR maturation by S-nitrosoglutathione reductase
American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 310 (2016), pp. L263-L270
55. Quon BS, Rowe SM.
New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis.
BMJ. 2016 Mar 30;352:i859.
56. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL
Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis.
Am J Respir Crit Care Med. 2010 Nov 15;182(10):1262-72.
57. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Elborn JS, Melotti P, Bronsveld I, Fajac I, Malfroot A, Rosenbluth DB, Walker PA, McColley SA, Knoop C, Quattrucci S, Rietschel E, Zeitlin PL, Barth J, Elfring GL, Welch EM, Branstrom A, Spiegel RJ, Peltz SW, Ajayi T, Rowe SM; Cystic Fibrosis Ataluren Study Group.

- Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial
Lancet Respir Med. 2014 Jul;2(7):539-47.
58. M.R. Knowles, R.C. Boucher
Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways
The Journal of Clinical Investigation, 109 (2002), pp. 571-577
59. M. Althaus
ENaC inhibitors and airway re-hydration in cystic fibrosis: State of the art
Current Molecular Pharmacology, 6 (2013), pp. 3-12
60. M.A. Mall, L.J. Galiotta
Targeting ion channels in cystic fibrosis
Journal of Cystic Fibrosis, 14 (2015), pp. 561-570
61. E.W. Alton, A.C. Boyd, J.C. Davies, D.R. Gill, U.Griesenbach, P.T. Harrison, et. al.
Genetic medicines for CF: Hype versus reality
Pediatric Pulmonology, 51 (2016), pp. S5-S17
62. U. Griesenbach, K.M. Pytel, E.W. Alton
Cystic fibrosis Gene therapy in the UK and elsewhere
Human Gene Therapy, 26 (2015), pp. 266-275
63. E.W. Alton, D.K. Armstrong, D. Ashby, K.J.Bayfield, D. Bilton, et. al.
U.K.C.F.G.T. Consortium Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial
Lancet Respiratory Medicine, 3 (2015), pp. 684-691
64. G. Schwank, B.K. Koo, V. Sasselli, J.F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, H. Clevers
Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients

Cell Stem Cell, 13 (2013), pp. 653-658

65. P.C. Zamecnik, M.K. Raychowdhury, D.R. Tabatadze, H.F. Cantiello

Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured Delta508 cystic fibrosis
transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America, 101(2004), pp. 8150-8155